SUPERINTENDENCIA DE IN

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-037828- -00000-0000

Fecha: 2013-02-25 15:59:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 388

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TITULO** MICROORGANISMOS Y MÉTODOS PARA LA BIOSÍNTESIS DE AROMÁTICOS, 2,4-PENTADIENOATO Y 1,3-BUTADIENO

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** GENOMATICA, INC.

DOMICILIO SAN DIEGO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. **APODERADO** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. **SANTAFE DE BOGOTÀ, D.C.** _____

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

icación

No. 13-037828- -00000-0000

Fecha: 2013-02-25 15:59:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 388

AS. 123.411

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	**TIPO DE SOLICITUD**	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capitulo II

2 DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)

Solicitud Internacional No.	PCT/US2011/045364	**Fecha**	26.07.2011
Publicación Internacional No.	WO 2012/018624	**Fecha**	09.02.2012

3 TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)

MICROORGANISMOS Y MÉTODOS PARA LA BIOSÍNTESIS DE AROMÁTICOS, 2,4-PENTADIENOATO Y 1,3-BUTADIENO

4 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)

5 SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor — Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
1.	GENOMATICA, INC.			

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN	10520 Wateridge Circle, 92121	No. TELÉFONO	
CIUDAD	San Diego	CORREO ELECTRÓNICO	
DEPARTAMENTO/ESTADO	CA	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	CA
PAÍS DE RESIDENCIA	US		

7 INVENTOR (ES) — Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1.	OSTERHOUT	Robin, E.	US
2.	BURGARD	Anthony, P.	US
3.	PHARKYA	Priti	IN
4.	BURK	Mark, J.	US

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1.	US	CA	San Diego	10520 Wateridge Circle, 92121
2.	US	CA	San Diego	10520 Wateridge Circle, 92121
3.	US	CA	San Diego	10520 Wateridge Circle, 92121
4.	US	CA	San Diego	10520 Wateridge Circle, 92121

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de información complementaria.

9 ☐ **REPRESENTANTE LEGAL** ☒ **APODERADO**

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
CADENA SARMIENTO	JUAN PABLO	C.C . 80.410.337 T.P . 57492

DIRECCIÓN	Calle 70A 4 41	No. TELÉFONO	7442200
CIUDAD	Bogotá, D.C.	CORREO ELECTRÓNICO	
PAÍS	CO	No. RADICACIÓN O PROTOCOLO DE PODER GENERAL	

10 DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO

	(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1.	US	US	61/367,792	2010.07.26
2.	US	US	61/368,223	2010.07.27
3.	US	US	61/381,407	2010.09.09

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro.

13	REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas ☐

Universidades públicas o privadas ☐

Entidades sin ánimo de lucro ☐

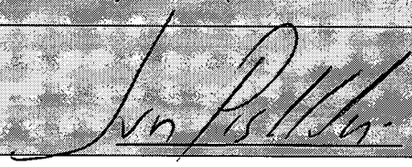
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	**No.** 13-3545	**Fecha:** 21.02.2013

16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL *Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)*



17	ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios: 4-297
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 243
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios: 349-373
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☐ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☒ Poderes, si fuera el caso.
10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medianas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
☐ Hoja de información complementaria.
☐ Otros, especificar:

14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
9 February 2012 (09.02.2012)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2012/018624 A3

(51) International Patent Classification:
C12P 5/00 (2006.01) *C12P 7/40* (2006.01)
C12P 5/02 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2011/045364

(22) International Filing Date:
26 July 2011 (26.07.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

61/367,792	26 July 2010 (26.07.2010)	US
61/368,223	27 July 2010 (27.07.2010)	US
61/381,407	9 September 2010 (09.09.2010)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **GENOMATICA, INC.** [US/US]; 10520 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **OSTERHOUT, Robin, E.** [US/US]; 10520 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121 (US). **BURGARD, Anthony, P.** [US/US]; 10520 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121 (US). **PHARKYA, Priti** [IN/US]; 10520 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121 (US). **BURK, Mark, J.** [US/US]; 10520 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121 (US).

(74) Agents: **GAY, David, A.** et al.; Jones Day, 222 East 41st Street, New York, NY 10017-6702 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

(88) Date of publication of the international search report:
9 August 2012

(54) Title: MICROORGANISMS AND METHODS FOR THE BIOSYNTHESIS OF AROMATICS, 2,4-PENTADIENOATE AND 1,3-BUTADIENE

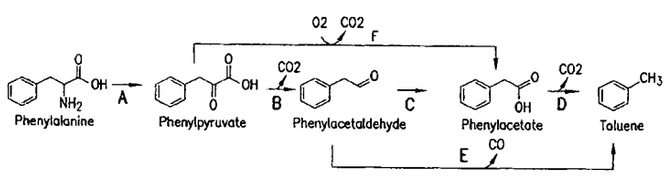


FIG. 1

(57) Abstract: The invention provides non-naturally occurring microbial organisms having a toluene, benzene, p-toluate, terephthalate, (2-hydroxy-3-methyl-4-oxobutoxy)phosphonate, (2-hydroxy-4-oxobutoxy)phosphonate, benzoate, styrene, 2,4-pentadienoate, 3-butene-lol or 1,3-butadiene pathway. The invention additionally provides methods of using such organisms to produce toluene, benzene, p-toluate, terephthalate, (2-hydroxy-3-methyl-4- oxobutoxy)phosphonate, (2-hydroxy-4-oxobutoxy)phosphonate, benzoate, styrene, 2,4- pentadienoate, 3-butene-lol or 1,3-butadiene.

WO 2012/018624 A3

MICROORGANISMOS Y MÉTODOS PARA LA BIOSÍNTESIS DE AROMÁTICOS, 2,4-PENTADIENOATO Y 1,3-BUTADIENO

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere en general a procesos biosintéticos, y más específicamente a organismos que tienen capacidad biosintética de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El tolueno es un solvente común que ha reemplazado al benceno debido a la mayor carcinogenicidad del benceno y es una materia prima industrial y se usa en la manufactura de TNT, espuma de poliuretano, benzaldehído y ácido benzoico. El tolueno es un derivado en la manufactura de gasolina y existe en pequeñas concentraciones en petróleo crudo.

El benceno es a menudo usado como un intermediario para elaborar otros químicos. Su mayoría de derivados ampliamente producidos incluyen estireno, el cual se usa para elaborar polímeros y plásticos, fenol para resinas y adhesivos, vía cumeno y ciclohexano, el cual se usa en la manufactura de Nylon. El benceno es también usado para elaborar algunos tipos de cauchos, lubricantes, tintes, detergentes, fármacos, explosivos, napalm y pesticidas. La producción de benceno en la industria del petróleo se hace por varios procesos intensivos de energía que incluyen, reformación catalítica, hidrodesalaquilación de tolueno, desproporción de tolueno y craqueo de vapor.

El estireno es el precursor para poliestireno y numerosos copolímeros. Los productos a base de estireno incluyen, acrilonitrilo 1,3-butadieno estireno (ABS), caucho de estireno-1,3-butadieno (SBR), látex de estireno-1,3-butadieno, SIS (estireno-isopreno-estireno), S-EB-S (estireno-etileno/butileno-estireno), estireno-divinilbenceno (S-DVB), y poliésteres insaturados. Estos materiales son usados en caucho, plástico, aislamiento, fibra de vidrio, tuberías, partes de automóviles y barcos, contenedores de alimentos, y reversos de alfombras.

El estireno es principalmente comúnmente producido por la deshidrogenación catalítica de etilbenceno. El etilbenceno es mezclado en la fase gaseosa con 10-15 veces su volumen en vapor a alta temperatura, y pasado sobre

un lecho catalizador sólido. La mayoría de los catalizadores de deshidrogenación de etilbenceno se basan en óxido de hierro (III), promovido por varios porcentajes de óxido de potasio o carbonato de potasio. El vapor sirve varios papeles en esta reacción. Es la fuente de calor para energizar la reacción endotérmica, y remueve el coque que tiende a formarse en el catalizador de óxido de hierro a través de la reacción de cambio de gas de agua. El promotor de potasio mejora esta reacción de descoquización. El vapor también diluye el reactivo y productos, cambiando la posición del equilibrio químico hacia los productos. Una planta de estireno típica consiste de dos o tres reactores en serie, los cuales operan bajo vacío para mejorar la conversión y selectividad. Las conversiones por paso típicas son aproximadamente de 65% para dos reactores y 70-75% para tres reactores.

Más de 25 millones de libras (55 millones de kilogramos) de 1,3-butadieno (o solo butadieno o BD) son producidas anualmente y se aplican en la manufactura de polímeros tales como cauchos sintéticos y resinas de ABS, y químicos tales como hexametilendiamina y 1,4-butanodiol. El 1,3-butadieno es típicamente producido como un derivado del proceso de craqueo de vapor para conversión de materias primas de petróleo tales como nafta, gas de petróleo licuado, etano o gas natural a etileno y otras olefinas. La capacidad para manufacturar 1,3-butadieno de materias primas alternativas y/o renovables podría representar un mayor avance en la cuestión de procesos de producción química más sostenibles.

Una forma posible para producir 1,3-butadieno de manera renovable involucra fermentación de azúcares u otras materias primas para producir dioles, tales como 1,4-butanodiol ó 1,3-butanodiol, los cuales son separados, purificados, y después deshidratados a 1,3-butadieno en una segunda etapa que involucra catálisis a base de metal. La producción fermentativa directa de 1,3-butadieno de materias primas renovables podría obviar la necesidad de etapas de deshidratación y el gas de 1,3-butadieno (pb -4.4°C) podría ser emitido continuamente del fermentador y fácilmente condensado y recolectado. Desarrollar un proceso de producción fermentativa podría eliminar la necesidad de 1,3-butadieno a base de fósil y podría permitir ahorros sustanciales en costo, energía y residuos peligrosos y emisiones con relación al 1,3-butadieno petroquímicamente derivado.

El 2,4-Pentadienoato es un derivado de butadieno sustituido útil en su propio derecho y un intermediario valioso en ruta a otros derivados de 1,3-butadieno sustituidos, que incluyen, por ejemplo, 1-carbamoil-1,3-butadienos los

cuales son accesibles vía reacomodos Curtius. Los derivados 1,3-butadieno N-protegidos resultantes pueden ser usados en reacciones Diels alder para la preparación de anilinas sustituidas. El 2,4-pentadienoato puede ser usado en la preparación de varios polímeros y copolímeros.

El tereftalato (también conocido como ácido tereftálico y PTA) es el precursor inmediato de tereftalato de polietileno (PET), usado para elaborar ropas, resinas, botellas de plástico y aún como un aditivo alimenticio para aves de corral. Casi todo el PTA es producido de *para*-xileno por oxidación en aire en un proceso conocido como el Proceso de Mediados de Siglo. Esta oxidación es conducida a alta temperatura en un solvente de ácido acético con un catalizador compuesto de sales de cobalto y/o manganeso. El para-xileno se deriva de fuentes petroquímicas y está formado por reformación catalítica de alta severidad de la nafta. El xileno es también obtenido de la corriente de pirólisis de gasolina en un craqueador de vapor de nafta por desproporción de tolueno.

Los métodos redituables para generar PTA renovable aún no han sido desarrollados a la fecha. El PTA, tolueno y otros precursores aromáticos son naturalmente degradados por algunas bacterias. Sin embargo, estas trayectorias de degradación típicamente involucran monooxigenasas que operan irreversiblemente en la dirección degradativa. Por lo tanto, las trayectorias biosintéticas para PTA son severamente limitadas por las propiedades de enzimas conocidas a la fecha.

Un precursor prometedor para PTA es *p*-toluato, también conocido como *p*-metilbenzoato. El *p*-toluato es un intermediario en algunos procesos industriales para la oxidación de *p*-xileno a PTA. Es también un intermediario para estabilizadores poliméricos, pesticidas, compuestos sensibles a la luz, suplementos de forraje animal y otros químicos orgánicos. Solamente ligeramente soluble en solución acuosa, el *p*-toluato es un sólido a temperaturas fisiológicas, con un punto de fusión de 275°C. Los catalizadores microbianos para sintetizar este compuesto de materias primas de azúcar aún no han sido descritos a la fecha.

De este modo, existe una necesidad de métodos alternativos para producir efectivamente cantidades comerciales de compuestos tales como estireno, 2,4-pentadienoato, 1,3-butadieno, p-toluato, tereftalato, benceno y tolueno. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona ventajas relativas también.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona organismos microbianos que no se originan naturalmente que tienen una trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. La invención adicionalmente proporciona métodos para usar tales organismos para producir tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno.

La invención también proporciona organismos microbianos que no se originan naturalmente que tienen una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato (2H3M4OP), una trayectoria de p-toluato, una trayectoria de tereftalato, una trayectoria de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato (2H4OP), y/o una trayectoria de benzoato. La invención adicionalmente proporciona métodos para usar tales organismos para producir (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, o benzoato.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la conversión de fenilalanina a tolueno vía fenilacetato. Las enzimas son A. fenilalanina aminotransferasa y/o fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), B. fenilpiruvato descarboxilasa, C. fenilacetaldehído deshidrogenasa y/u oxidasa, D. fenilacetato descarboxilasa, E. fenilacetaldehído descarbonilasa, y F. fenilpiruvato oxidasa.

La Figura 2 muestra la conversión de fenilalanina a benceno por benceno-liasa de fenilalanina.

La Figura 3 muestra trayectorias a estireno de benzoil-CoA. Las enzimas son: A. benzoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, C. benzoil-acetato descarboxilasa, D. acetofenona reductasa y E. 1-feniletanol deshidratasa, F. fosfotrans-3-oxo-3-fenilpropionilasa, G. benzoil-acetato cinasa.

La Figura 4 muestra la conversión de estereoisómeros de muconato a 1,3-butadieno. Las enzimas son A. *trans*, *trans*-muconato descarboxilasa, B. *cis*, *trans*-muconato *cis*-descarboxilasa, C. *cis*, *trans*-muconato *trans*-descarboxilasa, D. *cis*, *cis*-muconato descarboxilasa, E. *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa, F. *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa.

La Figura 5 muestra una representación esquemática de una

trayectoria ejemplar a (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato (2H3M4OP) de gliceraldehído-3-fosfato y piruvato. G3P es gliceraldehído-3-fosfato, DXP es 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato y 2ME4P es C-metil-D-eritritol-4-fosfato. Las enzimas son (A) DXP sintasa; (B) DXP reductoisomerasa; y (C) 2ME4P deshidratasa.

La Figura 6 muestra una representación esquemática de una trayectoria de shikimato alterna ejemplar a *p*-toluato. Las enzimas son: (A) 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa; (B) 3-deshidroquinato sintasa; (C) 3-deshidroquinato deshidratasa; (D) shikimato deshidrogenasa; (E) Shikimato cinasa; (F) 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa; (G) corismato sintasa; y (H) corismato liasa. Los compuestos son: (1) (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato; (2) 2,4-dihidroxi-5-metil-6-[(fosfonooxi)metil]oxan-2-carboxilato; (3) 1,3-dihidroxi-4-metil-5-oxociclohexan-1-carboxilato; (4) 5-hidroxi-4-metil-3-oxociclohex-1-eno-1-carboxilato; (5) 3,5-dihidroxi-4-metilciclohex-1-eno-1-carboxilato; (6) 5-hidroxi-4-metil-3-(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato; (7) 5-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]-4-metil-3-(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato; (8) 3-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]-4-metilciclohexa-1,5-dieno-1-carboxilato; y (9) *p*-toluato.

La Figura 7 muestra una trayectoria ejemplar para conversión de *p*-toluato a ácido tereftálico (PTA). Las reacciones A, B y C son catalizadas por *p*-toluato metil-monooxigenasa reductasa, deshidrogenasa de alcohol 4-carboxibencílico y deshidrogenasa de 4-carboxibencil aldehído, respectivamente. Los compuestos mostrados son (1) ácido *p*-toluico; (2) alcohol 4-carboxibencílico; (3) 4-carboxibenzaldehído y (4) ácido tereftálico.

La Figura 8 muestra una trayectoria ejemplar a (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato de eritrosa-4-fosfato. Las enzimas son: A. eritrosa-4-fosfato deshidratasa, B. (2,4-dioxobutoxi)fosfonato reductasa. Los compuestos son: (1) eritrosa-4-fosfato, (2) (2,4-dioxobutoxi)fosfonato y (3) (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato.

La Figura 9 muestra una trayectoria de shikimato alterna de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato a benzoato. Las enzimas son: A. 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa, B. 3-deshidroquinato sintasa, C. 3-deshidroquinato deshidratasa, D. shikimato deshidrogenasa, E. shikimato cinasa, F. 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa, G. corismato sintasa, H. corismato liasa. Los compuestos son: 1. (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, 2. 2,4-dihidroxi-6-[(fosfonooxi)metil]oxan-2-carboxilato, 3. 1,3-dihidroxi-5-oxociclohexan-1-carboxilato, 4. 5-hidroxi-3-oxociclohex-1-eno-1-carboxilato, 5. 3,5-dihidroxiciclohex-1-eno-1-carboxilato, 6. 5-

hidroxi-3-(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato, 7. 5-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]-3-(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato, 8. 3-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]ciclohexa-1,5-dieno-1-carboxilato, 9. benzoato.

La Figura 10 muestra trayectorias de benzoato y benzoil-CoA a benceno. Las enzimas son A. benzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, B. benzoato reductasa, C. benzaldehído descarbonilasa, D. benzoil-CoA reductasa, E. benzoato descarboxilasa, F. fosfotransbenzoilasa, G. (benzoiloxi)fosfonato reductasa (desfosforilación), H. benzoato cinasa.

La Figura 11 muestra trayectorias de *p*-toluato (también llamado ácido *p*-toluico) y *p*-metilbenzoil-CoA a tolueno. Las enzimas son A. *p*-metilbenzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, B. *p*-toluato reductasa, C. *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa, D. *p*-metilbenzoil-CoA reductasa, E. *p*-toluato descarboxilasa, F. fosfotrans-*p*-metilbenzoilasa, G. (*p*-metilbenzoiloxi)fosfonato reductasa (desfosforilación), H. *p*-toluato cinasa.

La Figura 12 muestra trayectorias a 2,4-pentadienoato de piruvato. Las enzimas son A. 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa, B. 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, C. 2-oxopentenoato reductasa, D. 2-hidroxipentenoato deshidratasa, E. 4-hidroxi-2-oxovalerato reductasa, F. 2,4-dihidroxipentanoato 2-deshidratasa, G. 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa y H. 2,4-dihidroxipentanoato 4-deshidratasa.

La Figura 13 muestra trayectorias de alanina y ornitina a 2,4-pentadienoato. Las enzimas son A. AKP tiolasa, B. AKP desaminasa, C. acetilacrilato reductasa, D. 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, E. AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, F. 2-hidroxi-4-oxopentanoato deshidratasa, G. 2,4-dihidroxipentanoato 2-deshidratasa, H. 2,4-dioxopentanoato 2-reductasa, I. 2-hidroxi-4-oxopentanoato reductasa, J. AKP reductasa, K. 2,4-dioxopentanoato 4-reductasa, L. 2-amino-4-hidroxipentanoato aminotransferasa y/o deshidrogenasa, M. ornitina 4,5-aminomutasa, N. 2,4-diaminopentanoato 4-aminotransferasa y/o 4-deshidrogenasa. AKP es 2-amino-4-oxopentanoato.

La Figura 14 muestra trayectorias adicionales de ornitina a 2,4-pentadienoato. Las enzimas son A. ornitina 2,3-aminomutasa, B. 3,5-diaminopentanoato desaminasa, C. 5-aminopent-2-enoato desaminasa, D. 3,5-diaminopentanoato aminotransferasa y/o deshidrogenasa, E. 3-amino-5-oxopentanoato desaminasa, F. 5-oxopent-2-enoato reductasa, G. 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, H. 5-aminopent-2-enoato aminotransferasa y/o deshidrogenasa, I. 3-amino-5-oxopentanoato reductasa, J. 3-amino-5-hidroxipentanoato desaminasa.

Figure 15 muestra trayectorias de 3-hidroxipropanoil-CoA y/o acrilil-CoA a 2,4-pentadienoato. Las enzimas son A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, M. acrilil-CoA acetiltransferasa, N. 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, O. 3-oxopent-4-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, P. 3-oxopent-4-enoato reductasa, Q. 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, R. 3-hidroxipent-4-enoil-CoA deshidratasa, S. 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa. 3-HP-CoA es 3-hidroxipropanoil-CoA.

La Figura 16 muestra la formación de butadieno de 3-hidroxipent-4-enoato (3HP4) por 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa.

Figure 17 muestra la formación de butadieno de 3,5-dihidroxipentanoato por 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa y 3-buteno-1-ol deshidratasa. La deshidratación de 3-buteno-1-ol a butadieno también puede ocurrir vía catálisis química.

La Figura 18 muestra la formación del intermediario 3-hidroxipent-4-enoato (3HP4) de 2,4-pentadienoato vía 2,4-pentadienoato hidratasa.

La Figura 19 muestra trayectorias a butadieno, 3-hidroxipent-4-enoato (3HP4), 2,4-pentadienoato y 3-buteno-1-ol de 3-HP-CoA y/o acrilil-CoA. Las enzimas son A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, M. acrilil-CoA acetiltransferasa, N. 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, O. 3-oxopent-4-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, P. 3-oxopent-4-enoato reductasa, Q. 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, R. 3-hidroxipent-4-enoil-CoA deshidratasa, S. 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa, T. 3-hidroxipent-4-enoil-CoA

transferasa, sintetasa o hidrolasa, U. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa, W. 3-buteno-1-ol deshidratasa (o conversión química), X. 2,4-pentadieno descarboxilasa, Y. 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa. 3-HP-CoA es 3-hidroxipropanoil-CoA.

La Figura 20 muestra trayectorias a 3-hidroxipent-4-enoato (3HP4), 2,4-pentadienoato y butadieno de succinil-CoA. Las enzimas son A. succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa, B. 3-oxoadipil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, C. 3-oxoadipato deshidrogenasa, D. 2-fumarilacetato descarboxilasa, E. 3-oxopent-4-enoato reductasa, F. 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa, G. 3-oxoadipil-CoA reductasa, H. 3-hidroxiadipil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, I. 3-hidroxiadipato deshidrogenasa, J. 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa, K. 3-oxoadipato reductasa, L. 2-fumarilacetato reductasa., M. 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa, N. 2,4-pentadienoato descarboxilasa.

La Figura 21 muestra trayectorias a 3-buteno-1-ol, butadieno y 2,4-pentadienoato de malonil-CoA y acetil-CoA. Las enzimas para transformación de los sustratos identificados a productos incluyen: A. malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa, B. 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona), C. 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído), D. 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa, E. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, F. 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, G. 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol), H. 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído), I. 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído), J. 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa, K. 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol), L. 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona), M. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa, N. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa, O. 3-buteno-1-ol deshidratasa (o conversión química), P. 2,4-pentadieno descarboxilasa.

La Figura 22 muestra el ciclo TCA reverso para fijación de CO_2 en carbohidratos como sustratos. Las transformaciones enzimáticas se llevan a cabo por las enzimas como se muestra.

La Figura 23 muestra la trayectoria para el ciclo TCA reverso acoplado con deshidrogenada de monóxido de carbono e hidrogenasa para la conversión de gas de síntesis o syngas a acetil-CoA.

La Figura 24 muestra manchados Western de 10 microgramos de extractos celulares de ACS90 (línea 1), ACS91 (línea2), Mta98/99 (líneas 3 y 4) con estándares de tamaño (línea 5) y controles de proteínas CODH

(Moth_1202/1203) o Mtr (Moth_1197) de *M. thermoacetica* (50, 150, 250, 350, 450, 500, 750, 900, y 1000 ng).

La Figura 25 muestra resultados de ensayo de oxidación de CO. Las células (*M. thermoacetica* o *E. coli* con el operón CODH/ACS; ACS90 o ACS91 o vector vacío: pZA33S) se hicieron crecer y se prepararon extractos. Los ensayos se realizaron a 55 °C a varios tiempos en el día que los extractos fueron preparados. La reducción de metilviológeno fue seguida a 578 nm durante un curso de tiempo de 120 seg.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se dirige, en parte, al diseño y producción de células y organismos que tienen capacidades de producción biosintética para tolueno, benceno, estireno, 2,4-pentadienoato y 1,3-butadieno. Las rutas a tolueno y benceno, Figuras 1 y 2, comienzan con el aminoácido que se origina naturalmente fenilalanina y, de este modo, la mayoría de los organismos serán capaces de servir como un hospedero para la construcción de un organismo que no se origina naturalmente para la producción de tolueno y benceno. Las estrategias para mejorar la producción de fenilalanina se conocen en la técnica (Yakandawala *et al.*, App. Microbiol. Biotech. 78:283-291 (2008); Lee *et al.*, Patente Estadounidense 5,008,190).

La ruta a estireno depende de un organismo para generar benzoil-CoA, como se indica en la Figura 3. El benzoil-CoA es un intermediario metabólico clave de numerosas trayectorias biosintéticas y de degradación. El benzoil-CoA es un precursor clave de productos naturales aromáticos tales como antibióticos, aromas y señales de defensa. Las trayectorias biológicas de la biosíntesis de benzoil-CoA se conocen en la técnica (Boatright *et al.*, Plant Physiol 135:1993-2011 (2004); Xiang *et al.*, J Bacteriol. 185:399-404 (2003); Moore *et al.*, J Nat.Prod 65:1956-1962 (2002)). El benzoil-CoA es también un intermediario común de trayectorias de degradación de compuestos aromáticos aeróbicos y anaeróbicos (Gescher *et al.*, J Bacteriol. 184:6301-6315 (2002); Philipp *et al.*, FEMS Microbiol Lett. 212:139-143 (2002); Koch *et al.*, Eur.J Biochem. 205:195-202 (1992)).

Esta invención también se dirige, en parte, a microorganismos que no se originan naturalmente que expresan genes que codifican enzimas que catalizan la producción de 1,3-butadieno, como se muestra en la Figura 4. En algunas modalidades, las trayectorias para la producción de muconato se derivan de precursores metabólicos centrales. El muconato es un producto de degradación

común de diversos compuestos aromáticos en microbios. Varias estrategias biocatalíticas para elaborar *cis,cis*-muconato han sido desarrolladas. Se han diseñado cepas de *E. coli* diseñadas por ingeniería que producen muconato de glucosa vía enzimas de la trayectoria de shikimato en el laboratorio Frost (Patente Estadounidense 5,487,987 (1996); Niu *et al.*, Biotechnol Prog., 18:201-211 (2002)). Estas cepas son capaces de producir 36.8 g/L de *cis,cis*-muconato después de 48 horas de cultivo bajo condiciones fermentadoras de alimentación por lotes (22% del rendimiento teórico máximo de glucosa). El muconato también ha sido producido biocatalíticamente de materiales de partida aromáticos tales como tolueno, ácido benzoico y catecol. Las cepas que producen muconato de benzoato logran tituladores de 13.5 g/L y productividad de 5.5 g/L/hr (Choi *et al.*, J. Ferment. Bioeng. 84:70-76 (1997)). El muconato también ha sido generado de los efluentes de una planta de producción de monómero de estireno (Wu *et al.*, Enzyme and Microbiology Technology 35:598-604 (2004)).

Esta invención también se dirige, en parte, a microorganismos que no se originan naturalmente que expresan genes que codifican enzimas que catalizan la producción de 2,4-pentadienoato, como se muestra en la Figuras 12-15. Cualquiera de estas trayectorias puede alimentarse en una trayectoria de 1,3-butadieno adicional por inclusión de la 2,4-pentadienoato descarboxilasa requisito. La Figura 12 muestra la conversión total de piruvato a 2,4-pentadienoato por tres trayectorias. La Figura 13 muestra la conversión total de ornitina o alanina a 2,4-pentadienoato vía el intermediario común 2-amino-4-cetopentanoato (AKP). La Figura 13 muestra seis rutas a 2,4-pentadienoato de AKP, tres de las cuales interceptan intermediarios mostrados en la Figura 12. La Figura 14 muestra cuatro rutas adicionales a 2,4-pentadienoato de ornitina. La Figura 15 muestra numerosas rutas a 2,4-pentadienoato de 3-hidroxipropanoil-CoA (3-HP-CoA) y acriloil-CoA.

La invención también se dirige, en parte, a microorganismos microbianos que no se originan naturalmente que expresan genes que codifican enzimas que catalizan la producción de 1,3-butadieno, como se muestra en la Figuras 16-17 y 19-21. La Figura 16 muestra la deshidratación descarboxilativa de 3-hidroxipent-4-enoato (3HP4) a 1,3-butadieno, donde 3HP4 está disponible vía trayectorias mostradas en las Figuras 15 y 19. 3HP4, es importante en su propio derecho, se muestra en la Figura 18 vía el intermediario 2,4-pentadienoato vía hidratación, así como también la vía de las trayectorias de las Figuras 15, 19, y 20. Del mismo modo, la Figura 17 muestra la deshidratación descarboxilativa en serie

y eliminación (deshidratación adicional) del intermediario 3,5-dihidroxipentanoato, el cual es el mismo accesible a través de las trayectorias mostradas en la Figura 15, 19, y 21.

La Figura 19 muestra trayectorias a 1,3-butadieno e intermediarios de 1,3-butadieno de 3-HP-CoA y acrilil-CoA. La Figura 20 muestra trayectorias a 1,3-butadieno e intermediarios de 1,3-butadieno de succinil-CoA. El succinil-CoA requisito es un intermediario metabólico central, el rendimiento del cual puede ser mejorado vía un ciclo TCA reductiva como se describe además en la presente. Finalmente, la Figura 21 muestra trayectorias a 1,3-butadieno e intermediarios de 1,3-butadieno a partir de la condensación de malonil-CoA y acetil-CoA, el último también beneficiándose del rendimiento incrementado vía trayectorias de TCA reductivas descritas en la presente.

La presente invención también se dirige al diseño y producción de células y organismos que tienen capacidades de producción biosintética para *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, tolueno, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, o benceno. Los resultados descritos en la presente indican que las trayectorias metabólicas pueden ser diseñadas y recombinantemente elaboradas por ingeniería para lograr la biosíntesis de *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, tolueno, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, o benceno en *Escherichia coli* y otras células u organismos. La producción biosintética de *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, tolueno, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, o benceno puede ser confirmada por construcción de cepas que tienen el genotipo metabólico diseñado. Estas células metabólicamente diseñadas por ingeniería u organismos también pueden ser sometidas a evolución adaptiva para aumentar además la biosíntesis de *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, tolueno, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, o benceno, incluyendo bajo condiciones de procedimiento teórico de máximo crecimiento.

La trayectoria de la biosíntesis de shikimato en *E. coli* convierte eritrosa-4-fosfato a corismato, un intermediario importante que conduce a la biosíntesis de muchos metabolitos esenciales que incluyen 4-hidroxibenzoato. El 4-hidroxibenzoato es estructuralmente similar a *p*-toluato, un precursor industrial de ácido tereftálico, y benceno. Como se describe en la presente, las enzimas de la trayectoria de shikimato son utilizadas para aceptar el sustrato alterno, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato (2H3M4OP), y transformarlo a *p*-toluato o

tolueno, o el sustrato alterno (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato (2H4OP) y transformarlo a benzoato o benceno. Además, se usa una trayectoria para sintetizar el precursor 2H3M4OP o 2H4OP usando enzimas de las trayectorias en mevelonato para biosíntesis de isoprenoide.

Descritas en la presente están estrategias para diseñar por ingeniería un microorganismo para producir *p*-toluato, tereftalato (PTA), tolueno, benzoato, o benceno renovable a partir de materias primas de carbohidratos. En las series de tolueno, gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y piruvato son convertidos a 2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato (2H3M4OP) en tres etapas enzimáticas (véase Ejemplo III y Figura 5). El intermediario 2H3M4OP es subsecuentemente transformado a *p*-toluato por enzimas en la trayectoria de shikimato (véase Ejemplo IV y Figura 6). El *p*-toluato puede ser además convertido a PTA por un microorganismo (véase Ejemplo V y Figura 7). En las series de benceno, 2H4OP es preparado por deshidratación y reducción de eritrosa-4-fosfato (véase Ejemplo VI y Figura 8). El intermediario 2H4OP es subsecuentemente transformado a benzoato por enzimas en la trayectoria de shikimato (véase Ejemplo VI y Figura 9). El benzoato y *p*-toluato son convertidos a benceno y tolueno, respectivamente (véase Ejemplo VII, y Figuras 10 y 11).

La conversión de G3P a *p*-toluato requiere un ATP, dos equivalentes de reducción (NAD(P)H), y dos moléculas de fosfoenolpiruvato, de conformidad con la reacción pura siguiente.

$$G3P + 2\ PEP + ATP + 2\ NAD(P)H + 2\ H^+ \rightarrow p\text{-Toluato} + 4\ Pi + ADP + 2\ NAD(P)^+ + CO_2 + H_2O$$

Una ATP adicional se requiere para sintetizar G3P de glucosa. El rendimiento máximo teórico de *p*-toluato es 0.67 mol/mol (0.51 g/g) de glucosa menos carbono requeridos para energía. Bajo la presunción de que 2 ATPs son consumidas por molécula sintetizada de *p*-toluato, el rendimiento pronosticado de *p*-toluato de glucosa es 0.62 mol/mol (0.46 g/g) *p*-toluato.

Si el *p*-toluato es además convertido a PTA por enzimas como se describe en el Ejemplo III, el rendimiento de PTA pronosticado de glucosa es 0.64 mol/mol (0.58 g/g). En este caso, la oxidación de *p*-toluato a PTA genera un equivalente de reducción puro adicional de conformidad con la reacción pura:

$$p\text{-toluato} + O_2 + NAD^+ \rightarrow PTA + NADH + 2\ H^+$$

Los candidatos de enzima para catalizar cada etapa de las trayectorias anteriores son descritos en las siguientes secciones. Las trayectorias exitosamente diseñadas por ingeniería para la producción de tolueno, benceno, estireno, *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato o 1,3-butadieno implica identificar una serie apropiada de enzimas con actividad y especificidad suficiente, clonando sus genes correspondientes en un hospedero de producción, optimizando la expresión de estos genes en el hospedero de producción, optimizando las condiciones de fermentación, y ensayando para formación del producto después de la fermentación.

Como se usa en la presente, el término "que no se origina naturalmente" cuando se usa con referencia a un organismo microbiano o microorganismo de la invención se pretende por significar que el organismo microbiano tiene al menos una alteración genética no encontrada normalmente en una cepa que se origina naturalmente de las especies referenciadas, incluyendo las cepas de tipo nativo de las especies referencias. Las alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, modificaciones introduciendo ácidos nucleicos expresables que codifican polipéptidos metabólicos, otras adiciones de ácidos nucleicos, supresiones de ácidos nucleicos y/o otras alteraciones funcionales del material genético del organismo microbiano. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, regiones codificantes y fragmentos funcionales de las mismas, para polipéptidos heterólogos, homólogos o tanto heterólogos como homólogos para las especies referenciadas. Modificaciones adicionales incluyen, por ejemplo, regiones reguladoras no codificantes en las cuales las modificaciones alteran la expresión de un gen u operón. Polipéptidos metabólicos ejemplares incluyen enzimas o proteínas dentro de una trayectoria biosintética de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, tolueno, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, o 1,3-butadieno.

Una modificación metabólica se refiere a una reacción bioquímica que es alterada de su estado que se origina naturalmente. Por lo tanto, microorganismos que no se originan naturalmente pueden tener modificaciones genéticas a ácidos nucleicos que codifican polipéptidos metabólicos, o fragmentos funcionales de los mismos. Modificaciones metabólicas ejemplares son descritas en la presente.

Como se usa en la presente, el término "aislado" cuando se usa con referencia a un organismo microbiano está propuesto por significar un organismo

que está sustancialmente libre de al menos un componente ya que el organismo microbiano referenciado se encuentra en la naturaleza. El término incluye un organismo microbiano que es removido de algunos o todos los componentes como se encuentran en su ambiente natural. El término también incluye un organismo microbiano que es removido de algunos o todos los componentes ya que el organismo microbiano se encuentra en ambientes que no se originan naturalmente. Por lo tanto, un organismo microbiano aislado es parcialmente o completamente separado de otras sustancias como se encuentra en la naturaleza o como es su crecimiento, almacenamiento o subsistencia en ambientes que no se originan naturalmente. Ejemplos específicos de organismos microbianos aislados incluyen microbios parcialmente puros, microbios sustancialmente puros y microbios cultivados en un medio que no se origina naturalmente.

Como se usa en la presente, los términos "microbiano," "organismo microbiano" o "microorganismo" están propuestos para significar cualquier organismo que existe como una célula microscópica que se incluye dentro de los dominios de arcae, bacteria o eucaria. Por lo tanto, el término está propuesto para abarcar células procarióticas o eucarióticas u organismos que tienen un tamaño microscópico e incluyen bacterias, arcaes y eubacterias de todas las especies así como también microorganismos eucarióticos tales como levaduras y hongos. El término también incluye cultivos celulares de algunas especies que pueden ser cultivadas para la producción de un bioquímico.

Como se usa en la presente, el término "CoA" o "coenzima A" está propuesto por significar un cofactor orgánico o grupo prostético (porción sin proteína de una enzima) cuya presencia es requerida para la actividad de muchas enzimas (la apoenzima) para formar un sistema de enzima activa. La Coenzima A funciona en ciertas enzimas de condensación, actúa en acetilo u otro transferencia de grupo acilo y en síntesis de ácido graso, y oxidación, oxidación de piruvato y en otra acetilación.

Como se usa en la presente, el término "(2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato," abreviado en la presente como 2H3M4OP, tiene la fórmula química como se muestra en la Figura 5. Tal compuesto también puede ser descrito como 3-hidroxi-2-metil butanal-4-fosfato.

Como se usa en la presente, el término "(2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato," abreviado en la presente como 2H4OP, tiene la fórmula química como se muestra en la Figura 8 (compuesto 3). Tal compuesto también puede ser descrito como 3-hidroxibutanal-4-fosfato.

Como se usa en la presente, el término "*p*-toluato," que tiene la fórmula molecular $C_8H_7O_2^-$ (véase Figura 6, compuesto 9)(nombre IUPAC 4-metilbenzoato) es la forma ionizada de ácido *p*-toluico, y se entiende que *p*-toluato y ácido *p*-toluico pueden ser usados intercambiablemente a través de esta para referirse al compuesto en cualquiera de sus formas neutral o ionizadas, que incluyen cualquiera de las formas de sal de los mismos. Se entiende por aquellos expertos en la técnica que la forma específica dependerá del pH.

Como se usa en la presente, el término "benzoato," que tiene la fórmula molecular $C_7H_6O_2$ (véase Figura 9, compuesto 9) es la forma ionizada de ácido benzoico, y se entiende que benzoato y ácido benzoico pueden ser usados de manera intercambiable a través de esta para referirse al compuesto en cualquiera de sus formas neutrales o ionizadas, que incluyen cualesquiera formas de sal de los mismos. Se entiende por aquellos expertos en la técnica que la forma específica dependerá del pH.

Como se usa en la presente, el término "tereftalato," que tiene la fórmula molecular $C_8H_4O_4^{-2}$ (véase Figura 7, compuesto 4)(nombre IUPAC tereftalato) es la forma ionizada de ácido tereftálico, también referido como ácido *p*-ftálico o PTA, y se entiende que tereftalato y ácido tereftálico pueden ser usados de manera intercambiable a través de esta para referirse al compuesto en cualquiera de sus formas neutral o ionizada, que incluyen cualesquiera formas de sal de los mismos. Se entiende por aquellos expertos de habilidad que la forma específica dependerá del pH.

Como se usa en la presente, el término "sustancialmente anaeróbico" cuando se usa con referencia a un cultivo o condición de crecimiento se entiende por significar que la cantidad de oxígeno es menor de aproximadamente 10% de saturación para oxígeno disuelto en medio líquido. El término también está propuesto para incluir cámaras selladas de medio líquido o sólido mantenido dentro de una atmósfera de menos de aproximadamente 1% de oxígeno.

"Exógeno" como se usa en la presente se pretende por significar que la molécula referenciada o la actividad referenciada son introducidas en el organismo microbiano hospedero. La molécula puede ser introducida, por ejemplo, por introducción de un ácido nucleico que codifica en el material genético hospedero tal como por integración en un cromosoma hospedero o como material genético no cromosomal tal como un plásmido. Por lo tanto, el término como se usa en referencia a expresión de un ácido nucleico codificante se refiere a la introducción del ácido nucleico codificante en una forma expresable en el

organismo microbiano. Cuando se usa con referencia a una actividad biosintética, el término se refiere a una actividad que es introducida en el organismo de referencia hospedero. La fuente puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico codificante homólogo o heterólogo que expresa la actividad referenciada después de la introducción en el organismo microbiano hospedero. Por lo tanto, el término "endógeno" se refiere a una molécula referenciada o actividad que está presente en el hospedero. De manera similar, el término cuando se usa con referencia a expresión de un ácido nucleico codificante se refiere a la expresión de un ácido nucleico codificante contenido dentro del organismo microbiano. El término "heterólogo" se refiere a una molécula o actividad derivada de una fuente distinta de las especies referenciadas mientras "homólogo" se refiere a una molécula o actividad derivada del organismo microbiano hospedero. Por consiguiente, la expresión exógena de un ácido nucleico codificante de la invención puede utilizar cualquiera o tanto un ácido nucleico codificante heterólogo u homólogo.

Se entiende que cuando más de un ácido nucleico exógeno es incluido en un organismo microbiano que más de un ácido nucleico exógeno se refiere al ácido nucleico codificante referenciado o actividad biosintética, como se discute anteriormente. Se entiende además, como se describe en la presente, que tal más de un ácido nucleico exógeno puede ser introducido en el organismo microbiano hospedero en moléculas de ácido nucleico separadas, en moléculas de ácido nucleico policistrónicas, o una combinación de los mismos, y todavía ser considerados como más de un ácido nucleico exógeno. Por ejemplo, como se describe en la presente un organismo microbiano puede ser diseñado por ingeniería para expresar dos o más ácidos nucleicos exógenos que codifican una enzima o proteína de trayectoria deseada. En el caso donde dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una actividad deseada son introducidos en un organismo microbiano hospedero, se entiende que los dos ácidos nucleicos exógenos pueden ser introducidos como un ácido nucleico único, por ejemplo, en un plásmido único, en plásmidos separados, pueden ser integrados en el cromosoma hospedero en un sitio único o sitios múltiples, y todavía ser considerados como dos ácidos nucleicos exógenos. De manera similar, se entiende que más de dos ácidos nucleicos exógenos pueden ser introducidos en un organismo hospedero en cualquier combinación deseada, por ejemplo, en un plásmido único, en plásmidos separados, pueden ser integrados en el cromosoma hospedero en un sitio único o sitios múltiples, y todavía ser considerados como dos o más ácidos nucleicos exógenos, por ejemplo tres ácidos nucleicos exógenos. De este modo,

el número de ácidos nucleicos exógenos referenciados o actividades biosintéticas se refiere al número de ácidos nucleicos codificantes o al número de actividades biosintéticas, no al número de ácidos nucleicos separados introducidos en el organismo hospedero.

Los organismos microbianos que no se originan naturalmente de la invención pueden contener alteraciones genéticas estables, las cuales se refieren a microorganismos que pueden ser cultivados por más de cinco generaciones sin pérdida de la alteración. En general, alteraciones genéticas estables incluyen modificaciones que persisten más de 10 generaciones, modificaciones particularmente estables persistirán por más de aproximadamente 25 generaciones, y más particularmente, modificaciones genéticas estables serán mayores de 50 generaciones, incluyendo indefinidamente.

Aquellos expertos en la técnica entenderán que las alteraciones genéticas, que incluyen modificaciones metabólicas ejemplificadas en la presente, son descritas con referencia a un organismo hospedero adecuado tal como *E. coli* y sus reacciones metabólicas correspondientes o un organismo de fuente adecuado para material genético deseado tal como genes para una trayectoria metabólica deseada. Sin embargo, dado el secuenciamiento del genoma completo de una amplia variedad de organismos y el alto nivel de habilidad en el área de genómica, aquellos expertos en la técnica fácilmente serán capaces de aplicar las enseñanzas y guías proporcionadas aquí para esencialmente todos los otros organismos. Por ejemplo, las alteraciones metabólicas de *E. coli* ejemplificadas en la presente pueden fácilmente ser aplicadas a otras especies incorporando el mismo o análogo ácido nucleico codificante de especies distintas de las especies referenciadas. Tales alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, alteraciones genéticas de homólogos de especies, en general, y en particular, desplazamientos de genes ortólogos, parálogos o no ortólogos.

Un ortólogo es un gen o genes que están relacionados por descendencia vertical y son responsables de sustancialmente las mismas o idénticas funciones en diferentes organismos. Por ejemplo, la epóxido hidrolasa de ratón y epóxido hidrolasa humana pueden ser considerados ortólogos para la función biológica de la hidrólisis de epóxidos. Los genes están relacionados por descendencia vertical cuando, por ejemplo, portan similitud de secuencia de cantidad suficiente para indicar que son homólogos, o relacionados por evolución de un ancestro común. Los genes también pueden ser considerados ortólogos si portan estructura tri-dimensional pero no necesariamente similitud de secuencia,

de una cantidad suficiente para indicar que han evolucionado a partir de un ancestro común en la magnitud de que la similitud de secuencia primaria no es identificable. Los genes que son ortólogos pueden codificar proteínas con similitud de secuencia de aproximadamente 25% a 100% de identidad de secuencia de aminoácido. Genes que codifican proteínas que portan una similitud de aminoácido de menos de 25% también pueden ser considerados por haberse originado por descendencia vertical si su estructura tri-dimensional también muestra similitudes. Miembros de la familia de serina proteasa de enzimas, que incluyen activador de plasminógeno del tejido y elastasa, son considerados por tener origen por descendencia vertical de un ancestro común.

Los ortólogos incluyen genes o sus productos de gen codificados que a través de, por ejemplo, evolución, han divergido en estructura o actividad total. Por ejemplo, donde una especie que codifica un producto de gen que presenta dos funciones y donde tales funciones han sido separadas en distintos genes en una segunda especie, los tres genes y sus productos correspondientes son considerados por ser ortólogos. Para la producción de un producto bioquímico, aquellos expertos en la técnica entenderán que el gen ortólogo que alberga la actividad metabólica a ser introducida o interrumpida es elegido para construcción del microorganismo que no se origina naturalmente. Un ejemplo de ortólogos que presentan actividades separables es donde actividades distintas han sido separadas en productos de gen distintos entre dos o más especies o dentro de una especie única. Un ejemplo específico es la separación de proteólisis de elastasa y proteólisis de plasminógeno, dos tipos de actividad de serina proteasa, en moléculas distintas como activador de plasminógeno y elastasa. Un segundo ejemplo es la separación de 5'-3' exonucleasa del micoplasma y actividad de polimerasa III de ADN de *Drosophila*. La polimerasa de ADN de la primera especie puede ser considerada un ortólogo a cualquiera o ambos de la exonucleasa o la polimerasa de la segunda especie y vice versa.

Por el contrario, los parálogos son homólogos relacionados mediante, por ejemplo, duplicación seguida por divergencia evolucionaria y tienen funciones similares o comunes, pero no idénticas. Los parálogos pueden originarse o derivarse de, por ejemplo, las mismas especies o de especies diferentes. Por ejemplo, la epóxido hidrolasa microsomal (epóxido hidrolasa I) y epóxido hidrolasa soluble (epóxido hidrolasa II) pueden ser considerados parálogos debido a que representan dos enzimas distintas, co-evolucionadas de un ancestro común, que catalizan reacciones distintas y tienen funciones distintas

en las mismas especies. Los parálogos son proteínas de las mismas especies con similitud de secuencia significante entre sí sugiriendo que son homólogos, o relacionados a través de co-evolución de un ancestro común. Grupos de familias de proteínas parálogas incluyen homólogos de HipA, genes de luciferasa, peptidasas y otros.

Un desplazamiento de gen no ortólogo es un gen no ortólogo de una especie que se puede sustituir por una función de gen referenciado en una especie diferente. La sustitución incluye, por ejemplo, ser capaz de realizar sustancialmente la misma o similar función en las especies de origen comparadas con la función referenciada en las especies diferentes. Aunque en general, un desplazamiento de gen no ortólogo será identificable como estructuralmente relacionado con un gen conocido que codifica la función referenciada, genes menos estructuralmente relacionados pero funcionalmente similares y sus productos de genes correspondientes no obstante todavía caerán dentro del significado del término como se usa en la presente. Similitud funcional requiere, por ejemplo, al menos alguna similitud estructural en el sitio activo o región de unión de un producto de gen no ortólogo comparado con un gen que codifica la función buscada para ser sustituida. Por lo tanto, un gen no ortólogo incluye, por ejemplo, un parálogo o un gen no relacionado.

Por lo tanto, en la identificación y construcción de los organismos microbianos que no se originan naturalmente de la invención que tiene capacidad biosintética de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno, aquellos expertos en la técnica entenderán con aplicación de las enseñanzas y guías proporcionadas en la presente a una especie particular, que la identificación de modificaciones metabólicas puede incluir identificación e inclusión o inactivación de ortólogos. En la magnitud de que los desplazamientos de genes parálogos y/o no ortólogos están presentes en el microorganismo referenciado que codifica una enzima que cataliza una reacción metabólica similar o sustancialmente similar, aquellos expertos en la técnica también pueden utilizar estos genes evolutivamente relacionados.

Desplazamientos de genes ortólogos, parálogos y no ortólogos pueden ser determinados por métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, la inspección de secuencias de ácido nucleico o aminoácido de dos polipéptidos revelará la identidad de secuencia y similitudes entre las

secuencias comparadas. Con base en tales similitudes, un experto en la técnica puede determinar si la similitud es suficientemente alta para indicar que las proteínas están relacionadas a través de la evolución de un ancestro común. Los algoritmos bien conocidos para aquellos expertos en la técnica, tales como Align, BLAST, Clustal W y otros comparan y determinan una similitud de secuencia pura o identidad, y también determinan la presencia o significancia de hendiduras en la secuencia la cual puede ser asignada a un peso o registro. Tales algoritmos también se conocen en la técnica y son similarmente aplicables para determinar la similitud o identidad de secuencia de nucleótido. Los parámetros para suficiente similitud para determinar el parentesco son computados con base en métodos bien conocidos para calcular similitud estadística, o la oportunidad de hallar un apareamiento similar en un polipéptido aleatorio, y la significancia del apareamiento determinado. Una comparación en computadora de dos o más secuencias puede, si se desea, también ser optimizada visualmente por aquellos expertos en la técnica. Productos o proteínas de genes relacionados pueden esperarse tengan una alta similitud, por ejemplo, 25% a 100% de identidad de secuencia. Proteínas que no están relacionadas pueden tener una identidad la cual es esencialmente la misma como podría esperarse ocurra por oportunidad, si una base de datos de tamaño suficiente es explorada (aproximadamente 5%). Secuencias entre 5% y 24% pueden o no pueden representar suficiente homología para concluir que las secuencias comparadas están relacionadas. Análisis estadístico adicional para determinar la significancia de tales apareamientos dando el tamaño de la serie de datos se puede llevar a cabo para determinar la relevancia de estas secuencias.

Parámetros ejemplares para determinar el parentesco de dos o más secuencias usando el algoritmo BLAST, por ejemplo, pueden ser como se expone abajo. Brevemente, los alineamientos de secuencia de aminoácido pueden ser realizados usando BLASTP versión 2.0.8 (Enero-05-1999) y los siguientes parámetros: Matriz: 0 BLOSUM62; apertura de hendidura: 11; extensión de hendidura: 1; x_dropoff: 50; esperado: 10.0; tamaño de palabra: 3; filtro: encendido. Los alineamientos de secuencia de ácido nucleico pueden ser realizados usando BLASTN versión 2.0.6 (Sept-16-1998) y los siguientes parámetros: Apareamiento: 1; desapareamiento: -2; apertura de hendidura: 5; extensión de hendidura: 2; x_dropoff: 50; esperado: 10.0; tamaño de palabra: 11; filtro: apagado. Aquellos expertos en la técnica sabrán que se pueden hacer modificaciones a los parámetros anteriores para ya sea incrementar o disminuir la

rigurosidad de la comparación, por ejemplo, y determinar el parentesco de dos o más secuencias.

En alguna modalidad, la presente invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que incluye un organismo microbiano que tiene una trayectoria de tolueno la cual incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de tolueno expresada en una cantidad suficiente para producir tolueno. La trayectoria de tolueno se selecciona de (A) 1) una o ambas de fenilalanina aminotransferasa y fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato descarboxilasa, y 3) fenilacetaldehído descarbonilasa; (B) 1) una o más de fenilalanina aminotransferasa y fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato descarboxilasa, 3) una o más de fenilacetaldehído deshidrogenasa y fenilacetaldehído oxidasa, y 4) fenilacetato descarboxilasa; y (C) una o más de fenilalanina aminotransferasa y fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato oxidasa, y 3) fenilacetato descarboxilasa, como se muestra en las trayectorias alternas en la Figura 1.

El organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene la trayectoria de tolueno puede incluir dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno, tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno, cuatro ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno, o cinco ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente ejemplar que tiene tres ácidos nucleicos exógenos puede incluir un organismo que tiene genes que codifican 1) fenilalanina aminotransferasa y/o oxidorreductasa (desaminación), 3) fenilpiruvato oxidasa, y 5) fenilacetato descarboxilasa. Un organismo que no se origina naturalmente ejemplar que tiene cuatro ácidos nucleicos exógenos puede incluir un organismo que tiene genes exógenos que codifican 1) fenilalanina aminotransferasa, 2) fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 3) fenilpiruvato descarboxilasa, y 4) fenilacetaldehído descarbonilasa. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente ejemplar que tiene cinco ácidos nucleicos exógenos puede incluir un organismo que tiene genes que codifican 1) fenilalanina aminotransferasa, 2) fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 3) fenilpiruvato descarboxilasa, 4) fenilacetaldehído deshidrogenasa y/u oxidasa, y 5) fenilacetato descarboxilasa. De este modo, en modalidades particulares, un organismo microbiano que no se

origina naturalmente puede tener una trayectoria de tolueno completa de cada gen que codifica cada enzima en una trayectoria de tolueno completa. En algunas modalidades el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de tolueno puede incluir al menos un ácido nucleico exógeno que es un ácido nucleico heterólogo. Finalmente, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de tolueno puede estar en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que incluye un organismo microbiano que tiene una trayectoria de benceno la cual incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de benceno expresada en una cantidad suficiente para producir benceno. La trayectoria de benceno puede incluir una fenilalanina benceno-liasa como se muestra en la Figura 2. Al menos un ácido nucleico exógeno puede ser fenilalanina benceno-liasa misma o un ácido nucleico que afecta la producción de su precursor fenilalanina. En algunas modalidades el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de benceno tiene al menos un ácido nucleico exógeno que es un ácido nucleico heterólogo. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de benceno está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que incluye un organismo microbiano que tiene una trayectoria de estireno la cual incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de estireno expresada en una cantidad suficiente para producir estireno. La trayectoria de estireno se puede seleccionar de (A) 1) benzoil-CoA acetiltransferasa, 2) una o más de 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA sintetasa, transferasa, e hidrolasa, 3) benzoil-acetato descarboxilasa, 4) acetofenona reductasa, y 5) 1-feniletanol deshidratasa; y (B) 1) benzoil-CoA acetiltransferasa, 2) fosfotrans-3-oxo-3-fenilpropionilasa, 3) benzoil-acetato cinasa, 4) benzoil-acetato descarboxilasa, 5) acetofenona reductasa, y 6) 1-feniletanol deshidratasa, como se indica por las trayectorias alternas en la Figura 3.

En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de estireno puede incluir dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno, tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la

trayectoria de estireno, cuatro ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno, cinco ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno, seis ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno, y así sucesivamente. Un organismo que no se origina naturalmente ejemplar que tiene cinco ácidos nucleicos exógenos puede incluir un organismo que tiene genes exógenos que codifican 1) benzoil-CoA acetiltransferasa, 2) uno de 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA sintetasa, transferasa, e hidrolasa, 3) benzoil-acetato descarboxilasa, 4) acetofenona reductasa, y 5) 1-feniletanol deshidratasa. Un organismo que no se origina naturalmente ejemplar que tiene seis ácidos nucleicos exógenos puede incluir un organismo que tiene genes exógenos que codifican 1) benzoil-CoA acetiltransferasa, 2) fosfotrans-3-oxo-3-fenilpropionilasa, 3) benzoil-acetato cinasa, 4) benzoil-acetato descarboxilasa, 5) acetofenona reductasa, y 6) 1-feniletanol deshidratasa. En algunas modalidades el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de estireno tiene al menos un ácido nucleico exógeno que es un ácido nucleico heterólogo. En algunas modalidades el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de estireno está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que incluye un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 1,3-butadieno la cual incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria de enzima 1,3-butadieno expresada en una cantidad suficiente para producir 1,3-butadieno. La trayectoria de 1,3-butadieno se puede seleccionar de (A) 1) *trans*, *trans*-muconato descarboxilasa y 2) *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (B) 1) *cis*, *trans*-muconato *cis*-descarboxilasa y 2) *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (C) 1) *cis*, *trans*-muconato *trans*-descarboxilasa 2) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; y (D) 1) *cis*, *cis*-muconato descarboxilasa y 2) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa, como se indica en las trayectorias alternas en la Figura 4.

En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 1,3-butadieno puede incluir dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 1,3-butadieno. De este modo, los dos ácidos nucleicos exógenos pueden codificar una serie seleccionada de (A) 1) *trans*, *trans*-muconato descarboxilasa y 2) *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (B) 1) *cis*, *trans*-muconato *cis*-descarboxilasa y 2)

trans-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (C) 1) *cis*, *trans*-muconato *trans*-descarboxilasa 2) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; y (D) 1) *cis*, *cis*-muconato descarboxilasa y 2) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa, que corresponden a las trayectorias completas mostradas en la Figura 4. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 1,3-butadieno tiene al menos un ácido nucleico exógeno que es un ácido nucleico heterólogo. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 1,3-butadieno está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad suficiente para producir 2,4-pentadienoato. La trayectoria de 2,4-pentadienoato tiene una serie de enzimas capaces de convertir AKP a 2,4-pentadienoato seleccionadas de (A) 1) una 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa, 2) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, 3) una 2-oxopentenoato reductasa, y 4) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa, como se muestra en las etapas A-D de la Figura 12, (B) 1) una desaminasa AKP, 2) una acetilacrilato reductasa, y 3) una 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, como se muestra en las etapas B-D de la Figura 13, (C) 1) una AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, 2) una 2,4-dioxopentanoato-2-reductasa, 3) una 2-hidroxi-4-oxopentanoato deshidratasa, 4) una acetilacrilato reductasa, y 5) una 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, como se muestra en las etapas E, H, F, C, y D de la Figura 13, (D) 1) una AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, 2) una 2,4-dioxopentanoato-4-reductasa, 3) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, 4) una 2-oxopentenoato reductasa, y 5) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa, como se muestra en las etapas E y K Figura 13, junto con las etapas B-D de la Figura 12, y (E) 1) una AKP reductasa, 2) una 2-amino-4-hidroxipentanoato aminotransferasa y/o deshidrogenasa, 3) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, 4) una 2-oxopentenoato reductasa, y 5) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa, también mostradas en las etapas J y L de la Figura 13, junto con las etapas B-D de la Figura 12. En algunas modalidades, las trayectorias de la Figura 13 que incluyen el intermediario 4-hidroxi-2-oxovalerato, mostrado en la Figura 12, también se pueden dirigir a través de las trayectorias de 2,4-dihidroxipentanoato mostradas en la Figura 12 para proporcionar 2,4-pentadienoato. Por ejemplo, de 4-hidroxi-2-oxovalerato, las trayectorias a 2,4-

pentadienoato pueden incluir las enzimas en las etapas E, H, y D o etapas E, F, y G, en la Figura 12.

En algunas modalidades, la presente invención también proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad suficiente para producir 2,4-pentadienoato. La trayectoria de 2,4-pentadienoato tiene una serie de enzimas seleccionadas de (A) 1) 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa, 2) 4-hidroxi-2-oxovalerato reductasa, 3) 2,4-dihidroxipentanoato 2-deshidratasa, y 4) 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, como se muestra en las etapas A, E, F, y G de la Figura 12 y (B) 1) 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa, 2) 4-hidroxi-2-oxovalerato reductasa, 3) 2,4-dihidroxipentanoato 4-deshidratasa y 4) 2-hidroxipentenoato deshidratasa, como se muestra en las etapas A, E, H, y D de la Figura 12.

En algunas modalidades, la presente invención también proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad suficiente para producir 2,4-pentadienoato. La trayectoria de 2,4-pentadienoato tiene una serie de enzimas seleccionadas de (A) 1) AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, 2) 2,4-dioxopentanoato 2-reductasa, 3) 2-hidroxi-4-oxopentanoato reductasa, 4) 2,4-dihidroxipentanoato 2-deshidratasa, y 5) 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, como se muestra en las etapas E, H, I, G, y D de la Figura 13, y (B) 1) AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, 2) 2,4-dioxopentanoato 2-reductasa, 3) 2-hidroxi-4-oxopentanoato reductasa, junto con 4) 2,4-dihidroxipentanoato-2-deshidratasa y 5) 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa o 4) 2,4-dihidroxipentanoato-4-deshidratasa y 5) 2-hidroxipentenoato deshidratasa, como se muestra en las etapas E, H, y I de la Figura 13, junto con las etapas F y G o H y D de la Figura 12, respectivamente. Es decir, la deshidratación doble de 2,4-dihidroxipentanoato se puede realizar en cualquier orden.

En algunas modalidades, la presente invención también proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de AKP que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria de enzima de AKP expresada en una cantidad suficiente para producir AKP. La trayectoria de AKP incluye una ornitina 4,5-aminomutasa y una 2,4-diaminopentanoato 4-aminotransferasa y/o 4-deshidrogenasa, como se muestra

en las etapas M y N de la Figura 13. En algunas modalidades, el organismo microbiano que tiene una trayectoria de AKP incluye dos enzimas exógenas que codifican una ornitina 4,5-aminomutasa y una 2,4-diaminopentanoato 4-aminotransferasa o 2,4-diaminopentanoato 4-deshidrogenasa. En algunas modalidades, esta trayectoria de AKP se puede agregar a cualquiera de las trayectorias de 2,4-pentadienoato mencionadas anteriormente y como se indica en la Figura 13. Alternativamente, AKP puede ser accesada de alanina por adición de una AKP tiolasa, como se muestra en la etapa A de la Figura 13, y alimentar en las varias trayectorias de 2,4-pentadienoato descritas en la presente y mostradas en la Figura 13, junto con Figura 12.

En algunas modalidades, la presente invención también proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad suficiente para producir 2,4-pentadienoato. La trayectoria de 2,4-pentadienoato tiene una serie de enzimas seleccionadas de (A) 1) ornitina 2,3-aminomutasa, 2) 3,5-diaminopentanoato desaminasa, y 3) 5-aminopent-2-enoato desaminasa, como se muestra en las etapas A-C de la Figura 14, (B) 1) ornitina 2,3-aminomutasa, 2) 3,5-diaminopentanoato desaminasa, 3) 5-aminopent-2-enoato aminotransferasa y/o deshidrogenasa, 4) 5-oxopent-2-enoato reductasa, y 5) 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, como se muestra en las etapas A, B, H, F, y G de la Figura 14, (C) 1) ornitina 2,3-aminomutasa, 2) 3,5-diaminopentanoato aminotransferasa y/o deshidrogenasa, 3) 3-amino-5-oxopentanoato desaminasa, 4) 5-oxopent-2-enoato reductasa, y 5) 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa como se muestra en las etapas A, D, E, F, y G de la Figura 14, y (D) 1) ornitina 2,3-aminomutasa, 2) 3,5-diaminopentanoato aminotransferasa y/o deshidrogenasa, 3) 3-amino-5-oxopentanoato reductasa, y 4) 3-amino-5-hidroxipentanoato desaminasa, y 5) 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa como se muestra en las etapas A, D, I, J, y G de la Figura 14.

En algunas modalidades, la presente invención también proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad suficiente para producir 2,4-pentadienoato. La trayectoria de 2,4-pentadienoato tiene una serie de enzimas seleccionadas de cualquiera de las numerosas trayectorias mostradas en la Figura 15 partiendo de 3-HP-CoA o

acriloil-CoA.

Trayectorias ejemplares de 3-HP-CoA incluyen las siguientes series de enzimas (A) 1) 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, 2) 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, 3) 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, 4) 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, y 5) pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, como se muestra en las etapas A-E de la Figura 15, y (B) 1) 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, 2) 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, 3) 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, 4) 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, y 5) 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, como se muestra en las etapas A, F, I, J, y Q de la Figura 15. Un experto en la técnica reconocerá que las series de enzimas que definen las trayectorias (A) y (B) de 3-HP-CoA pueden ser mezcladas vía enzimas reversibles 3,5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, como se muestra en la etapa G en la Figura 15, y 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, como se muestra en la etapa H en la Figura 15. De este modo, una trayectoria 3-HP-CoA a 2,4-pentadienoato puede incluir las enzimas en las etapas A, B, G, J, y Q, o etapas A, B, C, H, y Q, o etapas A, B, G, J, H, D, y E, o etapas A, F, I, G, C, D, y E, o etapas, A, F, I, G, C, H, y Q, o etapas A, F, I, J, H, D, y E, cada una mostrada en la Figura 15.

Trayectorias ejemplares de acriloil-CoA incluyen las siguientes series de enzimas (C) 1) acriloil-CoA acetiltransferasa, 2) 3-oxopent-4-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, 3) 3-oxopent-4-enoato reductasa, 4) 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa, como se muestra en las etapas M, O, P, y S en la Figura 15 y (D), 1) acriloil-CoA acetiltransferasa, 2) 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, 3) 3-hidroxipent-4-enoil-CoA deshidratasa, y 4) pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, como se muestra en las etapas M, N, R, y E. Un experto en la técnica reconocerá que las series de enzimas que definen las trayectorias (A) y (B) de 3-HP-CoA y (C) y (D) de acriloil-CoA pueden ser mezcladas vía enzimas reversibles 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, como se muestra en la etapa K de la Figura 15, y 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, como se muestra en la etapa L de la Figura 15. De este modo, la etapa K se puede agregar a cualquiera de las trayectorias enumeradas a partir de acriloil-CoA a 2,4-pentadienoato proporcionando trayectorias de 2,4-pentadienoato tales como etapas K, M, N, R, y E o etapas K, M, O, P, y S. La etapa K también puede ser usada como una alternativa de conexión a la etapa A para proporcionar 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA de 3-HP-CoA vía etapas K, M, y L. De este modo,

cualquiera de las trayectorias mencionadas anteriormente que utiliza la enzima de la etapa A puede utilizar las enzimas de las etapas K, M, y L, en su lugar. El mismo intermediario 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA puede ser accesado de acriloil-CoA por trayectorias vía las enzimas de las etapas K y A o M y L de la Figura 15. De este modo, acriloil-CoA se puede usar para acceder a todas las trayectorias enumeradas que podrían ser accesibles de 3-HP-CoA. De este modo, por ejemplo, una trayectoria de acriloil-CoA a 2,4-pentadienoato puede incluir enzimas de las etapas K, A, B, C, D, y E, o etapas K, A, F, I, J y Q, o etapas K, A, B, G, J, y Q, o etapas K, A, B, G, J, H, D, y E, o etapas K, A, B, C, H, y Q, o etapas K, A, F, I, G, C, D, y E, o etapas K, A, F, I, G, C, H, Q, o etapas K, A, F, I, J, H, D y E, o etapas M, L, B, C, D, y E, o etapas M, L, F, I, J y Q, o etapas M, L, B, G, J, y Q, o etapas M, L, B, G, J, H, D, y E, o etapas M, L, B, C, H, y Q, o etapas M, L, F, I, G, C, D, y E, o etapas M, L, F, I, G, C, H, Q, o etapas M, L, F, I, J, H, D y E, todas como se muestran en la Figura 15. De manera similar, 3-HP-CoA puede alimentarse en las trayectorias de acriloil-CoA enumeradas vía el intermediario 3-oxopent-4-enoil-CoA usando la enzima de la etapa L. De este modo, una trayectoria de 3-HP-CoA a 2,4-pentadienoato puede incluir enzimas de las etapas A, L, N, R, y E o etapas A, L, O, P, y S, cada trayectoria es mostrada en la Figura 15.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente, que incluye un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato la cual incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad suficiente para producir 2,4-pentadienoato. La trayectoria de 2,4-pentadienoato tiene una serie de enzimas seleccionadas de:

1) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

2) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

3) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

4) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

5) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

6) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

7) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

8) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

9) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E.

pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

10) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

11) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

12) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

13) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, N. 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, R. 3-hidroxipent-4-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

14) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, N. 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, T. 3-hidroxipent-4-enoil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, S. 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y

15) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, O. 3-oxopent-4-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, P. 3-oxopent-4-enoato reductasa, S. 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa;

16) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, N. 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, R. 3-hidroxipent-4-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

17) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, N. 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, T. 3-hidroxipent-4-enoil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, S. 3-hidroxipent-4-

enoato deshidratasa; y

18) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, O. 3-oxopent-4-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, P. 3-oxopent-4-enoato reductasa, S. 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa.

En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención incluye dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención que tiene al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención incluye además una 2,4-pentadieno descarboxilasa para convertir 2,4-pentadienoato a 1,3-butadieno.

En algunas modalidades, un organismo microbiano que no se origina naturalmente incluye un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 1,3-butadieno la cual incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria de enzima 1,3-butadieno expresada en una cantidad suficiente para producir 1,3-butadieno. La trayectoria de 1,3-butadieno tiene una serie de enzimas seleccionadas de:

1) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, N. 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, T. 3-hidroxipent-4-enoil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, Y. 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa;

2) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, O. 3-oxopent-4-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, P. 3-oxopent-4-enoato reductasa, Y. 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa;

3) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, M. acrilil-CoA acetiltransferasa, N. 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, T. 3-hidroxipent-4-enoil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, Y. 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa;

4) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, M. acrilil-CoA acetiltransferasa, O. 3-oxopent-4-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, P. 3-oxopent-4-enoato reductasa, Y. 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa;

5) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, N. 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, T. 3-hidroxipent-4-enoil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, Y. 3-hidroxipent-4-

enoato descarboxilasa;

6) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, O. 3-oxopent-4-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, P. 3-oxopent-4-enoato reductasa, Y. 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa;

En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención incluye dos, tres, cuatro, o cinco ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 1,3-butadieno. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención incluye al menos un ácido nucleico exógeno que es un ácido nucleico heterólogo. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente, que incluye un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 1,3-butadieno la cual incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de 3-buteno-1-ol expresada en una cantidad suficiente para producir 3-buteno-1-ol. La trayectoria de 3-buteno-1-ol tiene una serie de enzimas seleccionadas de:

1) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, U. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

2) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

3) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, U. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

4) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

5) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, V. 5-hidroxipent-2-

enoato descarboxilasa;

6) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, U. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

7) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

8) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, U. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

9) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

10) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

11) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, U. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

12) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

13) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, U. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

14) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

15) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

16) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, U. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

17) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

18) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, U. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

19) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

20) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención incluye dos, tres, cuatro, cinco, seis, o siete, ácidos nucleico exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 3-buteno-1-ol. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención tiene al menos un ácido nucleico exógeno que es un ácido nucleico heterólogo. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención incluye además una 3-buteno-1-ol

deshidratasa para convertir 3-buteno-1-ol a 1,3-butadieno.

En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención puede incluir dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención puede incluir tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato. Por ejemplo, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención puede incluir tres ácidos nucleicos exógenos que codifican i) una desaminasa AKP, ii) una acetilacrilato reductasa, y iii) una 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, de este modo proporcionando una trayectoria accesable de alanina u ornitina a 2,4-pentadienoato vía AKP. Un experto en la técnica reconocerá que esto es solamente ejemplar y que tres ácidos nucleicos exógenos pueden ser la base de cualquier organismo que no se origina naturalmente que produce 2,4-pentadienoato en cualquiera de las trayectorias enumeradas de la Figura 12-15.

En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención microbiano puede incluir cualesquiera cuatro ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato. Por ejemplo, un organismo microbiano que no se origina naturalmente puede incluir cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican i) una 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa, ii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iii) una 2-oxopentenoato reductasa, y iv) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa, de este modo definiendo una trayectoria completa de piruvato a 2,4-pentadienoato, como se muestra en la Figura 12. Un experto en la técnica reconocerá que esto es solamente ejemplar y que cuatro ácidos nucleicos exógenos pueden ser la base de cualquier organismo que no se origina naturalmente que produce 2,4-pentadienoato en cualquiera de las trayectorias enumeradas de la Figura 12-15.

En todavía modalidades adicionales, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención puede incluir cinco ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención ejemplar que tiene cinco ácidos nucleicos exógenos puede incluir enzimas que codifican (A) i) una AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, ii) una 2,4-dioxopentanoato-2-reductasa, iii) una 2-hidroxi-4-oxopentanoato deshidratasa, iv) una acetilacrilato reductasa, y v) una 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, como se muestra en las etapas E, H, F, C, y D en la Figura 13, o (B)

i) una AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, ii) una 2,4-dioxopentanoato-4-reductasa, iii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iv) una 2-oxopentenoato reductasa, y v) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa, como se muestra en las etapas E y K de la Figura 13, junto con las etapas B, C, y D de la Figura 12, o i) una AKP reductasa, ii) una 2-amino-4-hidroxipentanoato aminotransferasa y/o deshidrogenasa, iii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iv) una 2-oxopentenoato reductasa, y v) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa, como se muestra en las etapas J y L de la Figura 13, junto con las etapas B, C, y D de la Figura 12. Un experto en la técnica reconocerá que esto es solamente ejemplar y que cinco ácidos nucleicos exógenos pueden ser la base de cualquier organismo que no se origina naturalmente que produce 2,4-pentadienoato en cualquiera de las trayectorias enumeradas de la Figura 12-15. De este modo, en algunas modalidades dos, tres, cuatro, cinco, seis, hasta todas las enzimas en una trayectoria de 2,4-pentadienoato pueden ser inserción proporcionadas de ácidos nucleico exógenos. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención que tiene al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo. Sin embargo, en algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención se puede proporcionar en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención puede además incluir una 2,4-pentadienoato descarboxilasa expresada en una cantidad suficiente para producir 1,3-butadieno por conversión de 2,4-pentadienoato a 1,3-butadieno. De este modo, cualesquiera trayectorias de 2,4-pentadienoato de la Figura 12 pueden formar las bases de producción adicional de 1,3 butadieno, como se indica por la conversión de cis o trans 2,4-pentadienoato a 1,3-butadieno en la Figura 4.

En algunas modalidades, la invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno, en donde el organismo microbiano que no se origina naturalmente comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima o proteína que convierte un sustrato a un producto. Por ejemplo, en una trayectoria de tolueno (Figura 1), tal sustrato a producto se selecciona del grupo que consiste de fenilalanina a fenilpiruvato, fenilpiruvato a fenilacetaldehído, fenilpiruvato a fenilacetato, fenilacetaldehído a fenilacetato, fenilacetaldehído a tolueno, y

fenilacetato a tolueno. En una trayectoria de estireno (Figura 3), tal sustrato a producto se selecciona del grupo que consiste de benzoil-CoA a 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA, 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA a [(3-oxo-3-fenilpropionil)oxi] fosfonato, [(3-oxo-3-fenilpropionil)oxi] fosfonato a benzoil-acetato, 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA a benzoil-acetato, benzoil-acetato a acetofenona, acetofenona a 1-feniletanol, y 1-feniletanol a estireno. En una trayectoria de 1,3-butadieno (Figura 4), tal sustrato a producto se selecciona de *trans*, *trans*-muconato a *trans*-2,4-pentadienoato, *cis*, *trans*-muconato a *trans*-2,4-pentadienoato, *cis*,*trans*-muconato a *cis*-2,4-pentadienoato, *cis*,*cis*-muconato a *cis*-2,4-pentadienoato, *trans*-2,4-pentadienoato a 1,3-butadieno, y *cis*-2,4-pentadienoato a 1,3-butadieno. Un experto en la técnica entenderá que estos son solamente ejemplares y que cualesquiera de los pares de sustrato-producto descritos en la presente adecuados para producir un producto deseado y para los cuales una actividad apropiada está disponible para la conversión del sustrato al producto puede ser fácilmente determinada por un experto en la técnica con base en las enseñanzas de la presente.

En una trayectoria de 2,4-pentadienoato, tal sustrato a producto se selecciona de piruvato a 4-hidroxi-2-oxovalerato, 4-hidroxi-2-oxovalerato a 2-oxopentenoato, 2-oxopentenoato a 2-hidroxipentenoato, 2-hidroxipentenoato a 2,4-pentadienoato, AKP a acetilacrilato, acetilacrilato a 4-hidroxipent-2-enoato, 4-hidroxipent-2-enoato a 2,4-pentadienoato, AKP a 2,4-dioxopentanoato, 2,4-dioxopentanoato a 4-hidroxi-2-oxovalerato, AKP a 2-amino-4-hidroxipentanoato, 2-amino-4-hidroxipentanoato a 4-hidroxi-2-oxovalerato, ornitina a 2,4-diaminopentanoato, 2,4-diaminopentanoato a AKP, alanina a AKP, y así sucesivamente.

La invención también proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente, que comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato expresada en una cantidad suficiente para producir (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, la trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato que comprende 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato deshidratasa (véase Ejemplo III y Figura 5, la etapa C). Un organismo microbiano que no se origina naturalmente que comprende una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato puede comprender además 1-desoxixilulosa-5-fosfato sintasa o 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (véase Ejemplo III y Figura 5,

etapas A y B). De este modo, a (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato puede comprender 5 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato deshidratasa, 1-desoxixilulosa-5-fosfato sintasa y 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa.

La invención también proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente, que comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de *p*-toluato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria *p*-toluato expresada en una cantidad suficiente para producir *p*-toluato, la trayectoria de *p*-toluato comprende 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa; 3-deshidroquinato sintasa; 3-deshidroquinato deshidratasa; shikimato deshidrogenasa; shikimato cinasa; 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa; corismato sintasa; o corismato liasa (véase Ejemplo IV y Figura 6, etapas A-H). Un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de *p*-toluato puede comprender además una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato (Figura 5). Una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato puede comprender, por ejemplo, 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato deshidratasa, 1-desoxixilulosa-5-fosfato sintasa o 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (Figura 5).

La invención adicionalmente proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente, que comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de tereftalato comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de tereftalato expresada en una cantidad suficiente para producir tereftalato, la trayectoria de tereftalato comprende *p*-toluato metil-monooxigenasa reductasa; deshidrogenasa de alcohol 4-carboxibencílico; o deshidrogenasa de 4-carboxibencil aldehído (véase Ejemplo V y Figura 7). Tal organismo que contiene una trayectoria de tereftalato puede comprender adicionalmente una trayectoria de *p*-toluato, en donde la trayectoria de *p*-toluato comprende 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa; 3-deshidroquinato sintasa; 3-deshidroquinato deshidratasa; shikimato deshidrogenasa; shikimato cinasa; 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa; corismato sintasa; o corismato liasa (véase Ejemplos IV y V y Figuras 6 y 7). Tal organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de tereftalato y una trayectoria de *p*-toluato puede comprender además una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato (véase Ejemplo III y Figura 5). Una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato puede comprender, por ejemplo, 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato deshidratasa, 1-desoxixilulosa-5-fosfato sintasa o 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (véase Ejemplo III y

Figura 5).

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de tolueno que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de tolueno expresada en una cantidad suficiente para producir tolueno. La trayectoria de tolueno se selecciona de una serie de enzimas de las trayectorias seleccionadas de: a) *p*-toluato descarboxilasa; b) *p*-toluato reductasa y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa; c) *p*-toluato cinasa, (*p*-metilbenzoiloxi)fosfonato reductasa, y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa; d) (*p*-metilbenzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), fosfotrans-*p*-metilbenzoilasa, (*p*-metilbenzoiloxi)fosfonato reductasa, y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa; y e) (*p*-metilbenzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), *p*-metilbenzoil-CoA reductasa y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato expresada en una cantidad suficiente para producir (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato. La trayectoria de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato incluye eritrosa-4-fosfato deshidratasa y (2,4-dioxobutoxi) fosfonato reductasa.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de benzoato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de benzoato expresada en una cantidad suficiente para producir benzoato. La trayectoria de benzoato incluye 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa; 3-deshidroquinato sintasa; 3-deshidroquinato deshidratasa; shikimato deshidrogenasa; shikimato cinasa; 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa; corismato sintasa; y corismato liasa.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de benceno que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de benceno expresada en una cantidad suficiente para producir benceno. La trayectoria de benceno se selecciona de una serie de enzimas de las trayectorias seleccionadas de: a) benzoato descarboxilasa; b) benzoato reductasa y benzaldehído descarbonilasa; c) benzoato cinasa, (benzoiloxi)fosfonato reductasa, y benzaldehído descarbonilasa; d) (benzoil-CoA

sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), fosfotransbenzoilasa, (benzoiloxi)fosfonato reductasa, y benzaldehído descarbonilasa; y e) (benzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), benzoil-CoA reductasa y benzaldehído descarbonilasa.

En una modalidad adicional, la invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, *p-toluato*, tereftalato, tolueno, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, o benceno, en donde el organismo microbiano que no se origina naturalmente comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima o proteína que convierte un sustrato a un producto. Por ejemplo, en una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, los sustratos y productos se pueden seleccionar del grupo que consiste de gliceraldehído-3-fosfato y piruvato a 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato; 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato a C-metil-D-eritritol-4-fosfato; y C-metil-D-eritritol-4-fosfato a (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato (véase Ejemplo III y Figura 5). En otra modalidad, una trayectoria de *p*-toluato puede comprender sustratos y productos seleccionados de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato a 2,4-dihidroxi-5-metil-6-[(fosfonooxi)metil]oxan-2-carboxilato; 2,4-dihidroxi-5-metil-6-[(fosfonooxi)metil]oxan-2-carboxilato a 1,3-dihidroxi-4-metil-5-oxociclohexan-1-carboxilato; 1,3-dihidroxi-4-metil-5-oxociclohexan-1-carboxilato a ácido 5-hidroxi-4-metil-3-oxociclohex-1-eno-1-carboxílico; ácido 5-hidroxi-4-metil-3-oxociclohex-1-eno-1-carboxílico a 3,5-dihidroxi-4-metilciclohex-1-eno-1-carboxilato; 3,5-dihidroxi-4-metilciclohex-1-eno-1-carboxilato a 5-hidroxi-4-metil-3-(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato; 5-hidroxi-4-metil-3-(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato a 5-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]-4-metil-3-(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato; 5-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]-4-metil-3-(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato a 3-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]-4-metilciclohexa-1,5-dieno-1-carboxilato; y 3-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]-4-metilciclohexa-1,5-dieno-1-carboxilato a *p*-toluato (véase Ejemplo IV y Figura 6). En todavía otra modalidad, una trayectoria de tereftalato puede comprender sustratos y productos seleccionados de *p*-toluato a alcohol 4-carboxibencílico; alcohol 4-carboxibencílico a 4-carboxibenzaldehído; y 4-carboxibenzaldehído a y ácido tereftálico (véase Ejemplo V y Figura 7). En otra modalidad, una trayectoria de tolueno puede comprender sustratos y productos seleccionados de *p*-toluato a tolueno; *p*-toluato a *p*-metil benzoil-CoA; *p*-metil benzoil-CoA a *p*-metilbenzoiloxi fosfato o *p*-metilbenzaldehído; *p*-metilbenzoiloxi fosfonato a *p*-metilbenzaldehído; y *p*-metilbenzaldehído a tolueno (véase Ejemplo VII y Figura 11). En otra modalidad, una trayectoria de 2H4OP puede comprender

sustratos y productos seleccionados de eritrosa-4-fosfato a (2,4-dioxobutoxi)fosfonato; y (2,4-dioxobutoxi)fosfonato a 2H4OP (véase Ejemplo VI y Figura 8). En otra modalidad, una trayectoria de benzoato puede comprender sustratos y productos seleccionados de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato a 2,4-dihidroxi-6-[(fosfonooxi)metil]oxan-2-carboxilato; 2,4-dihidroxi-6-[(fosfonooxi)metil]oxan-2-carboxilato a 1,3-dihidroxi-5-oxociclohexan-1-carboxilato; 1,3-dihidroxi-5-oxociclohexan-1-carboxilato a 5-hidroxi-3-oxociclohex-1-eno-1-carboxilato; 5-hidroxi-3-oxociclohex-1-eno-1-carboxilato a 3,5-dihidroxiciclohex-1-eno-1-carboxilato, 3,5-dihidroxiciclohex-1-eno-1-carboxilato a 5-hidroxi-3-(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato; 5-hidroxi-3-(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato a 5-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]-3-(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato; 5-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]-3-(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato a 3-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]ciclohexa-1,5-dieno-1-carboxilato; y 3-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]ciclohexa-1,5-dieno-1-carboxilato a benzoato (véase Ejemplo VI y Figura 9). En otra modalidad, una trayectoria de benceno puede comprender sustratos y productos seleccionados de benzoato a benceno; benzoato a benzoil-CoA, (benzoiloxi)fosfonato o benzaldehído; benzoil-CoA a (benzoiloxi)fosfonato o benzaldehído; (benzoiloxi)fosfonato a benzaldehído; y benzaldehído a benceno. Un experto en la técnica entenderá que estos son solamente ejemplares y que cualesquiera de los pares de sustrato-producto descritos en la presente adecuados para producir un producto deseado y para los cuales una actividad apropiada está disponible para la conversión del sustrato al producto puede ser fácilmente determinada por un experto en la técnica con base en las enseñanzas de la presente.

Como se describe en la presente, una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato se ejemplifica en la Figura 5 (véase Ejemplo III). Por lo tanto, además de un organismo microbiano que contiene una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato que produce (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, la invención adicionalmente proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, donde el organismo microbiano produce un intermediario de la trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, por ejemplo, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato o C-metil-D-eritritol-4-fosfato. De manera similar, la invención también proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que contiene una trayectoria de *p*-toluato que produce *p*-toluato, en donde el

organismo microbiano que no se origina naturalmente comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de *p*-toluato, donde el organismo microbiano produce un intermediario de la trayectoria de *p*-toluato, por ejemplo, 2,4-dihidroxi-5-metil-6-[(fosfonooxi)metil]oxan-2-carboxilato, 1,3-dihidroxi-4-metil-5-oxociclohexan-1-carboxilato, 5-hidroxi-4-metil-3-oxociclohex-1-eno-1-carboxilato, 3,5-dihidroxi-4-metilciclohex-1-eno-1-carboxilato, 5-hidroxi-4-metil-3-(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato, 5-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]-4-metil-3-(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato, o 3-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]-4-metilciclohexa-1,5-dieno-1-carboxilato. Además, la invención adicionalmente proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que contiene una enzima de la trayectoria de tereftalato, donde el organismo microbiano produce una intermediario de la trayectoria de tereftalato, por ejemplo, alcohol 4-carboxibencílico o 4-carboxibenzaldehído.

De manera similar, la invención también proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que contiene una trayectoria de tolueno que produce tolueno, en donde el organismo microbiano que no se origina naturalmente comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de tolueno, donde el organismo microbiano produce un intermediario de la trayectoria de tolueno, por ejemplo, *p*-metilbenzoil-CoA, (*p*-metilbenzoiloxi)fosfonato, o *p*-metilbenzaldehído.

De manera similar, la invención también proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que contiene una trayectoria de benceno que produce benceno, en donde el organismo microbiano que no se origina naturalmente comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de benceno, donde el organismo microbiano produce una intermediario de la trayectoria de benceno, por ejemplo, benzoil-CoA, (benzoiloxi)fosfonato, y benzaldehído (Figura 10).

De manera similar, la invención también proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que contiene una trayectoria de benzoato que produce benzoato, en donde el organismo microbiano que no se origina naturalmente comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de benzoato, donde el organismo microbiano produce un intermediario de la trayectoria de benzoato, por ejemplo, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, 2,4-dihidroxi-6-[(fosfonooxi)metil]oxan-2-carboxilato, 1,3-dihidroxi-5-oxociclohexan-1-carboxilato, 5-hidroxi-3-oxociclohex-1-eno-1-carboxilato, 3,5-dihidroxiciclohex-1-eno-1-carboxilato, 5-hidroxi-3-

(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato, 5-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]-3-(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato, y 3-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]ciclohexa-1,5-dieno-1-carboxilato (Figura 9).

De este modo, la invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que contiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima o proteína, donde la enzima o proteína convierte los sustratos y productos de una trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno, tal como aquellas mostrados en la Figuras 1-11.

Mientras se describe en general en la presente como un organismo microbiano que contiene una trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno, se entiende que la invención adicionalmente proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno expresada en una cantidad suficiente para producir un intermediario de una trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. Por ejemplo, como se describe en la presente, las trayectorias de tolueno, benceno, estireno y 1,3-butadieno son ejemplificadas en la Figuras 1-23. Por lo tanto, además de un organismo microbiano que contiene una trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno que produce tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno, la invención adicionalmente proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno, donde el organismo microbiano

produce un intermediario de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno, por ejemplo, fenilpiruvato, fenilacetaldehído, fenilacetato, 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA, [(3-oxo-3-fenilpropionil)oxi] fosfonato, benzoil-acetato, acetofenona, 1-feniletanol, DXP, 2ME4P, benzoil-CoA, (benzoiloxi)fosfonato, benzaldehído, *trans*-2,4-pentadienoato, y *cis*-2,4-pentadienoato, así como también cualesquiera intermediario de la trayectoria de shikimato mostrado en la Figuras 6 y 9.

Se entiende que cualesquiera de las trayectorias descritas en la presente, como se describe en los Ejemplos y ejemplifica en las Figuras, que incluyen las trayectorias de la Figuras 1-11, pueden ser utilizados para generar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que produce cualesquiera intermediario de la trayectoria o producto, como se desee. Como se describe en la presente, tal organismo microbiano que produce un intermediario se puede usar en combinación con otro organismo microbiano que expresa corriente abajo enzimas de la trayectoria para producir un producto deseado. Sin embargo, se entiende que un organismo microbiano que no se origina naturalmente que produce un intermediario de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno se puede utilizar para producir el intermediario como un producto deseado.

La invención se describe en la presente con referencia general a la reacción metabólica, reactivo o producto del mismo, o con referencia específica a uno o más ácidos nucleicos o genes que codifican una enzima asociada con o catalizante, o una proteína asociada con, la reacción, reactivo o producto metabólico referenciado. A menos que se declare expresamente de otro modo en la presente, aquellos expertos en la técnica entenderán que la referencia a una reacción también constituye la referencia a los reactivos y productos de la reacción. De manera similar, a menos que de otro modo se declare expresamente en la presente, la referencia a un reactivo o producto también hace referencia a la reacción, y la referencia a cualesquiera de estos constituyentes metabólicos también hace referencia al gen o genes que codifican las enzimas que catalizan o proteínas involucradas en la reacción, reactivo o producto referenciado. Del mismo modo, dado los campos bien conocidos de bioquímica metabólica, enzimología y

genómicos, la referencia en la presente a un gen o ácido nucleico codificante también constituye una referencia a la enzima codificada correspondiente y la reacción se cataliza o una proteína asociada con la reacción así como también los reactivos y productos de la reacción.

Los organismos microbianos que no se originan naturalmente de la invención se pueden producir introduciendo ácidos nucleicos expresables que codifican una o más de las enzimas o proteínas que participan en una o más trayectorias biosintéticas de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. Dependiendo del organismo microbiano hospedero elegido para la biosíntesis, ácidos nucleicos de algunas o todas las trayectorias biosintéticas particulares de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno, pueden ser expresados. Por ejemplo, si un hospedero elegido es deficiente en una o más enzimas o proteínas para una trayectoria biosintética deseada, entonces los ácidos nucleicos que se expresan para la(s) enzima(s) deficiente(s) o proteína(s) se introducen en el hospedero para supresión exógena subsecuente. Alternativamente, si el hospedero elegido exhibe expresión endógena de algunos genes de la trayectoria, pero es deficiente en otros, entonces un ácido nucleico codificante es necesario para las enzimas o proteínas deficientes para lograr la biosíntesis de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. De este modo, un organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención puede ser producido introduciendo enzimas exógenas o actividades de proteína para obtener una trayectoria biosintética deseada o una trayectoria biosintética deseada se puede obtener introduciendo una o más enzimas exógenas o actividades de proteína que, junto con una o más enzimas o proteínas endógenas, produce un producto deseado tal como tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno.

Los organismos microbianos hospederos se pueden seleccionar de, y los organismos microbianos que no se originan naturalmente generar en, por ejemplo, bacterias, levaduras, hongos, o cualesquiera de una variedad de otros microorganismos aplicables a los procesos de fermentación. Las bacterias

ejemplares incluyen especies seleccionadas de *Escherichia coli, Klebsiella oxytoca, Anaerobiospirillum succiniciproducens, Actinobacillus succinogenes, Mannheimia succiniciproducens, Rhizobium etli, Bacillus subtilis, Corynebacterium glutamicum, Gluconobacter oxidans, Zymomonas mobilis, Lactococcus lactis, Lactobacillus plantarum, Streptomyces coelicolor, Clostridium acetobutilicum, Pseudomonas fluorescens*, y *Pseudomonas putida*. Levaduras u hongos ejemplares incluyen especies seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces marxianus, Aspergillus terreus, Aspergillus niger, Pichia pastoris, Rhizopus arrhizus, Rhizobus oryzae*, y similares. *E. coli* es un organismo hospedero particularmente útil puesto que es un organismo microbiano bien caracterizado adecuado para ingeniería genética. Otros organismos hospederos particularmente útiles incluyen levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*. Se entiende que cualesquiera organismo hospedero microbiano adecuado puede ser usado para introducir modificaciones metabólicas y/o genéticas para producir un producto deseado.

Dependiendo de los constituyentes de la trayectoria biosintética de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno de un organismo microbiano hospedero seleccionado, los organismos microbianos que no se originan naturalmente de la invención incluirán al menos un ácido nucleico que codifica la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butandieno exógenamente expresado y hasta todos los ácidos nucleicos que codifican para una o más trayectorias biosintéticas de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. Por ejemplo, la biosíntesis de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno se puede establecer en un hospedero deficiente en una enzima proteína de la trayectoria a través de la expresión exógena del ácido nucleico codificante correspondiente. En un hospedero deficiente en todas las enzimas o proteínas de una trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno, la expresión exógena de todas las enzimas o proteínas en la

trayectoria pueden ser incluidas, aunque se entiende que todas las enzimas o proteínas de una trayectoria pueden ser expresadas aún si el hospedero contiene al menos una de las trayectorias de enzimas o proteínas. Por ejemplo, la expresión exógena de todas las enzimas o proteínas en una trayectoria para la producción de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno puede ser incluida, tal como fenilalanina aminotransferasa y/o fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), fenilpiruvato descarboxilasa, fenilacetaldehído deshidrogenasa y/u oxidasa, fenilpiruvato oxidasa, fenilacetato descarboxilasa, fenilacetaldehído descarbonilasa, fenilalanina benceno-liasa, benzoil-CoA acetiltransferasa, 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, benzoil-acetato descarboxilasa, acetofenona reductasa, 1-feniletanol deshidratasa, fosfotrans-3-oxo-3-fenilpropionilasa, benzoil-acetato cinasa, *trans*, *trans*-muconato descarboxilasa, *cis*, *trans*-muconato *cis*-descarboxilasa, *cis*, *trans*-muconato *trans*-descarboxilasa, *cis*, *cis*-muconato descarboxilasa, *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa, y *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa.

Por ejemplo, todas las enzimas en una trayectoria de *p*-toluato pueden ser incluidas, tales como 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa; 3-deshidroquinato sintasa; 3-deshidroquinato deshidratasa; shikimato deshidrogenasa; shikimato cinasa; 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa; corismato sintasa; y corismato liasa. Además, todas las enzimas en una trayectoria de tereftalato pueden ser incluidas, tales como *p*-toluato metil-monooxigenasa reductasa; deshidrogenasa de alcohol 4-carboxibencílico; y deshidrogenasa de 4-carboxibencil aldehído. Además, todas las enzimas en una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato pueden ser incluidas, tales como 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato deshidratasa, 1-desoxixilulosa-5-fosfato sintasa y 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa. Del mismo modo, todas las enzimas en una trayectoria de tolueno pueden ser incluidas, tales como *p*-metilbenzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, *p*-toluato reductasa, *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa, *p*-metilbenzoil-CoA reductasa, *p*-toluato descarboxilasa, fosfotrans-*p*-metilbenzoilasa, (*p*-metilbenzoiloxi)fosfonato reductasa (desfosforilación), y *p*-toluato cinasa.

Del mismo modo, todas las enzimas en una trayectoria de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato pueden ser incluidas, tales como eritrosa-4-fosfato deshidratasa y (2,4-dioxobutoxi)fosfonato reductasa.

Del mismo modo, todas las enzimas en una trayectoria de benzoato pueden ser incluidas, tales como 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa, 3-deshidroquinato sintasa, 3-deshidroquinato deshidratasa, shikimato deshidrogenasa, shikimato cinasa, 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa, corismato sintasa, y corismato liasa.

Del mismo modo, todas las enzimas en una trayectoria de benceno pueden ser incluidas, tales como benzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, benzoato reductasa, benzaldehído descarbonilasa, benzoil-CoA reductasa, benzoato descarboxilasa, fosfotransbenzoilasa, (benzoiloxi)fosfonato reductasa (desfosforilación), y benzoato cinasa.

Dadas las enseñanzas y guías proporcionadas en la presente, aquellos expertos en la técnica entenderán que el número de ácidos nucleicos codificantes para introducir en una forma expresable serán, al menos, paralelos a las deficiencias de la trayectoria del tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno del organismo microbiano hospedero seleccionado. Por lo tanto, un organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención puede tener uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, es decir, hasta todos los ácidos nucleicos que codifican las enzimas o proteínas que constituyen una trayectoria biosintética de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno descrita en la presente. En algunas modalidades, los organismos microbianos que no se originan naturalmente también pueden incluir otras modificaciones genéticas que facilitan u optimizan la biosíntesis de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno o que confieren otras funciones útiles sobre el organismo microbiano hospedero. Una de tales otras funcionalidades puede incluir, por ejemplo, aumento de la síntesis de uno o más de los precursores de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno tales como fenilalanina, fenilpiruvato, fenilacetaldehído, fenilacetato, benzoil-CoA, 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA, [(3-oxo-3-fenilpropionil)oxi]fosfonato, benzoil acetato, acetofenona, 1-feniletanol, *trans,trans*-muconato, *cis,trans*-muconato, *cis,cis*-muconato, *trans*-2,4-pentadienoato, *cis*-2,4-pentadienoato, 4-

hidroxi-2-oxovalerato, 2-oxopentenoato, 2-hidroxipentenoato, 2,4-dihidroxipentanoato, 4-hidroxipent-2-enoato, 2,4-diaminopentanoato, AKP, acetilacrilato, 2,4-dioxopentanoato, 2-hidroxi-4-oxo-pentanoato, 2-amino-4-hidroxipentanoato, 3,5-diaminopentanoato, 5-aminopent-2-enoato, 3-amino-5-oxopentanoato, 5-oxopent-2-enoato, 5-hidroxipent-2-enoato, 3-amino-5-hidroxipentanoato, 3-HP-CoA, acriloil-CoA, 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA, 3-oxo-5-hidroxipentanoato, 3,5-dihidroxipentanoato, 3,5-dihidroxipentanoil-CoA, 5-hidroxipent-2-enoil-CoA, 2,4-pentadienoil-CoA, 3-oxopent-4-enoil-CoA, 3-hidroxipent-4-enoil-CoA, 3-oxopent-4-enoato, y 3-hidroxipent-4-enoato gliceraldehído-3-fosfato, piruvato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato o p-toluato. Además, como se describe en la presente, trayectorias múltiples pueden ser incluidas en un organismo único tales como la trayectoria para producir *p*-toluato (Figura 6), tereftalato (Figura 7) tolueno (Figura 11) y (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato (Figura 5), como se desee, o 2H4OP (Figura 8), benzoato (Figura 9) y benceno (Figura 10).

En general, un organismo microbiano hospedero se selecciona de manera que produce el precursor de una trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno, ya sea como una molécula que se produce naturalmente o como un producto diseñado por ingeniería que ya sea proporciona producción *de novo* de un precursor deseado o producción incrementada de un precursor naturalmente producido por el organismo microbiano hospedero. Por ejemplo, *cis,cis*-muconato se produce naturalmente en un organismo hospedero tal como *E. coli*. Como un ejemplo adicional, gliceraldehído-3-fosfato y fosfoenolpiruvato son producidos naturalmente en un organismo hospedero tal como *E. coli*. Un organismo hospedero puede ser diseñado por ingeniería para incrementar la producción de un precursor, como se describe en la presente. Además, un organismo microbiano que ha sido diseñado por ingeniería para producir un precursor deseado se puede usar como un organismo hospedero y además diseñado por ingeniería para expresar enzimas o proteínas de una trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno.

En algunas modalidades, un organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención se genera de un hospedero que contiene la

capacidad enzimática para sintetizar tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. En esta modalidad específica puede ser útil incrementar la síntesis o acumulación de un producto de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno a, por ejemplo, llevar reacciones de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno hacia la producción de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. La síntesis incrementada o acumulación puede ser realizada mediante, por ejemplo, sobre expresión de ácidos nucleicos que codifican una o más enzimas o proteínas de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno mencionadas anteriormente. La sobre expresión de la enzima o enzimas y/o proteína o proteínas de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno puede ocurrir, por ejemplo, a través de la expresión exógena del gen o genes endógenos, o a través de la expresión exógena del gen o genes heterólogos. Por lo tanto, los organismos que se originan naturalmente pueden ser fácilmente generados para ser los organismos microbianos que no se originan naturalmente de la invención, por ejemplo, produciendo tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno, a través de la sobreexpresión de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, es decir, hasta todos los ácidos nucleicos que codifican enzimas o proteínas de la trayectoria biosintética de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. Además, un organismo que no se origina naturalmente puede ser generado por mutagénesis de un gen endógeno que resulta en un incremento en actividad de una enzima en la trayectoria biosintética de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-

oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno.

En modalidades particularmente útiles, se emplea la expresión exógena de los ácidos nucleicos codificantes. La expresión exógena confiere la capacidad para ajustar habitualmente la expresión y/o elementos reguladores al hospedero y aplicación para lograr un nivel de expresión deseado que es controlado por el usuario. Sin embargo, la expresión endógena también se puede utilizar en otras modalidades tales como removiendo un efector regulador negativo o inducción del promotor del gen cuando se liga a un promotor inducible u otro elemento regulador. De este modo, un gen endógeno que tiene un promotor inducible que se origina naturalmente puede ser regulado ascendentemente proporcionando el agente inductor apropiado, o la región reguladora de un gen endógeno puede ser diseñada por ingeniería para incorporar un elemento regulador inducible, de este modo permitiendo la regulación de la expresión incrementada de un gen endógeno en un tiempo deseado. De manera similar, un promotor inducible puede ser incluido como un elemento regulador para un gen exógeno introducido en un organismo microbiano que no se origina naturalmente.

Se entiende que, en métodos de la invención, cualesquiera de uno o more ácidos nucleico exógenos pueden ser introducidos en un organismo microbiano para producir un organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención. Los ácidos nucleicos pueden ser introducidos para así conferir, por ejemplo, una trayectoria biosintética de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno sobre el organismo microbiano. Alternativamente, ácidos nucleicos codificantes pueden ser introducidos para producir un organismo microbiano intermediario que tiene la capacidad biosintética para catalizar algunas de las reacciones requeridas para conferir capacidad biosintética de tolueno, benceno, *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. Por ejemplo, un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria biosintética de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno puede comprender al menos dos ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas o proteínas deseadas, tales como la combinación de fenilalanina aminotransferasa y/o fenilalanina

oxidorreductasa (desaminación) y fenilpiruvato descarboxilasa, fenilalanina aminotransferasa y/o fenilalanina oxidorreductasa (desaminación) y fenilacetaldehído deshidrogenasa y/u oxidasa, fenilalanina aminotransferasa y/o fenilalanina oxidorreductasa (desaminación) y fenilpiruvato oxidasa, fenilpiruvato oxidasa y fenilacetato descarboxilasa, fenilalanina aminotransferasa y/o fenilalanina oxidorreductasa (desaminación) y fenilacetato descarboxilasa, fenilalanina aminotransferasa y/o fenilalanina oxidorreductasa (desaminación) y fenilacetaldehído descarbonilasa, fenilpiruvato descarboxilasa y fenilacetaldehído deshidrogenasa, fenilpiruvato descarboxilasa y fenilacetato descarboxilasa, fenilpiruvato descarboxilasa y fenilacetaldehído descarbonilasa, y fenilacetaldehído deshidrogenasa y/u oxidasa y fenilacetato descarboxilasa, en una trayectoria de tolueno. De manera similar, en una trayectoria de estireno la combinación de al menos dos ácidos nucleicos exógenos puede incluir benzoil-CoA acetiltransferasa y 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA sintetasa, benzoil-CoA acetiltransferasa y benzoil-acetato descarboxilasa, benzoil-CoA acetiltransferasa y acetofenona reductasa, benzoil-CoA acetiltransferasa y 1-feniletanol deshidratasa, benzoil-CoA acetiltransferasa y fosfotrans-3-oxo-3-fenilpropionilasa, benzoil-CoA acetiltransferasa y benzoil-acetato cinasa, 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA sintetasa y benzoil-acetato descarboxilasa, 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA sintetasa y acetofenona reductasa, 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA sintetasa y 1-feniletanol deshidratasa, y así sucesivamente.

De manera similar, en una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, una combinación de las enzimas expresadas puede ser una combinación de 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato deshidratasa y 1-desoxixilulosa-5-fosfato sintasa, o 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato deshidratasa y 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa. En una trayectoria de *p*-toluato, una combinación de las enzimas expresadas puede ser una combinación de 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa y 3-deshidroquinato deshidratasa; shikimato cinasa y 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa; shikimato cinasa y shikimato deshidrogenasa and, y similares. De manera similar, en una trayectoria de tereftalato, una combinación de las enzimas expresadas puede ser *p*-toluato metil-monooxigenasa reductasa y deshidrogenasa de alcohol 4-carboxibencílico; o deshidrogenasa de alcohol 4-carboxibencílico y deshidrogenasa de 4-carboxibencil aldehído, y similares. De este modo, se entiende que cualesquiera combinación de dos o más enzimas o proteínas de una trayectoria biosintética puede ser incluida en un organismo microbiano que no se origina naturalmente de

la invención.

De manera similar, se entiende que cualesquiera combinación de tres o más enzimas o proteínas de una trayectoria biosintética puede ser incluida en un organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención, y así sucesivamente, como se desee, tan pronto como la combinación de enzimas y/o proteínas de la trayectoria biosintética deseada resulte en producción del producto deseado correspondiente. Tal combinación de tres enzimas puede incluir, por ejemplo, 3-deshidroquinato sintasa, shikimato deshidrogenasa y shikimato cinasa; shikimato cinasa, corismato sintasa y corismato liasa; 3-deshidroquinato deshidratasa, corismato sintasa y corismato liasa, y así sucesivamente, como se desee, tan pronto como la combinación de enzimas y/o proteínas de la trayectoria biosintética deseada resulte en producción del producto deseado correspondiente.

De manera similar, cualesquiera combinación de cuatro, cinco, seis, o más enzimas o proteínas de una trayectoria biosintética como se describe en la presente puede ser incluida en un organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención, como se desee, tan pronto como la combinación de enzimas y/o proteínas de la trayectoria biosintética deseada resulte en producción del producto deseado correspondiente.

Además de la biosíntesis de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno como se describe en la presente, los organismos microbianos que no se originan naturalmente y métodos de la invención también se pueden utilizar en varias combinaciones con cada uno de los otros y con otros organismos microbianos y métodos bien conocidos en la técnica para lograr biosíntesis del producto por otras rutas. Por ejemplo, una alternativa para producir tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno distinto del uso de los productores de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno es a través de la adición de otro organismo microbiano capaz de convertir un intermediario de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno a tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-

oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. Uno de tal procedimiento incluye, por ejemplo, la fermentación de un organismo microbiano que produce un intermediario de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. El intermediario de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno puede entonces ser usado como un sustrato para un segundo organismo microbiano que convierte el intermediario de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno a tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. El intermediario de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno puede ser agregado directamente a otro cultivo del segundo organismo o el cultivo original del productores intermediarios de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno puede ser agotado de estos organismos microbianos mediante, por ejemplo, separación celular, y después subsecuente adición del segundo organismo al caldo de fermentación se puede utilizar para producir el producto final sin etapas de purificación intermedias.

En otras modalidades, los organismos microbianos que no se originan naturalmente y métodos de la invención pueden ser ensamblados en una amplia variedad de subtrayectorias para lograr la biosíntesis de, por ejemplo, tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. En estas modalidades, las trayectorias biosintéticas para un producto deseado de la invención pueden ser segregadas en diferentes organismos microbianos, y los diferentes organismos microbianos pueden ser co-cultivados para producir el producto final. En tal esquema biosintético, el producto de un organismo microbiano en el sustrato para un segundo organismo microbiano

hasta que el producto final es sintetizado. Por ejemplo, la biosíntesis de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno puede ser realizada construyendo un organismo microbiano que contiene trayectorias biosintéticas para conversión de un intermediario de la trayectoria a otro intermediario de la trayectoria o el producto. Alternativamente, tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno también pueden ser biosintéticamente producidos de organismos microbianos a través del co-cultivo o co-fermentación usando dos organismos en el mismo recipiente, donde el primer organismo microbiano produce un intermediario de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno y el segundo organismo microbiano convierte el intermediario a tolueno, benceno, *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno.

Dadas las enseñanzas y guías proporcionadas en la presente, aquellos expertos en la técnica entenderán que existe una amplia variedad de combinaciones y permutaciones para los organismos microbianos que no se originan naturalmente y métodos de la invención junto con otros microorganismos microbianos, con el co-cultivo de otros organismos microbianos que no se originan naturalmente que tienen subtrayectorias y con combinaciones de otros procedimientos químicos y/o bioquímicos bien conocidos en la técnica para producir tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno.

Fuentes de ácidos nucleicos codificantes para una enzima o proteína de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno pueden incluir, por ejemplo, cualesquiera especies donde el producto de gen codificado es capaz de catalizar la reacción referenciada. Tales especies incluyen tanto organismos procarióticos como eucarióticos que incluyen, pero no se limitan a, bacterias, que incluyen archaea y eubacteria, y eucariotes, que incluyen levadura, plantas, insectos animales y mamíferos, que incluyen al hombre. Especies ejemplares de tales

fuentes incluyen, por ejemplo, *Escherichia coli, Mycobacterium tuberculosis, Agrobacterium tumefaciens, Bacillus subtilis, especies de Synechocystis, Arabidopsis thaliana, Zymomonas mobilis, Klebsiella oxytoca, Salmonella typhimurium, Salmonella typhi, Lactobacullus collinoides, Klebsiella pneumoniae, Clostridium pasteuranum, Citrobacter freundii, Clostridium butyricum, Roseburia inulinivorans, Sulfolobus solfataricus, Neurospora crassa, Sinorhizobium fredii, Helicobacter pilori, Pyrococcus furiosus, Haemophilus influenzae, Erwinia chrysanthemi, Staphilococcus aureus, Dunaliella salina, Streptococcus pneumoniae, Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus nidulans, Pneumocystis carinii, Streptomyces coelicolor,* especies de los géneros *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Shingomonas* y *Comamonas*, por ejemplo, *Comamonas testosteroni*, así como también otras especies ejemplares descritas en la presente o disponibles como fuentes de organismos para genes correspondientes. Sin embargo, con la secuencia del genoma completo disponible para ahora más de 550 especies (con más de la mitad de estas disponibles en bases de datos públicas tales como la NCBI), que incluyen 395 genomas de microorganismos y una variedad de genomas de levadura, hongos, plantas y mamíferos, la identificación de genes que codifican la actividad biosintética requisito de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno para uno o más genes en especies relacionadas o distantes, que incluyen por ejemplo, desplazamientos de genes homólogos, ortólogos, parálogos y no ortólogos de genes conocidos, y el intercambio de alteraciones genéticas entre organismos es rutina y bien conocida en la técnica. Por consiguiente, las alteraciones metabólicas permiten la biosíntesis de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno descritos en la presente con referencia a un organismo particular tal como *E. coli* pueden ser fácilmente aplicadas a otros microorganismos, que incluyen organismos procarióticos y eucarióticos semejantes. Dadas las enseñanzas y guías proporcionadas en la presente, aquellos expertos en la técnica sabrán que una alteración metabólica ejemplificada en un organismo puede ser aplicada igualmente a otros organismos.

En algunos casos, tales como cuando existe una trayectoria biosintética de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-

pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno alternativa en una especie no relacionada, la biosíntesis de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno puede ser conferida sobre las especies hospederas mediante, por ejemplo, la expresión exógena de un parálogo o parálogos de las especies no relacionadas que catalizan una reacción metabólica similar, aún no idéntica para reemplazar la reacción referenciada. Debido a que existen ciertas diferencias entre redes metabólicas entre diferentes organismos, aquellos expertos en la técnica entenderán que el empleo del gen actual entre diferentes organismos puede diferir. Sin embargo, dadas las enseñanzas y guías proporcionadas en la presente, aquellos expertos en la técnica también entenderán que las enseñanzas y métodos de la invención pueden ser aplicadas a todos los organismos microbianos usando las alteraciones metabólicas cognatas a aquellos ejemplificados en la presente para construir un organismo microbiano en una especie de interés que sintetizará tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno.

Métodos para construir y probar los niveles de expresión de un hospedero que produce tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno que no se origina naturalmente pueden ser realizados, por ejemplo, por métodos de detección y recombinantes bien conocidos en la técnica. Tales métodos se pueden encontrar descritos en, por ejemplo, Sambrook *et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001); y Ausubel *et al., Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999).

Secuencias de ácido nucleico exógenas involucradas en una trayectoria para la producción de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno pueden ser introducidas establemente o temporalmente en una célula hospedera usando técnicas bien conocidas en el arte que incluyen, pero no se limitan a, conjugación, electroporación, transformación química, transducción, transfección y transformación por ultrasonido. Para la expresión exógena en *E. coli* u otras células procarióticas, algunas secuencias de ácido nucleico en los genes o cADNs

de ácidos nucleicos eucarióticos pueden codificar señales de objetivo tales como una N-terminal mitocondrial u otra señal de objetivo, la cual puede ser removida antes de la transformación en células hospederas procarióticas, si se desea. Por ejemplo, la remoción de una secuencia líder mitocondrial conduce a expresión incrementada en *E. coli* (Hoffmeister *et al.*, J. Biol. Chem. 280:4329-4338 (2005)). Para la expresión exógena el levadura u otras células eucarióticas, los genes pueden ser expresados en el citosol sin la adición de secuencia líder, o pueden ser dirigidos al mitocondrión u otros organelos, o dirigidos para secreción, por la adición de una secuencia objetivo adecuada tal como una señal de secreción u objetivo mitocondrial adecuada para las células hospederas. De este modo, se entiende que las modificaciones apropiadas a una secuencia de ácido nucleico para remover o incluir una secuencia objetivo pueden ser incorporadas en una secuencia de ácido nucleico exógena para impartir propiedades deseables. Además, los genes pueden ser sometidos a optimización del codón con técnicas bien conocidas en la técnica para lograr la expresión optimizada de las proteínas.

Un vector de expresión o vectores pueden ser construidos para incluir uno o más ácidos nucleicos que codifican la trayectoria biosintética de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno como se ejemplifica en la presente operablemente ligado a secuencias de control de expresión funcionales en el organismo hospedero. Los vectores de expresión aplicables para uso en los organismos hospederos microbianos de la invención incluyen, por ejemplo, plásmidos, vectores fagos, vectores virales, episomas y cromosomas artificiales, que incluyen vectores y secuencias o marcadores de selección operables para integración estable en un cromosoma hospedero. Adicionalmente, los vectores de expresión pueden incluir uno o más genes marcadores seleccionables y secuencias de control de expresión apropiadas. Los genes marcadores seleccionables también pueden ser incluidos que, por ejemplo, proporcionan resistencia a antibióticos o toxinas, deficiencias auxotróficas del complemento, o suministro de nutrientes críticos no en el medio de cultivo. Las secuencias de control de expresión pueden incluir promotores constitutivos e inducibles, intensificadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, y similares los cuales son bien conocidos en la técnica. Cuando dos o más ácidos nucleicos exógenos codificantes están siendo co-expresados, ambos ácidos nucleicos pueden ser insertados, por ejemplo, en un vector de expresión único o en vectores de expresión separados. Por vector de expresión

único, los ácidos nucleicos codificantes pueden ser operacionalmente ligados a una secuencia de control de expresión común o ligados a diferentes secuencias de control de expresión, tales como un promotor inducible y un promotor constitutivo. La transformación de secuencias de ácido nucleico exógenas involucradas en una trayectoria metabólica o sintética puede ser confirmada usando métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, por ejemplo, análisis de ácido nucleico tales como manchados Northern o amplificación de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ARNm, o inmunomanchado para expresión de productos del gen, u otros métodos analíticos adecuados para probar la expresión de una secuencia de ácido nucleico introducida o su producto de gen correspondiente. Se entiende por aquellos expertos en la técnica que el ácido nucleico exógeno es expresado en una cantidad suficiente para producir el producto deseado, y se entiende además que los niveles de expresión pueden ser optimizados para obtener suficiente expresión usando métodos bien conocidos en la técnica y como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para producir tolueno que incluye cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de tolueno. La trayectoria de tolueno incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de tolueno expresada en una cantidad suficiente para producir tolueno, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir tolueno. La trayectoria de tolueno se puede seleccionar de (A) 1) una o ambas de fenilalanina aminotransferasa y fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato descarboxilasa, y 3) fenilacetaldehído descarbonilasa; (B) 1) una o más de fenilalanina aminotransferasa y fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato descarboxilasa, 3) una o más de fenilacetaldehído deshidrogenasa y fenilacetaldehído oxidasa, y 4) fenilacetato descarboxilasa; y (C) 1) una o más de fenilalanina aminotransferasa y fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato oxidasa, y 3) fenilacetato descarboxilasa, como se indica en las trayectorias alternas mostradas en la Figura 1. En algunas modalidades, el método incluye cultivar el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

En algunas modalidades, métodos de la invención para producir tolueno incluyen cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente, que incluye dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno, tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una

enzima de la trayectoria de tolueno, cuatro ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno, cinco ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una trayectoria de tolueno, y así sucesivamente. Organismo ejemplares que tienen cuatro ácidos nucleicos exógenos pueden codificar 1) fenilalanina aminotransferasa, 2) fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 3) fenilpiruvato descarboxilasa, y 4) fenilacetaldehído descarbonilasa. Organismo ejemplares que tienen cinco ácidos nucleicos exógenos pueden codificar 1) fenilalanina aminotransferasa, 2) fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 3) fenilpiruvato descarboxilasa, 4) fenilacetaldehído deshidrogenasa y/u oxidasa, y 5) fenilacetato descarboxilasa. En algunas modalidades, métodos de la invención para producir tolueno puede incluir cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene al menos un ácido nucleico exógeno que es un ácido nucleico heterólogo.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para producir benceno que incluye cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de benceno. La trayectoria de benceno puede incluir al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de benceno expresada en una cantidad suficiente para producir benceno, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir benceno. La trayectoria de benceno puede incluir una fenilalanina benceno-liasa, como se muestra en la Figura 2. En algunas modalidades, al menos un ácido nucleico exógeno es la fenilalanina benceno-liasa misma, mientras en modalidades alternas, al menos un ácido nucleico exógeno puede afectar la producción del metabolito precursor de fenilalanina. En algunas modalidades al menos un ácido nucleico exógeno de la trayectoria de benceno es un ácido nucleico heterólogo. En algunas modalidades, métodos de la invención para producir benceno puede incluir cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para producir estireno que incluye cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de estireno. La trayectoria de estireno puede incluir al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de estireno expresada en una cantidad suficiente para producir estireno, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir estireno. La trayectoria de estireno se puede seleccionar de (A) 1) benzoil-CoA acetiltransferasa, 2) una o más de 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA

sintetasa, transferasa, e hidrolasa, 3) benzoil-acetato descarboxilasa, 4) acetofenona reductasa, y 5) 1-feniletanol deshidratasa; y (B) 1) benzoil-CoA acetiltransferasa, 2) fosfotrans-3-oxo-3-fenilpropionilasa, 3) benzoil-acetato cinasa, 4) benzoil-acetato descarboxilasa, 5) acetofenona reductasa, y 6) 1-feniletanol deshidratasa, como se indica en las trayectorias alternas en la Figura 3. En algunas modalidades, métodos de la invención para producir estireno puede incluir cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

En algunas modalidades, métodos de la invención para producir estireno incluyen cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente, que incluye dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno, tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno, cuatro ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno, cinco ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno, seis ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno, y así sucesivamente. Un organismo ejemplar que tiene cinco ácidos nucleicos exógenos pueden codificar 1) benzoil-CoA acetiltransferasa, 2) uno de 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA sintetasa, transferasa, e hidrolasa, 3) benzoil-acetato descarboxilasa, 4) acetofenona reductasa, y 5) 1-feniletanol deshidratasa. Un organismo ejemplar que tiene seis ácidos nucleicos exógenos codifica 1) benzoil-CoA acetiltransferasa, 2) fosfotrans-3-oxo-3-fenilpropionilasa, 3) benzoil-acetato cinasa, 4) benzoil-acetato descarboxilasa, 5) acetofenona reductasa, y 6) 1-feniletanol deshidratasa. En algunas modalidades, métodos de la presente invención para producir estireno pueden incluir cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente en el cual al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para producir 1,3-butadieno que incluye cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 1,3-butadieno. La trayectoria de 1,3-butadieno incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria de enzima 1,3-butadieno expresada en una cantidad suficiente para producir 1,3-butadieno, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 1,3-butadieno. La trayectoria de 1,3-butadieno se puede seleccionar de (A) 1) *trans*, *trans*-muconato descarboxilasa y 2) *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (B) 1) *cis*, *trans*-muconato *cis*-descarboxilasa y 2)

trans-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (C) 1) *cis*, *trans*-muconato *trans*-descarboxilasa 2) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; y (D) 1) *cis*, *cis*-muconato descarboxilasa y 2) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa, como se indica por las trayectorias alternas en la Figura 4. En algunas modalidades, el método para producir 1,3-butadieno puede incluir cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

En algunas modalidades, métodos de la invención pueden incluir cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 1,3-butadieno. Organismo ejemplares que tienen dos ácidos nucleicos exógenos puede incluir genes que codifican una serie de enzimas seleccionadas de (A) 1) *trans*, *trans*-muconato descarboxilasa y 2) *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (B) 1) *cis*, *trans*-muconato *cis*-descarboxilasa y 2) *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (C) 1) *cis*, *trans*-muconato *trans*-descarboxilasa 2) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; y (D) 1) *cis*, *cis*-muconato descarboxilasa y 2) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa. En algunas modalidades, métodos de la invención pueden incluir cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene al menos un ácido nucleico exógeno que es un ácido nucleico heterólogo.

La invención adicionalmente proporciona un método para producir (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, que comprende cultivar el organismo microbiano que no se origina naturalmente que contiene una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato. Tal organismo microbiano puede tener una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato expresada en una cantidad suficiente para producir (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, la trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato que comprende 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato deshidratasa (véase Ejemplo III y Figura 5, la etapa C). Una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato puede opcionalmente comprender además 1-desoxixilulosa-5-fosfato sintasa y/o 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (véase Ejemplo III y Figura 5, etapas A y B).

En otra modalidad, la invención proporciona un método para producir *p*-toluato, que comprende cultivar el organismo microbiano que no se origina naturalmente que comprende una trayectoria de *p*-toluato bajo condiciones y por

un periodo de tiempo suficiente para producir *p*-toluato. Una trayectoria de *p*-toluato puede comprender al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de *p*-toluato expresada en una cantidad suficiente para producir *p*-toluato, la trayectoria de *p*-toluato comprende 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa; 3-deshidroquinato sintasa; 3-deshidroquinato deshidratasa; shikimato deshidrogenasa; shikimato cinasa; 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa; corismato sintasa; y/o corismato liasa (véase Ejemplo IV y Figura 6, etapas A-H). En otra modalidad, un método de la invención puede utilizar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que comprende además una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato (véase Ejemplo III y Figura 5). Tal trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato puede comprender 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato deshidratasa, 1-desoxixilulosa-5-fosfato sintasa y/o 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (véase Ejemplo III y Figura 5).

La invención además proporciona un método para producir tereftalato, que comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que contiene una trayectoria de tereftalato bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir tereftalato. Tal trayectoria de tereftalato puede comprender al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de tereftalato expresada en una cantidad suficiente para producir tereftalato, la trayectoria de tereftalato comprende *p*-toluato metil-monooxigenasa reductasa; deshidrogenasa de alcohol 4-carboxibencílico; y/o deshidrogenasa de 4-carboxibencil aldehído. Tal organismo microbiano puede comprender además una trayectoria de *p*-toluato, en la trayectoria de *p*-toluato comprende 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa; 3-deshidroquinato sintasa; 3-deshidroquinato deshidratasa; shikimato deshidrogenasa; shikimato cinasa; 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa; corismato sintasa; y/o corismato liasa (véase Ejemplos IV y V y Figuras 6 y 7). En otra modalidad, el organismo microbiano que no se origina naturalmente puede comprender además una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato (véase Ejemplo III y Figura 5). En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para producir tolueno, que comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de tolueno que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de tolueno expresada en una cantidad suficiente para producir tolueno. La trayectoria de tolueno se puede seleccionar de una serie de enzimas de las trayectorias seleccionadas de: a) *p*-toluato

descarboxilasa; b) *p*-toluato reductasa y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa; c) *p*-toluato cinasa, (*p*-metilbenzoiloxi)fosfonato reductasa, y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa; d) (*p*-metilbenzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), fosfotrans-*p*-metilbenzoilasa, (*p*-metilbenzoiloxi)fosfonato reductasa, y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa; y e) (*p*-metilbenzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), *p*-metilbenzoil-CoA reductasa y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa. El organismo microbiano que no se origina naturalmente puede ser cultivado bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir tolueno. En una modalidad particular, la invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente y métodos de uso, en los cuales el organismo microbiano contiene las trayectorias de *p*-toluato, tereftalato o tolueno, y (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para producir (2-hidroxi-4-oxobutoxi) fosfonato, que comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato expresada en una cantidad suficiente para producir (2-hidroxi-4-oxobutoxi) fosfonato. La trayectoria de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato puede incluir eritrosa-4-fosfato deshidratasa y (2,4-dioxobutoxi)fosfonato reductasa.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para producir benzoato, que comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de benzoato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de benzoato expresada en una cantidad suficiente para producir benzoato. La trayectoria de benzoato incluye 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa; 3-deshidroquinato sintasa; 3-deshidroquinato deshidratasa; shikimato deshidrogenasa; shikimato cinasa; 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa; corismato sintasa; y corismato liasa. El método incluye cultivar el organismo que no se origina naturalmente bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir benzoato.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para producir benceno, que comprende cultivar el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de benceno que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de benceno expresada en una cantidad suficiente para producir

benceno. La trayectoria de benceno se selecciona de una serie de enzimas de las trayectorias seleccionadas de: a) benzoato descarboxilasa; b) benzoato reductasa y benzaldehído descarbonilasa; c) benzoato cinasa, (benzoiloxi)fosfonato reductasa, y benzaldehído descarbonilasa; d) (benzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), fosfotransbenzoilasa, (benzoiloxi)fosfonato reductasa, y benzaldehído descarbonilasa; y e) (benzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), benzoil-CoA reductasa y benzaldehído descarbonilasa. El organismo microbiano que no se origina naturalmente puede ser cultivado bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir benceno. En una modalidad particular, la invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente y métodos de uso, en los cuales el organismo microbiano contiene trayectorias de (2-hidroxi-4-oxobutoxi) fosfonato, benzoato, y benceno.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para producir 2,4-pentadienoato que incluye cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato. La trayectoria incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad suficiente para producir 2,4-pentadienoato, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 2,4-pentadienoato. La trayectoria de 2,4-pentadienoato seleccionadas de A) i) una 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa, ii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iii) una 2-oxopentenoato reductasa, y iv) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa; B) i) una desaminasa AKP, ii) una acetilacrilato reductasa, y iii) una 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; C) i) una AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, ii) una 2,4-dioxopentanoato-2-reductasa, iii) una 2-hidroxi-4-oxopentanoato deshidratasa, iv) una acetilacrilato reductasa, y v) una 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; D) i) una AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, ii) una 2,4-dioxopentanoato-4-reductasa, iii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iv) una 2-oxopentenoato reductasa, y v) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa; y E) i) una AKP reductasa, ii) una 2-amino-4-hidroxipentanoato aminotransferasa y/o deshidrogenasa, iii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iv) una 2-oxopentenoato reductasa, y v) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa.

En algunas modalidades, los métodos de la invención utilizan un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad

suficiente para producir 2,4-pentadienoato. La trayectoria de 2,4-pentadienoato tiene una serie de enzimas seleccionadas de (A) 1) 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa, 2) 4-hidroxi-2-oxovalerato reductasa, 3) 2,4-dihidroxipentanoato 2-deshidratasa, y 4) 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, como se muestra en las etapas A, E, F, y G de la Figura 12 y (B) 1) 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa, 2) 4-hidroxi-2-oxovalerato reductasa, 3) 2,4-dihidroxipentanoato 4-deshidratasa y 4) 2-hidroxipentenoato deshidratasa, como se muestra en las etapas A, E, H, y D de la Figura 12.

En algunas modalidades, los presentes métodos de la invención utilizan un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad suficiente para producir 2,4-pentadienoato. La trayectoria de 2,4-pentadienoato tiene una serie de enzimas seleccionadas de (A) 1) AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, 2) 2,4-dioxopentanoato 2-reductasa, 3) 2-hidroxi-4-oxopentanoato reductasa, 4) 2,4-dihidroxipentanoato 2-deshidratasa, y 5) 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, como se muestra en las etapas E, H, I, G, y D de la Figura 13, y (B) 1) AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, 2) 2,4-dioxopentanoato 2-reductasa, 3) 2-hidroxi-4-oxopentanoato reductasa, junto con 4) 2,4-dihidroxipentanoato-2-deshidratasa y 5) 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa o 4) 2,4-dihidroxipentanoato-4-deshidratasa y 5) 2-hidroxipentenoato deshidratasa, como se muestra en las etapas E, H, y I de la Figura 13, junto con las etapas F y G o H y D de la Figura 12, respectivamente. Es decir, la deshidratación doble de 2,4-dihidroxipentanoato se puede realizar en cualquier orden.

En algunas modalidades, los métodos de la invención utilizan un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de AKP que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria de enzima de AKP expresada en una cantidad suficiente para producir AKP. La trayectoria de AKP incluye una ornitina 4,5-aminomutasa y una 2,4-diaminopentanoato 4-aminotransferasa y/o 4-deshidrogenasa, como se muestra en las etapas M y N de la Figura 13. En algunas modalidades, el organismo microbiano que tiene una trayectoria de AKP incluye dos enzimas exógenas que codifican una ornitina 4,5-aminomutasa y una 2,4-diaminopentanoato 4-aminotransferasa o 2,4-diaminopentanoato 4-deshidrogenasa. En algunas modalidades, esta trayectoria de AKP se puede agregar a cualquiera de las trayectorias de 2,4-pentadienoato mencionadas anteriormente y como se indica en

la Figura 13. Alternativamente, AKP puede ser accesada de alanina por adición de una AKP tiolasa, como se muestra en la etapa A de la Figura 13, y alimentar en las varias trayectorias de 2,4-pentadienoato descritas en la presente y mostradas en la Figura 13, junto con Figura 12.

En algunas modalidades, los métodos de la invención utilizan un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad suficiente para producir 2,4-pentadienoato. La trayectoria de 2,4-pentadienoato tiene una serie de enzimas seleccionadas de (A) 1) ornitina 2,3-aminomutasa, 2) 3,5-diaminopentanoato desaminasa, y 3) 5-aminopent-2-enoato desaminasa, como se muestra en las etapas A-C de la Figura 14, (B) 1) ornitina 2,3-aminomutasa, 2) 3,5-diaminopentanoato desaminasa, 3) 5-aminopent-2-enoato aminotransferasa y/o deshidrogenasa, 4) 5-oxopent-2-enoato reductasa, y 5) 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, como se muestra en las etapas A, B, H, F, y G de la Figura 14, (C) 1) ornitina 2,3-aminomutasa, 2) 3,5-diaminopentanoato aminotransferasa y/o deshidrogenasa, 3) 3-amino-5-oxopentanoato desaminasa, 4) 5-oxopent-2-enoato reductasa, y 5) 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa como se muestra en las etapas A, D, E, F, y G de la Figura 14, y (D) 1) ornitina 2,3-aminomutasa, 2) 3,5-diaminopentanoato aminotransferasa y/o deshidrogenasa, 3) 3-amino-5-oxopentanoato reductasa, y 4) 3-amino-5-hidroxipentanoato desaminasa, y 5) 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa como se muestra en las etapas A, D, I, J, y G de la Figura 14.

En algunas modalidades, los métodos de la invención utilizan un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad suficiente para producir 2,4-pentadienoato. La trayectoria de 2,4-pentadienoato tiene una serie de enzimas seleccionadas de cualquiera de las numerosas trayectorias mostradas en la Figura 15 partiendo de 3-HP-CoA o acriloil-CoA.

Trayectorias ejemplares de 3-HP incluyen las siguientes series de enzimas (A) 1) 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, 2) 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, 3) 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, 4) 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, y 5) pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, como se muestra en las etapas A-E de la Figura 15, y (B) 1) 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, 2) 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA

sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, 3) 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, 4) 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, y 5 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, como se muestra en las etapas A, F, I, J, y Q de la Figura 15. Un experto en la técnica reconocerá que las series de enzimas que definen las trayectorias (A) y (B) de 3-HP-CoA pueden ser mezcladas vía enzimas reversibles 3,5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, como se muestra en la etapa G en la Figura 15, y 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, como se muestra en la etapa H en la Figura 15. De este modo, una trayectoria de 3-HP-CoA a 2,4-pentadienoato puede incluir las enzimas en las etapas A, B, G, J, y Q, o etapas A, B, C, H, y Q, o etapas A, B, G, J, H, D, y E, o etapas A, F, I, G, C, D, y E, o etapas, A, F, I, G, C, H, y Q, o etapas A, F, I, J, H, D, y E, cada una mostrada en la Figura 15.

Trayectorias ejemplares de acriloil-CoA incluyen las siguientes series de enzimas (C) 1) acriloil-CoA acetiltransferasa, 2) 3-oxopent-4-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, 3) 3-oxopent-4-enoato reductasa, 4) 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa, como se muestra en las etapas M, O, P, y S en la Figura 15 y (D), 1) acriloil-CoA acetiltransferasa, 2) 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, 3) 3-hidroxipent-4-enoil-CoA deshidratasa, y 4) pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, como se muestra en las etapas M, N, R, y E. Un experto en la técnica reconocerá que las series de enzimas que definen las trayectorias (A) y (B) de 3-HP-CoA y (C) y (D) de acriloil-CoA pueden ser mezcladas vía enzimas reversibles 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, como se muestra en la etapa K de la Figura 15, y 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, como se muestra en la etapa L de la Figura 15. De este modo, la etapa K se puede agregar a cualquiera de las trayectorias enumeradas a partir de acriloil-CoA a 2,4-pentadienoato proporcionando trayectorias de 2,4-pentadienoato tales como etapas K, M, N, R, y E o etapas K, M, O, P, y S. La etapa K también puede ser usada como una alternativa de conexión a la etapa A para proporcionar 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA de 3-HP-CoA vía etapas K, M, y L. De este modo, cualquiera de las trayectorias mencionadas anteriormente que utiliza la enzima de la etapa A puede utilizar las enzimas de las etapas K, M, y L, en su lugar. El mismo intermediario 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA puede ser accesado de acriloil-CoA por trayectorias vía las enzimas de las etapas K y A o M y L de la Figura 15. De este modo, acriloil-CoA se puede usar para acceder a todas las trayectorias enumeradas que podrían ser accesibles de 3-HP-CoA. De este modo, por ejemplo, una trayectoria de acriloil-CoA a 2,4-pentadienoato puede incluir enzimas

de las etapas K, A, B, C, D, y E, o etapas K, A, F, I, J y Q, o etapas K, A, B, G, J, y Q, o etapas K, A, B, G, J, H, D, y E, o etapas K, A, B, C, H, y Q, o etapas K, A, F, I, G, C, D, y E, o etapas K, A, F, I, G, C, H, Q, o etapas K, A, F, I, J, H, D y E, o etapas M, L, B, C, D, y E, o etapas M, L, F, I, J y Q, o etapas M, L, B, G, J, y Q, o etapas M, L, B, G, J, H, D, y E, o etapas M, L, B, C, H, y Q, o etapas M, L, F, I, G, C, D, y E, o etapas M, L, F, I, G, C, H, Q, o etapas M, L, F, I, J, H, D y E, todas como se muestran en la Figura 15. De manera similar, 3-HP-CoA puede alimentarse en las trayectorias de acriloil-CoA enumeradas vía el intermediario 3-oxopent-4-enoil-CoA usando la enzima de la etapa L. De este modo, una trayectoria de 3-HP-CoA a 2,4-pentadienoato puede incluir enzimas de las etapas A, L, N, R, y E o etapas A, L, O, P, y S, cada trayectoria es mostrada en la Figura 15.

En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente usado en métodos de la invención puede incluir dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención puede incluir tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato. Por ejemplo, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención puede incluir tres ácidos nucleicos exógenos que codifican i) una desaminasa AKP, ii) una acetilacrilato reductasa, y iii) una 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, de este modo proporcionando una trayectoria accesable de alanina u ornitina a 2,4-pentadienoato vía AKP. Un experto en la técnica reconocerá que esto es solamente ejemplar y que tres ácidos nucleicos exógenos pueden ser la base de cualquier organismo que no se origina naturalmente que produce 2,4-pentadienoato en cualquiera de las trayectorias enumeradas de la Figura 12-15.

En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente usado en métodos de la invención microbiana puede incluir cualesquiera cuatro ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato. Por ejemplo, un organismo microbiano que no se origina naturalmente puede incluir cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican i) una 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa, ii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iii) una 2-oxopentenoato reductasa, y iv) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa, de este modo definiendo una trayectoria completa de piruvato a 2,4-pentadienoato, como se muestra en la Figura 12. Un experto en la técnica reconocerá que esto es solamente ejemplar y que cuatro ácidos nucleicos

exógenos pueden ser la base de cualquier organismo que no se origina naturalmente que produce 2,4-pentadienoato en cualquiera de las trayectorias enumeradas de la Figura 12-15.

En todavía modalidades adicionales, el organismo microbiano que no se origina naturalmente usado en métodos de la invención puede incluir cinco ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención ejemplar que tiene cinco ácidos nucleicos exógenos puede incluir enzimas que codifican (A) i) una AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, ii) una 2,4-dioxopentanoato-2-reductasa, iii) una 2-hidroxi-4-oxopentanoato deshidratasa, iv) una acetilacrilato reductasa, y v) una 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa, como se muestra en las etapas E, H, F, C, y D en la Figura 13, o (B) i) una AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, ii) una 2,4-dioxopentanoato-4-reductasa, iii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iv) una 2-oxopentenoato reductasa, y v) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa, como se muestra en las etapas E y K de la Figura 13, junto con las etapas B, C, y D de la Figura 12, o i) una AKP reductasa, ii) una 2-amino-4-hidroxipentanoato aminotransferasa y/o deshidrogenasa, iii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iv) una 2-oxopentenoato reductasa, y v) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa, como se muestra en las etapas J y L de la Figura 13, junto con las etapas B, C, y D de la Figura 12. Un experto en la técnica reconocerá que esto es solamente ejemplar y que cinco ácidos nucleicos exógenos pueden ser la base de cualquier organismo que no se origina naturalmente que produce 2,4-pentadienoato en cualquiera de las trayectorias enumeradas de la Figura 12-15. De este modo, en algunas modalidades dos, tres, cuatro, cinco, seis, hasta todas las enzimas en una trayectoria de 2,4-pentadienoato pueden ser inserción proporcionada de ácidos nucleico exógenos. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención que tiene al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo. Sin embargo, en algunas modalidades, los métodos que emplean el organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención pueden utilizar un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente usado en métodos de la invención puede además incluir una 2,4-pentadienoato descarboxilasa expresada en una cantidad suficiente para producir 1,3-butadieno por conversión de 2,4-pentadienoato a 1,3-butadieno. De este modo, cualquiera de las trayectorias de 2,4-pentadienoato de la Figura 12 puede

formar las bases de producción adicional de 1,3 butadieno, como se indica por la conversión de cis o trans 2,4-pentadienoato a 1,3-butadieno en la Figura 4.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para producir 2,4-pentadienoato, que comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con las trayectorias mencionadas anteriormente descritas en la presente bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 2,4-pentadienoato. En algunas de tales modalidades, el organismo microbiano incluye dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato. En algunas de tales modalidades, al menos un ácido nucleico exógeno Es un ácido nucleico heterólogo. En algunas de tales modalidades el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para producir 1,3-butadieno que incluye cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con las trayectorias mencionadas anteriormente descritas en la presente, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 1,3-butadieno. En algunas de tales modalidades, el organismo microbiano incluye dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 1,3-butadieno. En algunas de tales modalidades, al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo. En algunas de tales modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para producir 3-buteno-1-ol la cual incluye cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la trayectoria mencionada anteriormente descrita en la presente, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 3-buteno-1-ol. En algunas de tales modalidades, el organismo microbiano incluye dos, tres, cuatro, cinco, seis, o siete ácidos nucleico exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 3-buteno-1-ol. En algunas de tales modalidades, al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo. En algunas de tales modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico. En algunas de tales modalidades, métodos de la invención además incluyen la deshidratación química de 3-buteno-1-ol para

proporcionar 1,3-butadieno.

3-buteno-1-ol puede ser químicamente deshidratado con formación de 1,3-butadieno, partiendo con 3-buteno-1-ol aislado puro de la solución de fermentación o partiendo con soluciones acuosas u orgánicas de 3-buteno-1-ol, aislado en desarrollo de la solución de fermentación. Tales soluciones de 3-buteno-1-ol también pueden ser concentradas antes de la etapa de deshidratación, por ejemplo por medio de destilación, opcionalmente en la presencia de un entrenador adecuado.

La reacción de deshidratación se puede llevar a cabo en fase líquida o en la fase gaseosa. La reacción de deshidratación se puede llevar a cabo en la presencia de un catalizador, la naturaleza del catalizador empleado dependiendo de si se lleva a cabo una reacción de fase gaseosa o fase líquida.

Catalizadores de deshidratación adecuados incluyen tanto catalizadores acídicos como catalizadores alcalinos. Os catalizadores acídicos, en particular pueden exhibir una tendencia reducida para formar oligómeros. El catalizador de deshidratación puede ser empleado como un catalizador homogéneo, un catalizador heterogéneo, o combinaciones de los mismos. Catalizadores heterogéneos pueden ser usados en conjunto con un material de soporte adecuado. Tal soporte puede el mismo ser acídico o alcalino y proporcionar el catalizador de deshidratación acídico o alcalino, o un catalizador puede ser aplicado a un soporte inerte.

Soportes adecuados los cuales sirven como catalizadores de deshidratación incluyen silicatos naturales o sintéticos tales como modernita, montmorillonita, zeolitas acídicas; soportes los cuales son recubiertos con ácidos inorgánicos monobásicos, dibásicos o polibásicos, tales como ácido fosfórico, o con sales acídicas de ácidos inorgánicos, tales como óxidos o silicatos, por ejemplo Al_2O_3, TiO_2; óxidos y mezclas de óxidos tales como óxidos mezclados de γ-Al_2O_3 y ZnO—Al_2O_3 de heteropoliácidos. Las sustancias alcalinas las cuales actúan tanto como catalizador de deshidratación como un soporte para material de soporte incluyen álcalis, alcalinotérreas, latano, lantoides, o combinaciones de los mismos como sus óxidos. Una clase adicional de materiales puede afectar la deshidratación son intercambiadores de iones los cuales pueden ser usados en ya sea forma alcalina o acídica.

Catalizadores de deshidratación homogéneos adecuados incluyen ácidos inorgánicos, tales como ácidos que contienen fósforo tales como ácido fosfórico. Ácidos inorgánicos pueden ser inmovilizados en el material de soporte

por inmersión o impregnación.

En algunas modalidades, la reacción de deshidratación se lleva a cabo en la fase gaseosa usando aparatos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo reactores tubulares, intercambiadores de calor de cubierta y tubo y reactores los cuales comprenden termoplacas como intercambiadores de calor. En algunas modalidades, la deshidratación de fase gaseosa puede utilizar 3-buteno-1-ol aislado o soluciones de buteno-1-ol, el buteno-1-ol se introduce en un reactor con catalizadores de lecho fijo. La deshidratación térmica en la fase líquida se puede llevar a cabo en un intervalo de temperatura de entre 200 °C y 350 °C, y en algunas modalidades entre 250 y 300° C.

La purificación adecuada y/o ensayos para probar la producción de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno pueden ser realizados usando métodos bien conocidos. Réplicas adecuadas tales como cultivos triplicados se pueden hacer crecer para cada cepa diseñada por ingeniería a ser probada. Por ejemplo, se puede monitorear el producto y formación de derivado en el hospedero de producción diseñado por ingeniería. El producto final e intermediarios, y otros compuestos orgánicos, puede ser analizado por métodos tales como HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución), GC-MS (Cromatografía de Gas-Espectroscopia de Masas) y LC-MS (Cromatografía Líquida-Espectroscopia de Masas) o u otros métodos analíticos adecuados usando procedimientos de rutina bien conocidos en la técnica. La liberación del producto en el caldo de fermentación también puede ser probada con el sobrenadante del cultivo. Los derivados y glucosa residual pueden ser cuantificados por HPLC usando, por ejemplo, un detector de índice refractivo para glucosa y alcoholes, y un detector UV para ácidos orgánicos (Lin *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 90:775-779 (2005)), u otro ensayo adecuado y métodos de detección bien conocidos en la técnica. Las actividades individuales de la enzima o proteína de las secuencias de ADN exógenas también pueden ser ensayadas usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la actividad de fenilpiruvato descarboxilasa puede ser medida usando un ensayo fotométrico acoplado con alcohol deshidrogenasa como una enzima auxiliar como se describe por Weiss *et al.* (Weiss *et al.*, Biochem, 27:2197-2205 (1988). Enzimas NADH- y dependientes de NADPH tales como acetofenona reductasa pueden ser seguidas espectrofotométricamente a 340 nm como se describe por Schlieben *et al.* (Schlieben *et al.*, J. Mol. Biol., 349:801-813 (2005)). Para métodos de ensayo de

hidrocarburo típicos, véase Manual on Hydrocarbon Analysis (ASTM Manula Series, A.W. Drews, ed., 6th edition, 1998, American Society for Testing and Materials, Baltimore, Mariland. La actividad de *p*-toluato metil-monooxigenasa puede ser sometida a ensayo incubando la enzima purificada con NADH, $FeSO_4$ y el sustrato de *p*-toluato en un baño maría, deteniendo la reacción por precipitación de las proteínas, y análisis de los productos en el sobrenadante por HPLC (Locher *et al.,* J. Bacteriol. 173:3741-3748 (1991)).

El tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno puede ser separado de otros componentes en el cultivo usando una variedad de métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos de separación incluyen, por ejemplo, procedimientos de extracción así como también métodos que incluyen extracción continua líquido-líquido, pervaporación, filtración de membrana, separación de membrana ósmosis reversa, electrodiálisis, destilación, cristalización, centrifugación, filtración extractiva, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de adsorción y ultrafiltración. Todos los métodos anteriores son bien conocidos en la técnica.

Cualesquiera de los organismos microbianos que no se originan naturalmente descritos en la presente pueden ser cultivados para producir y/o secretar los productos biosintéticos de la invención. Por ejemplo, los productores de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno pueden ser cultivados para la producción biosintética de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno.

Para la producción de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno, las cepas recombinantes son cultivadas en un medio con fuente de carbono y otros nutrientes esenciales. Es algunas veces deseable y puede ser altamente deseable mantener condiciones anaeróbicas en el fermentador para reducir el costo de los procesos totales. Tales condiciones pueden ser obtenidas, por ejemplo, dispersando primero el medio con nitrógeno y después sellar los matraces con un septo y tapa engarzada. Para cepas donde el crecimiento no se observa

anaeróbicamente, las condiciones microaeróbicas o sustancialmente anaeróbicas pueden ser aplicadas perforando el septo con un pequeño agujero para aireación limitada. Condiciones anaeróbicas ejemplares han sido descritas previamente y son bien conocidas en la técnica. Condiciones aeróbicas y anaeróbicas ejemplares son descritas, por ejemplo, en la publicación Estadounidense 2009/0047719, presentada el 10 de Agosto de 2007. Las fermentaciones pueden ser realizadas en una manera por lotes, alimentación de lote o continua, como se describe en la presente.

Si se desea, el pH del medio puede ser mantenido a un pH deseado, en particular pH neutral, tal como un pH de aproximadamente 7 por adición de una base, tal como NaOH u otras bases, o ácido, como sea necesario para mantener el medio de cultivo a un pH deseable. La tasa de crecimiento puede ser determinada midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (600 nm), y el índice de absorción de glucosa monitoreando la depleción de la fuente de carbono con el tiempo.

El medio de crecimiento puede incluir, por ejemplo, cualesquiera fuentes de carbohidratos las cuales pueden suministrar una fuente de carbono al microorganismo que no se origina naturalmente. Tales fuentes incluyen, por ejemplo, azúcares tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fructuosa, sacarosa y almidón. Otras fuentes de carbohidratos incluyen, por ejemplo, materias primas renovables y biomasa. Tipos ejemplares de biomasas que se pueden usar como materias primas en los métodos de la invención incluyen biomasa celulósica, biomasa hemicelulósica y materias primas de lignina o porciones de materias primas. Tales materias primas de biomasa contienen, por ejemplo, sustratos de carbohidratos útiles como fuentes de carbono tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fructuosa y almidón. Dadas las enseñanzas y guías proporcionadas en la presente, aquellos expertos en la técnica entenderán que las materias primas renovables y biomasas distintas de aquellas ejemplificadas anteriormente también pueden ser usadas para cultivar los organismos microbianos de la invención para la producción de tolueno, benceno, *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno.

Además de materias primas renovables tales como aquellas ejemplificadas anteriormente, los organismos microbianos de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-

oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno de la invención también pueden ser modificados para crecimiento en syngas como su fuente de carbono. En esta modalidad específica, una o más proteínas o enzimas son expresadas en los organismos que producen el tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno para proporcionar una trayectoria metabólica para utilización de syngas u otra fuente de carbono gaseoso.

El gas de síntesis, también conocido como syngas o gas productor, es el principal producto de gasificación del carbón vegetal y de materiales carbonáceos tales como materiales de biomasa, que incluyen residuos y cultivos agrícolas. El syngas es una mezcla principalmente de H_2 y CO y puede ser obtenida de la gasificación de cualesquiera materia prima orgánica, que incluye pero no se limita a carbón vegetal, aceite de carbón vegetal, gas natural, biomasa y materia orgánica de desecho. La gasificación es en general llevada a cabo bajo una alta relación de combustible a oxígeno. Aunque en gran parte H_2 y CO, el syngas también puede incluir CO_2 y otros gases en cantidades inferiores. De este modo, el gas de síntesis proporciona una fuente efectiva en costo de carbón gaseoso tal como CO y, adicionalmente, CO_2.

La trayectoria de Wood-Ljungdahl cataliza la conversión de CO y H_2 a acetil-CoA y otros productos tales como acetato. Organismos capaces de utilizar CO y syngas también en general tienen la capacidad de utilizar CO_2 y mezclas de CO_2/H_2 a través de la misma serie básica de enzimas y transformaciones abarcadas por la trayectoria Wood-Ljungdahl. La conversión dependiente de H_2 de CO_2 a acetato por microorganismos se reconoció ampliamente antes de que se revelara que el CO también podría ser usado por los mismos organismos y que las mismas trayectorias fueron involucradas. Muchos acetógenos han sido mostrados por crecer en la presencia de CO_2 y producir compuestos tales como acetato tan pronto como el hidrógeno esté presente para suministrar los equivalentes de reducción necesarios (véase, por ejemplo, Drake, Acetogenesis, pp. 3-60 Chapman and Hall, New York, (1994)). Esto puede ser resumido por la siguiente ecuación:

$$2\ CO_2 + 4\ H_2 + n\ ADP + n\ Pi \rightarrow CH_3COOH + 2\ H_2O + n\ ATP$$

Por lo tanto, microorganismos que no se originan naturalmente que poseen la trayectoria Wood-Ljungdahl pueden utilizar mezclas de CO_2 y H_2 también para la producción de acetil-CoA y otros productos deseados.

La trayectoria Wood-Ljungdahl es bien conocida en la técnica y consiste de 12 reacciones las cuales pueden ser separadas en dos ramas: (1) rama metilo y (2) rama carbonilo. La rama metilo convierte el syngas a metil-tetrahidrofolato (metil-THF) mientras la rama carbonilo convierte metil-THF a acetil-CoA. Las reacciones en la rama metilo son catalizadas en orden por las siguientes enzimas o proteínas: ferredoxina oxidorreductasa, formiato deshidrogenasa, formiltetrahidrofolato sintetasa, meteniltetrahidrofolato ciclodeshidratasa, metilenotetrahidrofolato deshidrogenasa y metilenotetrahidrofolato reductasa. Las reacciones en la rama carbonilo son catalizadas en orden por las siguientes enzimas o proteínas: metiltetrahidrofolato:metiltransferasa de proteína corrinoide (por ejemplo, AcsE), proteína de hierro-azufre corrinoide, proteína de ensamble de proteína de níquel (por ejemplo, AcsF), ferredoxina, acetil-CoA sintasa, deshidrogenasa de monóxido de carbono y proteína de montaje de proteína de níquel (por ejemplo, CooC). Siguiendo las enseñanzas y guía proporcionada en la presente para introducir un número suficiente de ácidos nucleicos codificantes para generar una trayectoria de tolueno, benceno, *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno, aquellos expertos en la técnica entenderán que el mismo diseño de ingeniería también puede ser realizado con respecto a introducir al menos los ácidos nucleicos que codifican las enzimas o proteínas Wood-Ljungdahl ausentes en el organismo hospedero. Por lo tanto, la introducción de uno o más ácidos nucleicos codificantes en los organismos microbianos de la invención de manera que el organismo modificado contiene la trayectoria completa Wood-Ljungdahl conferirá capacidad de utilización de syngas.

Adicionalmente, el ciclo de ácido tricarboxílico reductivo (reverso) acoplado con actividades de deshidrogenasa de monóxido de carbono y/o hidrogenasa también puede ser usado para la conversión de CO, CO_2 y/o H_2 a acetil-CoA y otros productos tales como acetato. Organismos capaces de fijar carbono vía la trayectoria reductora de TCA pueden utilizar una o más de las siguientes enzimas: ATP citrato-liasa, citrato liasa, aconitasa, isocitrato deshidrogenasa, alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, succinil-CoA sintetasa, succinil-CoA transferasa, fumarato reductasa, fumarasa, malato deshidrogenasa, NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, deshidrogenasa de monóxido de carbono, e hidrogenasa. Específicamente, los equivalentes reductores extraídos de CO y/o H_2 por deshidrogenasa de monóxido de carbono e

hidrogenasa son utilizados para fijar CO_2 vía el ciclo reductivo de TCA en acetil-CoA o acetato. El acetato puede ser convertido a acetil-CoA por enzimas tales como acetil-CoA transferasa, acetato cinasa/fosfotransacetilasa, y acetil-CoA sintetasa. El Acetil-CoA puede ser convertido a los precursores de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno, gliceraldehído-3-fosfato, fosfoenolpiruvato, y piruvato, por piruvato:ferredoxina oxidorreductasa y las enzimas de gluconeogénesis. Siguiendo las enseñanzas y guía proporcionada en la presente para introducir un número suficiente de ácidos nucleicos codificantes para generar una trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno, aquellos expertos en la técnica entenderán que el mismo diseño de ingeniería también puede ser realizado con respecto a introducir al menos los ácidos nucleicos que codifican las enzimas o proteínas de la trayectoria reductora de TCA ausentes en el organismo hospedero. Por lo tanto, la introducción de uno o más ácidos nucleicos codificantes en los organismos microbianos de la invención de manera que el organismo modificado contiene la trayectoria reductora completa de TCA conferirá capacidad de utilización de syngas.

En algunas modalidades, la invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente, que comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 1,3-butadieno que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria de enzima 1,3-butadieno expresada en una cantidad suficiente para producir 1,3-butadieno, dicha trayectoria de 1,3-butadieno seleccionada de: (A) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato descarboxilasa; una 3-oxopent-4-enoato reductasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa; (B) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato descarboxilasa; una 3-oxopent-4-enoato reductasa; una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadienoato descarboxilasa; (C) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato

deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato reductasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa; (D) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato reductasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadienoato descarboxilasa; (E) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato reductasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa; (F) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato reductasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadienoato descarboxilasa; (G) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA reductasa; una 3-hidroxiadipil-CoA transferasa, una 3-hidroxiadipil-CoA sintetasa o una 3-hidroxiadipil-CoA hidrolasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa; y (H) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA reductasa; una 3-hidroxiadipil-CoA transferasa, una 3-hidroxiadipil-CoA sintetasa o una 3-hidroxiadipil-CoA hidrolasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadienoato descarboxilasa.

En algunos aspectos, el organismo microbiano que no se origina naturalmente comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete ácidos nucleico exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 1,3-butadieno. Por ejemplo, el organismo microbiano puede comprender ácidos nucleico exógenos que codifican cada una de las enzimas seleccionadas de: (A) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato descarboxilasa; una 3-oxopent-4-enoato reductasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa; (B) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato descarboxilasa; una 3-oxopent-4-enoato reductasa; una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadienoato descarboxilasa; (C)

una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato reductasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa; (D) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato reductasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadienoato descarboxilasa; (E) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato reductasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa; (F) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato reductasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 2,4-pentadienoato descarboxilasa; (G) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA reductasa; una 3-hidroxiadipil-CoA transferasa, una 3-hidroxiadipil-CoA sintetasa o una 3-hidroxiadipil-CoA hidrolasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa; y (H) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA reductasa; una 3-hidroxiadipil-CoA transferasa, una 3-hidroxiadipil-CoA sintetasa o una 3-hidroxiadipil-CoA hidrolasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadienoato descarboxilasa.

En algunas modalidades, la invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe anteriormente, en donde dicho microorganismo microbiano comprende además: (i) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa; (ii) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato

carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H2 hidrogenasa; o (iii) al menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H2 hidrogenasa, y combinaciones de las mismas. En algunos aspectos de la invención, el organismo microbiano que comprende (i) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, ferredoxina, y combinaciones de los mismos. En algunos aspectos de la invención, el organismo microbiano que comprende (ii) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, y combinaciones de las mismas.

En algunas modalidades, la invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe anteriormente, en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (i) comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa; en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (ii) comprende cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (iii) comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una CO deshidrogenasa y una H_2 hidrogenasa.

En algunos aspectos, la invención proporciona tal organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe en la presente, en donde al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo. En otro aspecto, el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico. En algunas modalidades, la invención proporciona un método para producir 1,3-butadieno, que comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe en la presente bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 1,3-butadieno.

En algunas modalidades, la invención proporciona un organismo

microbiano que no se origina naturalmente, que comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad suficiente para producir 2,4-pentadienoato, dicha trayectoria de 2,4-pentadienoato seleccionada de: (A) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato descarboxilasa; una 3-oxopent-4-enoato reductasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; (B) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato reductasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; (C) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato reductasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y (D) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA reductasa; una 3-hidroxiadipil-CoA transferasa, una 3-hidroxiadipil-CoA sintetasa o una 3-hidroxiadipil-CoA hidrolasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa.

En algunos aspectos, el organismo microbiano comprende dos, tres, cuatro, cinco, o seis ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato. Por ejemplo, el organismo microbiano puede comprender ácidos nucleico exógenos que codifican cada una de las enzimas seleccionadas de: (A) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato descarboxilasa; una 3-oxopent-4-enoato reductasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; (B) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato reductasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; (C) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato reductasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y

una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y (D) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA reductasa; una 3-hidroxiadipil-CoA transferasa, una 3-hidroxiadipil-CoA sintetasa o una 3-hidroxiadipil-CoA hidrolasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa.

En algunas modalidades, la invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe anteriormente, en donde dicho microorganismo microbiano comprende además: (i) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa; (ii) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H2 hidrogenasa; o (iii) al menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H2 hidrogenasa, y combinaciones de las mismas. En algunos aspectos, el organismo microbiano que comprende (i) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, ferredoxina, y combinaciones de las mismas. En algunos aspectos, el organismo microbiano que comprende (ii) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, y combinaciones de las mismas.

En algunos aspectos, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que comprende (i) comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa; en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (ii) comprende cinco ácidos nucleicos exógenos que

codifican una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (iii) comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una CO deshidrogenasa y una H_2 hidrogenasa.

En algunos aspectos, la invención proporciona tal organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe anteriormente, en donde al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo. En algunos aspectos, el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

En algunas modalidades, la invención proporciona un método para producir 2,4-pentadienoato, que comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe en la presente bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 2,4-pentadienoato.

En algunas modalidades, la invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente, que comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 1,3-butadieno que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria de enzima 1,3-butadieno expresada en una cantidad suficiente para producir 1,3-butadieno, dicha trayectoria de 1,3-butadieno seleccionada de: (A) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa; (B) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; (C) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; (D) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa; (E) una malonil-CoA:acetil-

CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; (F) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; (G) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa; (H) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; (I) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; (J) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa; (K) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; (L) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; (M) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa; (N) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-

dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; y (O) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa.

En algunas modalidades, la invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe anteriormente, en donde dicho microorganismo microbiano comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete ácidos nucleico exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 1,3-butadieno. Por ejemplo, en algunos aspectos, el organismo microbiano comprende ácidos nucleico exógenos que codifican cada una de las enzimas seleccionadas de: (A) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa; (B) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; (C) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; (D) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa; (E) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; (F) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; (G) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa

(reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa; (H) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; (I) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; (J) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa; (K) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; (L) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; (M) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa; (N) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; y (O) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa.

En algunas modalidades, la invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe anteriormente, en donde dicho microorganismo microbiano comprende además: (i) una trayectoria

reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa; (ii) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H2 hidrogenasa; o (iii) al menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H2 hidrogenasa, y combinaciones de las mismas. En algunos aspectos, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que comprende (i) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, ferredoxina, y combinaciones de las mismas. En algunos aspectos, el organismo microbiano que comprende (ii) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, y combinaciones de las mismas. En algunos aspectos, el organismo microbiano que comprende (i) comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa; en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (ii) comprende cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (iii) comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una CO deshidrogenasa y una H_2 hidrogenasa.

En algunos aspectos, el organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe en la presente incluye, en donde al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo. En algunos aspectos, el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo

sustancialmente anaeróbico.

En algunas modalidades, la invención proporciona un método para producir 1,3-butadieno, que comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe en la presente bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 1,3-butadieno.

En algunas modalidades, la invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente, que comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad suficiente para producir 2,4-pentadienoato, dicha trayectoria de 2,4-pentadienoato seleccionadas de: (A) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; (B) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; (C) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; (D) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y (E) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa.

En algunos aspectos, el organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe anteriormente comprende dos, tres, cuatro, cinco o seis ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato. Por ejemplo, el organismo microbiano comprende ácidos nucleico exógenos que codifican cada una de las enzimas seleccionadas de: (A) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato

reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; (B) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; (C) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; (D) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y (E) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa.

En algunas modalidades, la invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe anteriormente, en donde dicho microorganismo microbiano comprende además: (i) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa; (ii) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H2 hidrogenasa; o (iii) al menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H2 hidrogenasa, y combinaciones de las mismas. En algunos aspectos, el organismo microbiano que comprende (i) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina

oxidorreductasa, ferredoxina, y combinaciones de las mismas. En algunos aspectos, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que comprende (ii) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, y combinaciones de las mismas.

En algunos aspectos, el organismo microbiano como se describe anteriormente que comprende (i) comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa; en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (ii) comprende cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (iii) comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una CO deshidrogenasa y una H_2 hidrogenasa.

En algunos aspectos, el organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe en la presente incluye, en donde al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo. En algunos aspectos, el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

En algunas modalidades, la invención proporciona un método para producir 2,4-pentadienoato, que comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe anteriormente bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 2,4-pentadienoato.

En algunas modalidades, la invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente, que comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 3-buteno-1-ol que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de 3-buteno-1-ol expresada en una cantidad suficiente para producir 3-buteno-1-ol, dicha trayectoria de 3-buteno-1-ol seleccionada de: (A) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; (B) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-

dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; (C) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; (D) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; (E) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; (F) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; (G) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; (H) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; (I) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y (J) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa.

En algunos aspectos, el organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe anteriormente comprende dos, tres, cuatro o cinco ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 3-buteno-1-ol. Por ejemplo, en algunos aspectos, el organismo microbiano comprende ácidos nucleico exógenos que codifican cada una de las enzimas seleccionadas de: (A) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una

3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; (B) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; (C) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; (D) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; (E) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; (F) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; (G) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; (H) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; (I) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y (J) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa.

En algunas modalidades, la invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe anteriormente, en donde dicho microorganismo microbiano comprende además: (i) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido

nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa; (ii) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H2 hidrogenasa; o (iii) al menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H2 hidrogenasa, y combinaciones de las mismas. En algunos aspectos, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que comprende (i) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, ferredoxina, y combinaciones de las mismas. En algunos aspectos, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que comprende (ii) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, y combinaciones de las mismas. En algunos aspectos, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que comprende (i) comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa; en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (ii) comprende cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (iii) comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una CO deshidrogenasa y una H_2 hidrogenasa.

En algunos aspectos, el organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe en la presente incluye, en donde al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo. En algunos aspectos, el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

En algunas modalidades, la invención proporciona un método para producir 3-buteno-1-ol, que comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente como se describe anteriormente bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 3-buteno-1-ol.

En algunas modalidades, la invención proporciona un método para producir 1,3-butadieno que comprende, cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que puede producir 3-buteno-1-ol como se describe anteriormente bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 3-buteno-1-ol, y convertir químicamente tal 3-buteno-1-ol a 1,3-butadieno. Se entiende que métodos para convertir químicamente 3-buteno-1-ol a 1,3-butadieno son bien conocidos en la técnica.

Esta invención también se dirige, en parte a trayectorias biosintéticas diseñadas por ingeniería para mejorar el flujo de carbono a través de un intermediario del metabolismo central en ruta a 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno. La presente invención proporciona organismos microbianos que no se originan naturalmente que tienen uno o más genes exógenos que codifican enzimas que pueden catalizar varias transformaciones enzimáticas en ruta a 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno. En algunas modalidades, estas transformaciones enzimáticas son parte del ciclo del ácido tricarboxílico reductivo (RTCA) y son usadas para mejorar los rendimientos del producto, que incluyen pero no se limitan a, materias primas de carbono a base de carbohidratos.

En numerosas trayectorias diseñadas por ingeniería, la realización de rendimientos máximos de productos con base en la materia prima de carbohidratos es obstruida por equivalentes de reducción insuficientes o por pérdidas de equivalentes de reducción y/o carbono a derivados. De conformidad con algunas modalidades, la presente invención incrementa los rendimientos de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno mediante (i) mejoramiento de la fijación de carbono vía el ciclo reductivo de TCA, y/o (ii) accesando a equivalentes de reducción adicionales de fuentes de carbono gaseosas y/o componentes de syngas tales como CO, CO_2, y/o H_2. Además del syngas, otras fuentes de tales gases incluyen, pero no se limitan a, la atmósfera, ya sea como se encuentra en la naturaleza o generada.

El ciclo de ácido tricarboxílico reductivo de fijación de CO_2 (RTCA) es una trayectoria anabólica endergénica de asimilación de CO_2 la cual usa equivalentes de reducción y ATP (Figura 22). Un cambio del ciclo de RTCA asimila dos moles de CO_2 en una mole de acetil-CoA, o cuatro moles de CO_2 en una mole

de oxaloacetato. Esta disponibilidad adicional de acetil-CoA mejora el rendimiento teórico máximo de las moléculas del producto derivadas de materias primas de carbono a base de carbohidratos. Los carbohidratos ejemplares incluyen pero no se limitan a glucosa, sacarosa, xilosa, arabinosa y glicerol.

En algunas modalidades, el ciclo de TCA reductivo, acoplado con deshidrogenasa de monóxido de carbono y/o enzimas hidrogenasas, puede ser empleado para permitir la utilización de syngas, CO_2, CO, H_2, y/o otras fuentes de carbono gaseoso por microorganismos. El gas de síntesis (syngas), en particular es una mezcla de principalmente H_2 y CO, algunas veces incluyendo algunas cantidades de CO_2, que puede ser obtenidas vía gasificación de cualquiera de las materias primas orgánicas, tales como carbón vegetal, aceite de carbón vegetal, gas natural, biomasa o materia orgánica residual. Numerosos procesos de gasificación han sido desarrollados, y la mayoría de los diseños se basan en oxidación parcial, donde la limitación de oxígeno evita la completa combustión de materiales orgánicos a altas temperaturas (500-1500°C) para proporcionar syngas como una mezcla 0.5:1-3:1 de H_2/CO. Además del carbón vegetal, la biomasa de muchos tipos se ha usado para la producción de syngas y representa una materia flexible y de bajo costo para la producción biológica de químicos y combustibles renovables. El dióxido de carbono puede ser proporcionado de la atmósfera o en forma condensada, por ejemplo, de un cilindro de tanque, o vía sublimación de CO_2 sólido. De manera similar, CO y el gas de hidrógeno pueden ser proporcionados en forma de reactivo y/o mezclados en cualquier relación deseada. Otras formas de carbono gaseoso pueden incluir, por ejemplo, metanol o solventes orgánicos volátiles similares.

Los componentes de gas de síntesis y/o otras fuentes de carbono pueden proporcionar suficiente CO_2, equivalentes de reducción y ATP para que opere el ciclo de TCA reductivo. Un cambio del ciclo de RTCA asimila dos moles de CO_2 en una mole de acetil-CoA y requiere 2 ATP y 4 equivalente de reducción. El CO y/o H_2 pueden proporcionar equivalentes de reducción por medio de deshidrogenasa de monóxido de carbono e enzimas hidrogenasas, respectivamente. Los equivalentes de reducción pueden venir en la forma de NADH, NADPH, FADH, quinonas reducidas, ferredoxinas reducidas, flavodoxinas reducidas y tiorredoxinas. Los equivalentes de reducción, particularmente NADH, NADPH, y ferredoxina reducida, pueden servir como cofactores para las enzimas del ciclo RTCA, por ejemplo, malato deshidrogenasa, fumarato reductasa, alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa (alternativamente conocidas como 2-

oxoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, alfa-cetoglutarato sintasa, o 2-oxoglutarato sintasa), piruvato:ferredoxina oxidorreductasa e isocitrato deshidrogenasa. Los electrones de estos equivalentes de reducción pueden alternativamente pasar a través de una cadena de transporte de electrón produciendo un gradiente de ión donde son pasados a un aceptor tal como oxígeno, nitrato, iones de metal oxidado, protones, o un electrodo. El gradiente de ión puede entonces ser usado para generación de ATP vía una ATP sintasa o enzima similar.

El ciclo de TCA reductivo fue primero reportado en la bacteria fotosintética de azufre verde *Chlorobium limicola* (Evans *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 55:928-934 (1966)). Trayectorias similares han sido caracterizadas en algunos procariotas (proteobacteria, bacteria de azufre verde y bacteria termofílica Knallgas) y archaea dependiente del azufre (Hugler *et al., J. Bacteriol.* 187:3020-3027 (2005; Hugler *et al., Environ. Microbiol.* 9:81-92 (2007). En algunos casos, los ciclos TCA reductivos y oxidativos (Krebs) están presentes en el mismo organismo (Hugler *et al., supra* (2007); Siebers *et al., J. Bacteriol.* 186:2179-2194 (2004)). Algunos anaerobios obligados y metanógenos poseen ciclos de TCA oxidativos o reductivos incompletos que pueden funcionar para sintetizar los intermediarios biosintéticos (Ekiel *et al., J. Bacteriol.* 162:905-908 (1985); Wood *et al., FEMS Microbiol. Rev.* 28:335-352 (2004)).

Las enzimas de fijación de carbono claves del ciclo de TCA reductivo son alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, piruvato:ferredoxina oxidorreductasa e isocitrato deshidrogenasa. El carbono adicional puede ser fijado durante la conversión de fosfoenolpiruvato a oxaloacetato por fosfoenolpiruvato carboxilasa o fosfoenolpiruvato carboxicinasa carboxicinasa o por conversión de piruvato a malato por enzima málica.

Muchas de las enzimas en el ciclo TCA son reversibles y pueden catalizar reacciones en las direcciones reductiva y oxidativa. Sin embargo, algunas reacciones del ciclo TCA son irreversibles *in vivo* y de este modo diferentes enzimas son usadas para catalizar estas reacciones en las direcciones requeridas para el ciclo TCA reverso. Estas reacciones son: (1) conversión de citrato a oxaloacetato y acetil-CoA, (2) conversión de fumarato a succinato, y (3) conversión de succinil-CoA a alfa-cetoglutarato. En el ciclo TCA, se forma citrato de la condensación de oxaloacetato y acetil-CoA. La reacción reversa, desdoblamiento de citrato a oxaloacetato y acetil-CoA, es dependiente de ATP y es catalizada por ATP-citrato liasa, o citril-CoA sintetasa y citril-CoA liasa.

Alternativamente, citrato liasa puede ser acoplada a acetil-CoA sintetasa, una acetil-CoA transferasa, o fosfotransacetilasa y acetato cinasa para formar acetil-CoA y oxaloacetato de citrato. La conversión de succinato a fumarato es catalizada por succinato deshidrogenasa mientras la reacción reversa es catalizada por fumarato reductasa. En el ciclo TCA, se forma succinil-CoA de la descarboxilación dependiente de $NAD(P)^+$ de alfa-cetoglutarato por el complejo alfa-cetoglutarato deshidrogenasa. La reacción reversa es catalizada por alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa.

Un organismo capaz de utilizar el ciclo del ácido tricarboxílico reverso para permitir la producción de productos derivados de acetil-CoA en 1) CO, 2) CO_2 y H_2, 3) CO y CO_2, 4) gas de síntesis que comprende CO y H_2, y 5) gas de síntesis u otras fuentes de carbono gaseosas que comprenden CO, CO_2, y H_2 pueden incluir cualquiera de las siguientes actividades de enzimas: ATP-citrato liasa, citrato liasa, aconitasa, isocitrato deshidrogenasa, alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, succinil-CoA sintetasa, succinil-CoA transferasa, fumarato reductasa, fumarasa, malato deshidrogenasa, acetato cinasa, fosfotransacetilasa, acetil-CoA sintetasa, acetil-CoA transferasa, piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, deshidrogenasa de monóxido de carbono, hidrogenasa, y ferredoxina (véase Figura 23). Enzimas y los genes correspondientes requeridos para estas actividades son descritos en la presente anteriormente.

El carbono de syngas u otras fuentes de carbono gaseosas pueden ser fijados vía el ciclo TCA reverso y componentes de los mismos. Específicamente, la combinación de ciertos componentes de la trayectoria de utilización del gas de carbono con las trayectorias para la formación de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno de acetil-CoA resulta en altos rendimientos de estos productos proporcionando un mecanismo eficiente para fijar el carbono presente en el dióxido de carbono, alimentado exógenamente o producido endógenamente de CO, en acetil-CoA.

En algunas modalidades, una trayectoria de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno en un organismo microbiano que no se origina naturalmente de la invención puede utilizar cualquier combinación de (1) CO, (2) CO_2, (3) H_2, o mezclas de los mismos para mejorar los rendimientos de las etapas biosintéticas que involucran reducción, que incluyen adición a accionar el ciclo de TCA reductivo.

En algunas modalidades un organismo microbiano que no se origina

naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA. Al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa; y al menos una enzima exógena seleccionada de una deshidrogenasa de monóxido de carbono, una hidrogenasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, y una ferredoxina, expresada en una cantidad suficiente para permitir la utilización de (1) CO, (2) CO_2, (3) H_2, (4) CO_2 y H_2, (5) CO y CO_2, (6) CO y H_2, o (7) CO, CO_2, y H_2.

En algunas modalidades un método incluye cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de a 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno también que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA. Al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa. Adicionalmente, tal organismo can también incluye al menos una enzima exógena seleccionada de una deshidrogenasa de monóxido de carbono, una hidrogenasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, y una ferredoxina, expresada en una cantidad suficiente para permitir la utilización de (1) CO, (2) CO_2, (3) H_2, (4) CO_2 y H_2, (5) CO y CO_2, (6) CO y H_2, o (7) CO, CO_2, y H_2 para producir un producto.

En algunas modalidades un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno incluye además al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA expresada en una cantidad suficiente para mejorar el flujo de carbono a través de acetil-CoA. Al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, isocitrato deshidrogenasa, aconitasa y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa.

En algunas modalidades un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima expresada en una cantidad suficiente para mejorar la capacidad de equivalentes de reducción en la presencia de monóxido de carbono y/o hidrógeno, de este modo incrementando el rendimiento de productos rédox limitados vía materias primas de carbono a base de carbohidratos. Al menos un ácido nucleico exógeno

se selecciona de una deshidrogenasa de monóxido de carbono, una hidrogenasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, y una ferredoxina. En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para mejorar la capacidad de equivalentes de reducción en la presencia de monóxido de carbono o hidrógeno de este modo incrementando el rendimiento de productos rédox limitados vía materias primas de carbono a base de carbohidratos, tales como azúcares o fuentes de carbono gaseosas, el método incluye cultivar este organismo microbiano que no se origina naturalmente bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno.

En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno incluye dos ácidos nucleicos exógenos, cada uno codificando una trayectoria reductora de la enzima TCA. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno incluye tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una trayectoria reductora de la enzima TCA. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente incluye tres ácidos nucleicos exógenos que codifican una ATP-citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente incluye tres ácidos nucleicos exógenos que codifican una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa.

En algunas modalidades, los organismos microbianos que no se originan naturalmente que tienen una trayectoria de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno además incluyen un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, y combinaciones de las mismas.

En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno incluye además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de deshidrogenasa de monóxido de carbono, acetil-CoA sintasa, ferredoxina, NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa y combinaciones de las

mismas.

En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno utiliza una materia prima de carbono seleccionada de (1) CO, (2) CO_2, (3) CO_2 y H_2, (4) CO y H_2, o (5) CO, CO_2, y H_2. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno utiliza hidrógeno para equivalentes de reducción. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno utiliza CO para equivalentes de reducción. En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno utiliza combinaciones de CO e hidrógeno para equivalentes de reducción.

En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno incluye además uno o más ácidos nucleicos que codifican una enzima seleccionada de una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una piruvato carboxilasa, y una enzima málica.

En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno incluye además uno o más ácidos nucleicos que codifican una enzima seleccionada de una malato deshidrogenasa, una fumarasa, una fumarato reductasa, una succinil-CoA sintetasa, y una succinil-CoA transferasa.

En algunas modalidades, el organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno incluye además al menos un ácido nucleico exógeno que codifica a citrato liasa, una ATP-citrato liasa, una citril-CoA sintetasa, una citril-CoA liasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, y una ferredoxina.

En algunas modalidades, las materias primas de carbono y otras fuentes de absorción celular tales como fosfato, amoníaco, sulfato, cloruro y otros halógenos pueden ser elegidas para alterar la distribución isotópica de los átomos presentes en 1,3-butadieno o cualquier intermediario de la trayectoria de 1,3-butadieno. Las varias materias primas de carbono y otras fuentes de absorción enumeradas anteriormente serán referidas en la presente, colectivamente, como

"fuentes de absorción". Las fuentes de absorción pueden proporcionar enriquecimiento isotópico para cualquier átomo presente en la trayectoria del producto de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno o cualquier intermediario en la ruta de la misma. Las varias materias primas de carbono y otras fuentes de absorción enumeradas anteriormente serán referidas en la presente, colectivamente, como "fuentes de absorción". Las fuentes de absorción pueden proporcionar enriquecimiento isotópico para cualquier átomo presente en el intermediario de la trayectoria del producto de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno o tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno que incluye cualquiera de las impurezas de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno generadas en divergencia a distancia de la trayectoria en cualquier punto. El enriquecimiento isotópico puede ser logrado por cualquier átomo objetivo que incluye, por ejemplo, carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, cloruro u otros halógenos.

En algunas modalidades, las fuentes de absorción pueden ser seleccionadas para alterar las relaciones de carbono-12, carbono-13, y carbono-14. En algunas modalidades, las fuentes de absorción pueden ser seleccionadas para alterar las relaciones de oxígeno-16, oxígeno-17 y oxígeno-18. En algunas modalidades, las fuentes de absorción pueden ser seleccionadas para alterar las relaciones de hidrógeno, deuterio, y tritio. En algunas modalidades, las fuentes de absorción pueden ser seleccionadas para alterar las relaciones de nitrógeno-14 y nitrógeno-15. En algunas modalidades, las fuentes de absorción pueden ser seleccionadas para alterar las relaciones de azufre-32, azufre-33, azufre-34, y azufre-35. En algunas modalidades, las fuentes de absorción pueden ser seleccionadas para alterar las relaciones de fósforo-31, fósforo-32, y fósforo-33 ratios. En algunas modalidades, las fuentes de absorción pueden ser seleccionadas para alterar las relaciones de cloro-35, cloro-36, y cloro-37.

En algunas modalidades, una relación isotópica objetivo de una fuente de absorción puede ser obtenida vía enriquecimiento químico de la fuente

de absorción. Tales fuentes de absorción isotópicamente enriquecidas pueden ser adquiridas comercialmente o preparadas en el laboratorio. En algunas modalidades, una relación isotópica objetivo de una fuente de absorción puede ser obtenida por elección de origen de la fuente de absorción en la naturaleza. En algunas de tales modalidades, una fuente de carbono, por ejemplo, se puede seleccionar de una fuente de carbono derivada de combustible fósil, la cual puede ser relativamente agotada de carbono-14, o una fuente de carbono ambiental, tal como CO_2, la cual puede poseer una cantidad más grande de carbono-14 que sus contrapartes derivadas de petróleo.

El enriquecimiento isotópico es fácilmente evaluado por espectrometría de masas usando técnicas conocidas en el arte tales como Espectrometría de Masas de Relación de Isótopo Estable (SIRMS) y Fraccionamiento Isotópico Natural Específico del Sitio por Resonancia Magnética Nuclear (SNIF-NMR). Tales técnicas espectrales de masas pueden ser integradas con técnicas de separación tales como cromatografía líquida (LC) y/o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En algunas modalidades, la presente invención proporciona tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno o un intermediario de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno que tiene una relación de carbono-12, carbono-13, y carbono-14 que refleja una fuente de absorción de carbono atmosférico. En algunas de tales modalidades, la fuente de absorción es CO_2. En algunas modalidades, la presente invención proporciona intermediarios de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno, que tienen una relación de carbono-12, carbono-13, y carbono-14 que refleja la fuente de absorción de carbono a base de petróleo. En algunas modalidades, la presente invención proporciona tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno o un intermediario de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno que tiene una relación de carbono-12, carbono-13, y carbono-14 que se obtiene por una combinación de una

fuente de absorción de carbono atmosférico con una fuente de absorción a base de petróleo. Tal combinación de fuentes de absorción es un medio por el cual las relaciones de carbono-12, carbono-13, y carbono-14 pueden ser variadas.

Por consiguiente, dadas las enseñanzas y guías proporcionadas en la presente, aquellos expertos en la técnica entenderán que un organismo microbiano que no se origina naturalmente puede ser producido que secreta los compuestos biosintetizados de la invención cuando se hace crecer en una fuente de carbono tal como un carbohidrato. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, tolueno, benceno, *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno y cualquiera de los metabolitos intermediarios en la trayectoria de tolueno, benceno, *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. Todo lo que se requiere es diseñar por ingeniería una o más de las actividades de enzimas o proteínas requeridas para lograr la biosíntesis del compuesto o intermediario deseado que incluye, por ejemplo, inclusión de algunas o todas las trayectorias biosintéticas del tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. Por consiguiente, la invención proporciona un organismo microbiano que no se origina naturalmente que produce y/o secreta tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno cuando se hace crecer en un carbohidrato u otra fuente de carbono y produce y/o secreta cualquiera de los metabolitos intermediarios mostrados en la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno cuando se hace crecer en un carbohidrato u otra fuente de carbono. Los organismos microbianos que producen tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno de la invención pueden iniciar la síntesis de un intermediario, por ejemplo, fenilalanina, fenilpiruvato, fenilacetaldehído, fenilacetato, benzoil-CoA, 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA, [(3-oxo-3-fenilpropionil)oxi] fosfonato, benzoil acetato, acetofenona, 1-feniletanol, *trans,trans*-muconato, *cis,trans*-muconato, *cis,cis*-muconato, *trans*-2,4-pentadienoato, y *cis*-2,4-pentadienoato. Como un ejemplo adicional, un

intermediario de la trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato puede ser 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato o C-metil-D-eritritol-4-fosfato (véase Ejemplo III y Figura 5). Una trayectoria del intermediario *p*-toluato puede ser, por ejemplo, 2,4-dihidroxi-5-metil-6-[(fosfonooxi)metil]oxan-2-carboxilato, 1,3-dihidroxi-4-metil-5-oxociclohexan-1-carboxilato, 5-hidroxi-4-metil-3-oxociclohex-1-eno-1-carboxilato, 3,5-dihidroxi-4-metilciclohex-1-eno-1-carboxilato, 5-hidroxi-4-metil-3-(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato, 5-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]-4-metil-3-(fosfonooxi)ciclohex-1-eno-1-carboxilato, o 3-[(1-carboxiet-1-en-1-il)oxi]-4-metilciclohexa-1,5-dieno-1-carboxilato (véase Ejemplo IV y Figura 6). Un intermediario de tereftalato puede ser, por ejemplo, alcohol 4-carboxibencílico o 4-carboxibenzaldehído (véase Ejemplo V y Figura 7).

Como se describe en la presente, *p*-toluato y benzoato son intermediarios ejemplares que pueden ser el sujeto de un organismo microbiano que no se origina naturalmente. Tales carboxilatos pueden ocurrir en forma ionizada o forma completamente protonada. Por consiguiente, el sufijo "-ato," o la forma de ácido, puede ser usado de manera intercambiable para describir tanto la forma de ácido libre así como también cualquier forma desprotonada, en particular puesto que la forma ionizada se conoce por depender del pH en el cual el compuesto se encuentra. Se entiende que productos de propionato accesibles de conformidad con la presente invención incluyen formas de éster, tales como ésteres de O-carboxilato y S-carboxilato. O- y S-carboxilatos pueden incluir alquilo inferior, que son carboxilatos de cadena recta o ramificada, de C1 a C6. Algunos de tales O- o S-carboxilatos incluyen, sin limitación, O- o S-carboxilatos de metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, i-propilo, sec-butilo, y terc-butilo, pentilo, hexilo, cualquiera de los cuales puede poseer además una insaturación, proporcionando por ejemplo, O- o S-carboxilatos de propenilo, butenilo, pentilo, y hexenilo. Los O-carboxilatos pueden ser el producto de una trayectoria biosintética. O-carboxilatos ejemplares accesados vía trayectorias biosintéticas pueden incluir, sin limitación, metil propionato, etil propionato, y n-propil propionato. Otros O-propionatos biosintéticamente accesibles pueden incluir grupos de cadena media a larga, es decir ésteres de O-propionato, de C7-C22, derivados de alcoholes grasos, tales como heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, laurilo, tridecilo, miristilo, pentadecilo, cetilo, palmitolilo, heptadecilo, estearilo, nonadecilo, araquidilo, heneicosilo, y alcoholes de behenilo, cualquiera de los cuales puede ser opcionalmente ramificado y/o contener insaturaciones. Los ésteres de O-propionato también pueden ser accesados vía procesos químicos o bioquímicos, tales como

esterificación de un producto de ácido carboxílico libre o transesterificación de un O- u S-propionato. Los S-carboxilatos son ejemplificados por CoA S-ésteres, cisteinil S-ésteres, alquiltioésteres, y varios aril y heteroaril tioésteres.

Los organismos microbianos que no se originan naturalmente de la invención son construidos usando métodos bien conocidos en la técnica como se ejemplifica en la presente para expresar exógenamente al menos un ácido nucleico que codifica una enzima o proteína de la trayectoria de tolueno, benceno, *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno en cantidades suficientes para producir tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. Se entiende que los organismos microbianos de la invención son cultivados bajo condiciones suficientes para producir tolueno, benceno, *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. Siguiendo las enseñanzas y guía proporcionada en la presente, los organismos microbianos que no se originan naturalmente de la invención pueden lograr biosíntesis de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno resultando en concentraciones intracelulares entre aproximadamente 0.1-200 mM o más. En general, la concentración intracelular de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno es entre aproximadamente 3-150 mM, particularmente entre aproximadamente 5-125 mM y más particularmente entre aproximadamente 8-100 mM, que incluye aproximadamente 10 mM, 20 mM, 50 mM, 80 mM, o más. Concentraciones intracelulares entre y aproximadamente en cada uno de estos rangos ejemplares también pueden lograrse de los organismos microbianos que no se originan naturalmente de la invención.

En algunas modalidades, condiciones de cultivo incluyen condiciones de crecimiento o mantenimiento anaeróbico o sustancialmente anaeróbico. Condiciones anaeróbicas ejemplares han sido descritas previamente y son bien conocidas en la técnica. Condiciones anaeróbicas ejemplares para procesos de fermentación son descritas en la presente y se describen, por ejemplo, en la publicación Estadounidense 2009/0047719, presentada el 10 de Agosto de 2007.

Cualesquiera de estas condiciones pueden ser empleadas con los organismos microbianos que no se originan naturalmente así como también otras condiciones anaeróbicas bien conocidas en la técnica. Bajo tales condiciones anaeróbicas o sustancialmente anaeróbicas, los productores de tolueno, benceno, *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno pueden sintetizar tolueno, benceno, *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno a concentraciones intracelulares de 5-10 mM o más así como también todas las otras concentraciones ejemplificadas en la presente. Se entiende que, aún aunque la descripción anterior se refiere a concentraciones intracelulares, organismos microbianos que producen tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno pueden producir tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno intracelularmente y/o secretar el producto en el medio de cultivo.

Además de las condiciones de cultivo y fermentación descritas en la presente, las condiciones de crecimiento para lograr la biosíntesis de tolueno, benceno, *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno pueden incluir la adición de un osmoprotector a las condiciones de cultivo. En ciertas modalidades, los organismos microbianos que no se originan naturalmente de la invención pueden ser sostenidos, cultivados o fermentados como se describe en la presente en la presencia de una osmoprotector. Brevemente, un osmoprotector se refiere a un compuesto que actúa como un osmolito y ayuda a un organismo microbiano como se describe en la presente a sobrevivir el estrés osmótico. Los osmoprotectores incluyen, pero no se limitan a, betaínas, aminoácidos y el azúcar trehalosa. Ejemplos no limitantes de tales son glicina betaína, pralina betaína, dimetiltestaño, dimetilsIfoniopropriónato, 3-dimetilsulfonio-2-metilproprionato, ácido pipecólico, dimetilsulfonioacetato, colina, L-carnitina y ectoina. En un aspecto, el osmoprotector es glicina betaína. Se entiende para uno de habilidad ordinaria en la técnica que la cantidad y tipo de osmoprotector adecuado para proteger un organismo microbiano descrito en la presente de estrés osmótico dependerá del organismo microbiano usado. La

cantidad de osmoprotector en las condiciones del cultivar puede ser, por ejemplo, no más de aproximadamente 0.1 mM, no más de aproximadamente 0.5 mM, no más de aproximadamente 1.0 mM, no más de aproximadamente 1.5 mM, no más de aproximadamente 2.0 mM, no más de aproximadamente 2.5 mM, no más de aproximadamente 3.0 mM, no más de aproximadamente 5.0 mM, no más de aproximadamente 7.0 mM, no más de aproximadamente 10mM, no más de aproximadamente 50mM, no más de aproximadamente 100mM o no más de aproximadamente 500mM.

Las condiciones de cultivo pueden incluir, por ejemplo, procedimientos de cultivo líquido así como también fermentación y otros procedimientos de cultivo a escala mayor. Como se describe en la presente, rendimientos particularmente útiles de los productos biosintéticos de la invención pueden ser obtenidos bajo condiciones de cultivo anaeróbicas o sustancialmente anaeróbicas.

Como se describe en la presente, una condición de crecimiento ejemplar para lograr la biosíntesis de tolueno, benceno, *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno incluye condiciones de fermentación o cultivo anaeróbicas. En ciertas modalidades, los organismos microbianos que no se originan naturalmente de la invención puede ser sostenidos, cultivados o fermentados bajo condiciones anaeróbicas o sustancialmente anaeróbicas. Brevemente, las condiciones anaeróbicas se refieren a un ambiente desprovisto de oxígeno. Las condiciones sustancialmente anaeróbicas incluyen, por ejemplo, un cultivo, fermentación de lote o fermentación continua de manera que la concentración de oxígeno disuelto en el medio permanece entre 0 y 10% de saturación. Condiciones sustancialmente anaeróbicas también incluyen células que crecen o reposan en medio líquido o en un agar sólido dentro de una cámara sellada mantenida con una atmósfera de menos de 1% de oxígeno. El porcentaje de oxígeno puede ser mantenido mediante, por ejemplo, rociar el cultivo con una mezcla de N_2/CO_2 mixture u otro gas o gases sin oxígeno adecuados.

Las condiciones de cultivo descritas en la presente puede ser escaladas y hacerse crecer continuamente para la manufacturación de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. Procedimientos de crecimiento ejemplares incluyen, por ejemplo,

fermentación de alimentación por lotes y separación de lotes; fermentación de alimentación por lotes y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Todos estos procesos son bien conocidos en la técnica. Procedimientos de fermentación son particularmente útiles para la producción biosintética de cantidades comerciales de tolueno, benceno, *p*-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. En general, y como con procedimientos de cultivo no continuos, la producción continua y/o casi continua de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno incluirá cultivar un organismo que produce tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno que no se origina naturalmente de la invención en nutrientes y medios suficientes para sostener y/o casi sostener el crecimiento en una fase exponencial. El cultivo continuo bajo tales condiciones puede incluir, por ejemplo, creciendo por el día 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días o más. Adicionalmente, el cultivo continuo puede incluir periodos de tiempo prolongados de 1 semana, 2, 3, 4 ó 5 o más semanas y hasta varios meses. Alternativamente, organismos de la invención pueden ser cultivados por horas, si es adecuado para una aplicación particular. Se entiende que las condiciones de cultivo continuas y/o casi continuas también pueden incluir todos los intervalos de tiempo entre estos periodos ejemplares. Se entiende además que el tiempo de cultivo del organismo microbiano de la invención es por un periodo de tiempo suficiente para producir una cantidad suficiente de producto para un propósito deseado.

Los procedimientos de fermentación son bien conocidos en la técnica. Brevemente, la fermentación para la producción biosintética de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno se puede utilizar en, por ejemplo, fermentación de alimentación por lotes y separación de lotes; fermentación de alimentación por lotes y separación continua, o fermentación continúa y separación continúa. Ejemplos de procedimientos de lotes y fermentación continua son bien conocidos en la técnica.

Además de los procedimientos de fermentación anteriores usando los productores de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-

pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno de la invención para la producción continua de cantidades sustanciales de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno, los productores de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno también pueden ser, por ejemplo, simultáneamente sometidos a procedimientos de síntesis química para convertir el producto a otros compuestos o el producto puede ser separado del cultivo de fermentación y secuencialmente sometido a conversión química para convertir el producto a otros compuestos, si se desea.

Para generar productores mejores, la modelación metabólica se puede utilizar para optimizar las condiciones de crecimiento. La modelación también puede ser usada para diseñar genes agénicos que adicionalmente optimizan la utilización de la trayectoria (véase, por ejemplo, publicaciones de Patentes US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 y US 2004/0009466, y Patente Estadounidense No. 7,127,379). El análisis de modelación permite predicciones confiables de los efectos en el crecimiento celular de cambiar el metabolismo hacia la producción más eficiente de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno.

Un método computacional para identificar y diseñar alteraciones metabólicas para favorecer la biosíntesis de un producto deseado es el marco computacional OptKnock (Burgard *et al.,* Biotechnol. Bioeng. 84:647-657 (2003)). OptKnock es un programa de simulación y modelación metabólica que sugiere estrategias de supresión o interrupción de gen que resultan en microorganismos genéticamente estales los cuales producen en exceso el producto objetivo. Específicamente, el marco examina las redes metabólicas y/o bioquímicas completas de un microorganismo para sugerir manipulaciones genéticas que fuerzan al bioquímico deseado para llegar a un derivado obligatorio del crecimiento celular. Acoplando la producción bioquímica con el crecimiento celular a través de supresiones de gen estratégicamente colocadas u otras alteraciones de gen funcional, las presiones de selección de crecimiento impuestas en las cepas diseñadas por ingeniería después de largos periodos de tiempo en un

biorreactor conducen a mejoramientos en el desempeño como un resultado de la producción bioquímica acoplada al crecimiento por compulsión. Finalmente, cuando las supresiones del gen son construidas existe una posibilidad insignificante de que las cepas designadas reviertan a sus estados de tipo nativo debido a que los genes seleccionados por OptKnock están siendo completamente removidos del genoma. Por lo tanto, esta metodología computacional puede ser usada para ya sea identificar trayectorias alternativas que conduzcan a la biosíntesis de un producto deseado o usar en conjunto con los organismos microbianos que no se originan naturalmente para optimización adicional de la biosíntesis de un producto deseado.

Brevemente, OptKnock es un término usado en la presente para referirse a un método y sistema computacional para modelar el metabolismo celular. El programa OptKnock se refiere a un marco de modelos y métodos que incorporan restricciones particulares en los modelos de análisis de equilibrio de flujo (FBA). Estas restricciones incluyen, por ejemplo, formación cinética cualitativa, información reguladora cualitativa, y datos experimentales de microarreglo de ADN. El OptKnock también computa soluciones a varios problemas metabólicos mediante, por ejemplo, apretar los límites del flujo derivados a través de los modelos de equilibrio de flujo y probar subsecuentemente los límites de desempeño de las redes metabólicas en la presencia de adiciones o supresiones de gen. Los marcos computacionales de OptKnock permiten la construcción de formulaciones de modelo que permiten una consulta efectiva de los límites de desempeño y redes metabólicos y proporcionan métodos para resolver los problemas de programación lineal integrados-mezclados resultantes. Los métodos de modelación y simulación metabólica referidos en la presente como OptKnock son descritos en, por ejemplo, la Publicación Estadounidense 2002/0168654, presentada el 10 de Enero de 2002, Patente Internacional No. PCT/US02/00660, presentada el 10 de Enero de 2012, y publicación Estadounidense 2009/0047719, presentada el 10 de Agosto de 2007.

Otro método computacional para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorecen la producción biosintética de un producto es un sistema de modelación y simulación metabólica llamado SimPheny®. Este método y sistema computacional se describe en, por ejemplo, la Publicación Estadounidense 2003/0233218, presentada el 14 de Junio de 2002, y en la Solicitud de Patente International No. PCT/US03/18838, presentada el 13 de Junio de 2003. SimPheny® es un sistema computacional que puede ser usado para

producir un modelo de red *in silico* y simular el flujo de masa, energía o carga a través de las reacciones químicas de un sistema biológico para definir un espacio de solución que contiene alguna y todas las posibles funcionalidades de las reacciones químicas en el sistema, de este modo determinando un rango de actividades permitidas para el sistema biológico. Este procedimiento es referido como modelación a base de restricciones debido a que el espacio de solución es definido por restricciones tales como la estequiometria conocida de las reacciones incluidas así como también restricciones de capacidad y termodinámicas de reacción asociadas con flujos máximos a través de las reacciones. El espacio definido por estas restricciones puede ser interrogado para determinar las capacidades fenotípicas y comportamiento del sistema biológico o de sus componentes bioquímicos.

Estos procedimientos computacionales son consistentes con realidades biológicas debido a que los sistemas biológicos son flexibles y pueden alcanzar el mismo resultado en muchas formas diferentes. Los sistemas biológicos son diseñados a través de mecanismos evolucionarios que han sido restringidos por restricciones fundamentales que todos los sistemas vivos deben enfrentar. Por lo tanto, las estrategias de modelación a base de restricciones abarcan estas realidades generales. Además, la capacidad para imponer continuamente restricciones adicionales en un modelo de red vía el apriete de restricciones resulta en una reducción en el tamaño del espacio de solución, de este modo mejorando la precisión con la cual puede ser pronosticado el fenotipo o desempeño fisiológico.

Dadas las enseñanzas y guías proporcionadas en la presente, aquellos expertos en la técnica serán capaces de aplicar varias redes computacionales para modelación y simulación metabólica para diseñar e implementar la biosíntesis de un compuesto deseado en organismos microbianos hospederos. Tales métodos de modelación y simulación metabólica, por ejemplo, los sistemas computacionales ejemplificados anteriormente como SimPheny® y OptKnock. Para ilustración de la invención, algunos métodos son descritos en la presente con referencia al marco de computación OptKnock para modelación y simulación. Aquellos expertos en la técnica sabrán cómo aplicar la identificación, diseño e implementación de las alteraciones metabólicas usando OptKnock a cualquier de tales otras redes computaciones de modelación y simulación metabólica y métodos bien conocidos en la técnica.

Los métodos descritos anteriormente proporcionarán una serie de

reacciones metabólicas para alterar. La eliminación de cada reacción dentro de la serie o modificación metabólica puede resultar en un producto deseado como un producto obligatorio durante la fase de crecimiento del organismo. Debido a que se conocen las reacciones, una solución al problema de binivel de OptKnock también proporcionará el gen o genes asociados que codifican una o más enzimas que catalizan cada reacción dentro de la serie de reacciones. La identificación de una serie de reacciones y sus genes correspondientes que codifican las enzimas que participan en cada reacción es en general un proceso automatizado, realizado a través de la correlación de las reacciones con una base de datos de reacción que tiene una relación entre enzimas y genes codificantes.

Una vez identificada, las series de reacciones que están siendo alteradas para lograr la producción de un producto deseado son implementadas en la célula u organismo objetivo por alteración funcional de al menos un gen que codifica cada reacción metabólica dentro de la serie. Un medio particularmente útil para lograr la alteración funcional de la serie de reacción es por supresión de cada gen codificante. Sin embargo, en algunos casos, puede ser benéfico alterar la reacción por otras aberraciones genéticas que incluyen, por ejemplo, mutación, supresión de regiones reguladoras tales como promotores o sitios de unión cis para factores reguladores, o por truncación de la secuencia codificante en cualquiera de un número de ubicaciones. Estas últimas aberraciones, resultan en menos de la supresión total de la serie de gen que puede ser útil, por ejemplo, cuando las evaluaciones rápidas del acoplamiento de un producto son deseadas o cuando la reversión genética es menos probable que ocurra.

Para identificar soluciones productivas adicionales al problema de OptKnock de binivel descrito el cual conduce a series adicionales de reacciones para alteración o modificaciones metabólicas que pueden resultar en la biosíntesis, que incluye biosíntesis acoplada al crecimiento de un producto deseado, un método de optimización, cortes denominados entero, pueden ser implementadas. Este método procede resolviendo iterativamente el problema de OptKnock ejemplificado anteriormente con la incorporación de una restricción adicional con referencia a un corte entero en cada iteración. Las restricciones de corte interno efectivamente previenen el procedimiento de solución de elegir la misma serie exacta de reacciones identificadas en cualquier iteración previa que obligatoriamente acopla la biosíntesis del producto para crecimiento. Por ejemplo, si una modificación metabólica acoplada al crecimiento previamente identificada especifica las reacciones 1, 2 y 3 para alteración, entonces la siguiente restricción

previene a las mismas reacciones de ser simultáneamente consideradas en soluciones subsecuentes. El método de corte entero es bien conocido en la técnica y se puede encontrar descrito en, por ejemplo, Burgard *et al.,* Biotechnol. Prog. 17:791-797 (2001). Como con todos los métodos descritos en la presente con referencia a su uso en combinación con el marco computacional OptKnock para modelación y simulación metabólica, el método de corte entero para reducir la redundancia en análisis computacional iterativo, también puede ser aplicado con otros marcos computacionales bien conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, SimPheny®.

Los métodos ejemplificados en la presente permiten la construcción de células y organismos que biosintéticamente producen un producto deseado, que incluye el acoplamiento obligatorio de producción de un producto bioquímico objetivo para crecimiento de la célula u organismo diseñado por ingeniería para albergar las alteraciones genéticas identificadas. Por lo tanto, los métodos computacionales descritos en la presente permiten la identificación e implementación de modificaciones metabólicas que son identificadas por un método *in silico* seleccionado de OptKnock o SimPheny®. La serie de modificaciones puede incluir, por ejemplo, adición de una o más enzimas de la trayectoria biosintética y/o alteración funcional de una o más reacciones metabólicas, que incluyen, por ejemplo, alteración por supresión de gen.

Como se discute anteriormente, la metodología OptKnock se desarrolló con la premisa de que las redes microbianas mutantes pueden ser evolucionadas hacia sus fenotipos de máximo crecimiento computacionalmente predichos cuando se someten a largos periodos de selección de crecimiento. En otras palabras, el procedimiento aprovecha la capacidad del organismo para auto-optimizarse bajo presiones selectivas. El marco OptKnock permite la enumeración exhaustiva de combinaciones de supresión del gen que fuerzan un acoplamiento entre la producción bioquímica y el crecimiento celular basado en la estequiometria de la red. La identificación de gen óptimo/agénicos de reacción requiere la solución de un problema de optimización binivel que elige la serie de reacciones activas de manera que una solución al crecimiento óptimo para las redes resultantes produce en exceso el bioquímico de interés (Burgard *et al.,* Biotechnol. Bioeng. 84:647-657 (2003)).

Un modelo estequiométrico *in silico* del metabolismo de *E. coli* puede ser empleado para identificar genes esenciales para trayectorias metabólicas como se ejemplifica previamente y describe en, por ejemplo, publicaciones de

Patentes US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 y US 2004/0009466, y en la Patente Estadounidense No. 7,127,379. Como se describe en la presente, el marco matemático OptKnock puede ser aplicado a supresiones de gen preciso que conduce a la producción acoplada al crecimiento de un producto deseado. Además, la solución del problema de OptKnock de binivel proporciona solamente una serie de supresiones. Para enumerar todas las soluciones significantes, es decir, todas las series de agénicos que conducen a la formación de producción acoplada al crecimiento, una técnica de optimización, llamados cortes enteros, puede ser implementada. Esto vincula resolver iterativamente el problema de OptKnock con la incorporación de una restricción adicional referida como un corte entero en cada iteración, como se discute anteriormente.

Como se describe en la presente, un ácido nucleico que codifica una actividad deseada de una trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno puede ser introducido en un organismo hospedero. En algunos casos, puede ser deseable modificar una actividad de una enzima o proteína de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno para incrementar la producción de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. Por ejemplo, mutaciones conocidas que incrementan la actividad de una proteína o enzima pueden ser introducidas en una molécula de ácido nucleico codificante. Adicionalmente, los métodos de optimización pueden ser aplicados para incrementar la actividad de una enzima o proteína y/o reducir una actividad inhibidora, por ejemplo, reducir la actividad de un regulador negativo.

Tal método de optimización es evolución dirigida. La evolución dirigida es un procedimiento poderoso que involucra la introducción de mutaciones dirigidas a un gen específico para mejorar y/o alterar las propiedades de una enzima. Las enzimas mejoradas y/o alteradas pueden ser identificadas a través del desarrollo e implementación de ensayos de selección de alto rendimiento sensibles que permiten la selección automatizada de muchas variantes de enzima (por ejemplo, >104). Rondas iterativas de mutagénesis y selección típicamente son realizadas para proporcionar una enzima con propiedades optimizadas. Los

algoritmos computacionales que pueden ayudar a identificar áreas del gen para mutagénesis también han sido desarrollados y pueden reducir significantemente el número de variantes de enzima que necesitan ser generadas y seleccionadas. Se han desarrollado numerosas tecnologías de evolución dirigida (para revisiones, véase Hibbert *et al.,* Biomol.Eng 22:11-19 (2005); Huisman and Lalonde, *In* Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries pgs. 717-742 (2007), Patel (ed.), CRC Press; Otten and Quax. Biomol. Eng 22:1-9 (2005).; y Sen *et al.,* Appl Biochem.Biotechnol 143:212-223 (2007)) para ser efectivas en la creación de diversas bibliotecas variantes, y estos métodos han sido exitosamente aplicados al mejoramiento de un amplio rango de propiedades a través de muchas clases de enzimas. Las características de enzimas que han sido mejoradas y/o alteradas por tecnología de evolución dirigida incluyen, por ejemplo: selectividad/especificidad, para conversión de sustratos no naturales; estabilidad de temperatura, para procesamiento robusto de alta temperatura; estabilidad de pH, para bioprocesamiento bajo condiciones de pH superior o inferior; tolerancia del producto o sustrato, de manera que se pueden lograr altos tituladores del producto; unión (K_m), que incluyen ampliación de enlace del sustrato para incluir sustratos no naturales; inhibición (K_i), para remover la inhibición por productos, sustratos, o intermediarios claves, actividad (kcat), para incrementar los índices de reacción enzimática para lograr el flujo deseado; niveles de expresión, para incrementar los rendimientos de proteína y flujo de trayectoria total; estabilidad de oxígeno, para operación de enzimas sensibles al aire bajo condiciones aeróbicas; y actividad anaeróbica, para operación de una enzima aeróbica en la ausencia de oxígeno.

Se han desarrollado un número de métodos ejemplares para la mutagénesis y diversificación de genes para dirigir las propiedades deseadas de enzimas específicas. Tales métodos son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Cualquiera de estos pueden ser usados para alterar y/u optimizar la actividad de una enzima o proteína de la trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a EpPCR, el cual introduce mutaciones de punto aleatorio reduciendo la fidelidad de polimerasa de ADN en reacciones de PCR (Pritchard *et al.,* J. Theor.Biol. 234:497-509 (2005)); La Amplificación de Círculo Rodante propenso a Error (epRCA), la cual es similar a epPCR excepto porque un plásmido circular completo es usado como la plantilla y

6-meros aleatorios con enlaces de tiofosfato resistentes a exonucleasa en los últimos 2 nucleótidos son usados para amplificar el plásmido seguido por transformación en células en las cuales el plásmido es re-circulado en repeticiones en serie (Fujii *et al.,* Nucleic Acids Res. 32:e145 (2004); y Fujii *et al.,* Nat. Protoc. 1:2493-2497 (2006)); el ADN o Transposición de familia, lo cual típicamente involucra digestión de dos o más genes variantes con nucleasas tales como Dnase I o EndoV para generar una combinación de fragmentos aleatorios que son reensamblados por ciclos de apareamiento y extensión en la presencia de polimerasa de ADN para crear una biblioteca de genes quiméricos (Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:10747-10751 (1994); y Stemmer, Nature 370:389-391 (1994)); Extensión Escalonada (StEP), la cual vincula cebación de plantilla seguida por ciclos repetidos de 2 etapas de PCR con desnaturalización y duración muy corta de apareamiento/extensión (tan corta como 5 seg) (Zhao *et al.,* Nat. Biotechnol. 16:258-261 (1998)); Recombinación de Cebación Aleatoria (RPR), en la cual los cebadores de secuencia aleatoria son usadas para generar muchos fragmentos de DN cortos complementarios a diferentes segmentos de la plantilla (Shao *et al.,* Nucleic Acids Res 26:681-683 (1998)).

Métodos adicionales incluyen Recombinación Heteroduplos, en la cual el ADN de plásmido linearizado es usado para formar heteroduplos que son reparados por reparación de desapareamiento (Volkov *et al.,* Nucleic Acids Res. 27:e18 (1999); y Volkov *et al.,* Métodos Enzymol. 328:456-463 (2000)); Quimeragénesis Aleatoria en Plantillas Temporales (RACHITT), el cual emplea fragmentación de Dnase I y fraccionamiento de tamaño de ADN de hebra única (ssDNA) (Coco *et al.,* Nat. Biotechnol. 19:354-359 (2001)); Extensión Recombinada en plantillas Truncadas (RETT), la cual vincula cambios de plantillas de hebras de cebadores que crecen unidireccionalmente en la presencia de fragmentos de ssDNA unidireccionales usado como una combinación de plantillas (Lee *et al.,* J. Molec. Catalysis 26:119-129 (2003)); Transposición de Gen de Oligonucleótido Degenerado (DOGS), en la cual los cebadores degenerados son usados para controlar la recombinación entre moléculas; (Bergquist and Gibbs, Métodos Mol. Biol. 352:191-204 (2007); Bergquist *et al.,* Biomol. Eng. 22:63-72 (2005); Gibbs *et al., Gene* 271:13-20 (2001)); Truncación de Incremento para la Creación de Enzimas Híbridas (ITCHY), la cual crea una biblioteca combinatorial con 1 supresión de par base de un gen o fragmento de gen de interés (Ostermeier *et al.,* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:3562-3567 (1999); y Ostermeier *et al.,* Nat. Biotechnol. 17:1205-1209 (1999)); Truncación de Tio-Incremento para la Creación

de Enzimas Híbridas (THIO-ITCHY), la cual es similar a ITCHY excepto que se usan fosfotioatos dNTPs para generar truncaciones (Lutz *et al.,* Nucleic Acids Res. 29:E16 (2001)); SCRATCHY, el cual combina dos métodos para recombinar genes, ITCHY y transposición de ADN (Lutz *et al.,* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:11248-11253 (2001)); Mutagénesis de Deriva Aleatoria (RNDM), en la cual las mutaciones hechas vía epPCR son seguidas por tamizado/selección para aquellas que retienen la actividad utilizable (Bergquist *et al.,* Biomol. Eng. 22:63-72 (2005)); Mutagénesis de Saturación de Secuencia (SeSaM), un método de mutagénesis aleatoria que genera una combinación de fragmentos de longitud aleatoria usando incorporación aleatoria de un fosfotioato nucleótido y desdoblamiento, el cual se usa como una plantilla para extenderse en la presencia de bases "universales" tales como inosina, y la replicación de un complemento que contiene inosina proporciona incorporación de base aleatoria y, consecuentemente, mutagénesis (Wong *et al.,* Biotechnol. J. 3:74-82 (2008); Wong *et al.,* Nucleic Acids Res. 32:e26 (2004); y Wong *et al.,* Anal. Biochem. 341:187-189 (2005)); Transposición Sintética, la cual usa oligonucleótidos traslapantes diseñados para codificar "toda la diversidad genética en objetivos" y permite una diversidad muy alta para la progenie transpuesta (Ness *et al.,* Nat. Biotechnol. 20:1251-1255 (2002)); Tecnología de Escisión e Intercambio de Nucleótido NexT, la cual explota una combinación de incorporación de dUTP seguida por tratamiento con glicosilasa de ADN uracilo y después piperidina para realizar fermentaciones de ADN de punto final (Muller *et al.,* Nucleic Acids Res. 33:e117 (2005)).

Métodos adicionales incluyen Recombinación de Proteína Independiente de la Homología de Secuencia (SHIPREC), en la cual un enlazador es usado para facilitar la fusión entre dos genes no relacionados o distantemente relacionados, y un rango de quimeras se genera entre los dos genes, resultando en bibliotecas de híbridos de cruza única (Sieber *et al.,* Nat. Biotechnol. 19:456-460 (2001)); Gene Site Saturation Mutagenesis™ (GSSM™), en la cual los materiales de partida incluyen un plásmido de ADN de hebra doble superenrrollada (dsADN) que contiene un inserto y dos cebadores los cuales son degenerados en el sitio de mutaciones deseados (Kretz *et al.,* Métodos Enzymol. 388:3-11 (2004)); Mutagénesis de Casete Combinatorial (CCM), la cual involucra el uso de casetes de oligonucleótido corto para reemplazar regiones limitadas con un gran número de posibles alteraciones de secuencia de aminoácido (Reidhaar-Olson *et al.* Métodos Enzymol. 208:564-586 (1991); y Reidhaar-Olson *et al.* Science 241:53-57 (1988)); Mutagénesis de Casete Múltiple Combinatorial

(CMCM), la cual es esencialmente similar a CCM y usa epPCR a una tasa de mutación alta para identificar manchas de calor y regiones de calor y después extensión por CMCM para cubrir una región definida de espacio de secuencia de proteína (Reetz *et al.,* Angew. Chem. Int. Ed Engl. 40:3589-3591 (2001)); la técnica de Cepas Mutadoras, en la cual los plásmidos mutadores ts condicionales, utilizan el gen mutD5, el cual codifica una subunidad mutante de polimerasa de ADN III, para permitir incrementos de 20 a 4000-X en frecuencia de mutación natural y aleatoria durante la selección y acumulación en bloque de mutaciones deletéreas cuando la selección no se requiere (Selifonova *et al.,* Appl. Environ. Microbiol. 67:3645-3649 (2001)); Low *et al.,* J. Mol. Biol. 260:359-3680 (1996)).

Métodos ejemplares adicionales incluyen Mutagénesis A través de Look (LTM), el cual es un método de mutagénesis multidimensional que evalúa y optimiza mutaciones combinatoriales de aminoácidos seleccionados (Rajpal *et al.,* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102:8466-8471 (2005)); Remontaje del Gen, el cual es un método de transposición de ADN que puede ser aplicado a genes múltiples en un tiempo o para crear una biblioteca grande de quimeras (mutaciones múltiples) de un gen único (Tecnología de Tunable GeneReassembly™ (TGR™) suministrada por Verenium Corporation), en Automatización de Diseño de Proteína *in Silico* (PDA), el cual es un algoritmo de optimización que ancla la estructura de proteína estructuralmente definida que posee un pliegue particular, y busca espacios de secuencia para sustituciones de aminoácido que pueden estabilizar el pliegue y energéticos de proteína total, y en general funcional muy efectivamente en proteínas con estructuras tri-dimensionales (Hayes *et al.,* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:15926-15931 (2002)); y Mutagénesis de Saturación Iterativa (ISM), la cual involucra el uso del conocimiento de estructura/función para elegir un sitio probable para mejoramiento de la enzima, realizando mutagénesis de saturación en el sitio elegido usando un método de mutagénesis tal como Stratagene QuikChange (Stratagene; San Diego CA), tamizado/selección para propiedades deseadas, y, usando clon(es) mejorados, partiendo de un sitio a otro y continuar repitiendo hasta que se logra una actividad deseada (Reetz *et al.,* Nat. Protoc. 2:891-903 (2007); y Reetz *et al.,* Angew. Chem. Int. Ed Engl. 45:7745-7751 (2006)).

Cualquiera de los métodos para mutagénesis mencionados anteriormente puede ser usado solo o en cualquier combinación. Adicionalmente, uno cualquiera o la combinación de los métodos de evolución digeridos pueden ser usados en conjunto con técnicas de evolución adaptivas, como se describe en

la presente.

EJEMPLO I

Trayectorias a benceno y Tolueno

Este ejemplo muestra trayectorias de fenilalanina a tolueno, fenilalanina a benceno y benzoil-CoA a estireno.

Trayectorias para la conversión enzimática de fenilalanina se muestran en la Figura 1. La primera etapa contempla conversión de fenilalanina a fenilpiruvato, una transformación que puede ser realizada por una aminotransferasa o una desaminación de oxidorreductasa. Fenilpiruvato es entonces descarboxilado a fenilacetaldehído en la Etapa B de la Figura 1. El tolueno puede ser producido directamente de fenilacetaldehído por descarbonilación (Figura 1, etapa E), o indirectamente vía un intermediario de fenilacetato (Figura 1, Etapas C y D). El fenilacetato puede ser oxidado a fenilacetato (Figura 1, etapa C) por ya sea una fenilacetaldehído deshidrogenasa o una fenilacetaldehído oxidasa. Una trayectoria alterna es la descarboxilación oxidativa directa de fenilpiruvato a fenilacetato por fenilpiruvato oxidasa (Figura 1, etapa F).

Una trayectoria de una etapa para conversión enzimática de fenilalanina a benceno se muestra en la Figura 2. La conversión de fenilalanina y agua a benceno, piruvato y amoníaco es catalizada por una enzima con actividad de fenilalanina benceno-liasa.

Las trayectorias enzimáticas a estireno de benzoil-CoA se muestran en la Figura 3. Benzoil-CoA es un intermediario metabólico común de numerosas trayectorias de degradación y biosintéticas. Las trayectorias que involucran la biosíntesis de benzoil-CoA, y también la generación de benzoil-CoA como un producto de degradación, se conocen en la técnica. En las trayectorias de estireno propuestas, benzoil-CoA y acetil-CoA son primero convertidos a 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA por una beta-cetotiolasa (Figura 3, etapa A). La porción CoA de 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA es entonces liberada por una CoA hidrolasa, transferasa o sintasa (Figura 3, etapa B). Alternativamente, 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA es convertido a benzoil-acetato en dos etapas enzimáticas por una fosfotrans-3-oxo-3-fenilpropionilasa y benzoil-acetato cinasa (Figura 3, Etapas F y G). Una vez formado, el benzoil-acetato es descarboxilado, reducido y deshidratado para formar estireno (Figura 3, Etapas C, D y E).

Las enzimas para catalizar las transformaciones mostradas en las

Figuras 1-3 son categorizadas por el número EC (Tabla 1) y descritas además abajo.

Etiqueta	Función	Etapa
1.1.1.a	Oxidorreductasa (oxo a alcohol)	3D
1.2.1.a	Oxidorreductasa (aldehído a ácido)	1C
1.2.3.a	Aldehído oxidasa	1C/F
1.4.1.a	Oxidorreductasa (aminación/desaminación)	1A
2.3.1.a	Aciltransferasa (transferir grupo fosfato a CoA)	3F
2.3.1.b	Beta-cetotiolasa	3A
2.6.1.a	Aminotransferasa	1A
2.7.2.a	Fosfotransferasa, aceptor de grupo carboxilo (cinasa)	3G
2.8.3.a	Coenzima-A transferasa	3B
3.1.2.a	Tioléster hidrolasa (específico de CoA)	3B
4.1.1.a	Carboxi-liasa	1B/D, 3C
4.1.99.a	Descarbonilasa	1E
4.1.99.b	Liasa	2
4.2.1.a	Hidro-liasa	3E
6.2.1.a	Ácido-tiol ligasa	3B

1.1.1.a Oxidorreductasa (oxo a alcohol): La reducción de acetofenona a 1-feniletanol (Etapa D de la Figura 3) es catalizada por una cetona reductasa con actividad de acetofenona reductasa. Enzimas con esta actividad han sido caracterizadas en numerosos organismos, y la formación del producto es en general estereoselectiva. Una enzima ejemplar con esta actividad es la deshidrogenasa/reductasa de cadena corta específica de R de *Lactobacillus brevis,* la cual ha sido extensivamente estudiada, estructuralmente caracterizada y re-diseñada por ingeniería para preferir NADH a NADPH como un co-sustrato (Schlieben *et al.,* J. Mol.Biol. 349:801-813 (2005)). Enzimas adicionales con actividad de acetofenona reductasa son codificadas por *adhF1* de *Pseudomonas fluorescens* (Hildebrandt *et al.,* Appl. Microbiol Biotechnol. 59:483-487 (2002)), *adh* de *Thermus thermophilus* (Pennacchio *et al.,* Appl. Environ. Microbiol 74:3949-3958 (2008)) y *LSADH* de *Leifsonia* sp. S749 (Inoue *et al.,* Biosci. Biotechnol. Biochem. 70:418-426 (2006)). Una enzima específica de S se caracteriza en la

trayectoria de degradación de etilbenceno de la bacteria desnitrificante *Aromatoleum aromaticum EbN1* (Kniemeyer *et al.*, Arch. Microbiol. 176:129-135 (2001)). Esta enzima, codificad por *ped*, favorece la dirección reductiva a pH bajo (4), mientras la dirección oxidativa es favorecida a pH neutral.

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
LVIS_0347	YP_794544.1	116333017	*Lactobacillus brevis*
adhF1	AAL79772.1	18860822	*Pseudomonas fluorescens*
adhTt	YP_003977.1	46198310	*Thermus thermophilus*
LSADH	BAD99642.1	67625613	*Leifsonia* sp. S749
ped	YP_158329.1	56476740	*Aromatoleum aromaticum EbN1*

Una variedad de enzimas de alcohol deshidrogenasa catalizan la reducción de un grupo funcional cetona a un alcohol. Estas enzimas son también adecuadas para catalizar la reducción de acetofenona. Dos de tales enzimas en *E. coli* son codificadas por malato deshidrogenasa (*mdh*) y lactato deshidrogenasa (*ldhA*). La lactato deshidrogenasa de *Ralstonia eutropha* ha sido mostrada por demostrar altas actividades en 2-cetoácidos de varias longitudes de cadena que incluyen lactato, 2-oxobutirato, 2-oxopentanoato y 2-oxoglutarato (Steinbuchel *et al.*, Eur. J. Biochem. 130:329-334 (1983)). La conversión de alfa-cetoadipato en alfa-hidroxiadipato puede ser catalizada por 2-cetoadipato reductasa, una enzima reportada por ser encontrada en ratas y en placenta humana (Suda *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 176:610-620 (1976); Suda *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 77:586-591 (1977)). Una oxidorreductasa adicional es la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa (*bdh*) mitocondrial del corazón humano el cual ha sido clonado y caracterizado (Marks *et al.*, J. Biol. Chem. 267:15459-15463 (1992)). Enzimas de alcohol deshidrogenasa de *C. beijerinckii* (Ismaiel *et al.*, J.Bacteriol. 175:5097-5105 (1993)) y *T. brockii* (Lamed *et al.*, Biochem. J. 195:183-190 (1981); Peretz *et al.*, Biochemistry 28:6549-6555 (1989)) convierten acetona a isopropanol. La metil etil cetona reductasa, o alternativamente, 2-butanol deshidrogenasa, cataliza la reducción de MEK para formar 2-butanol. Enzimas de MEK reductasa ejemplares pueden ser encontradas en *Rhodococcus ruber* (Kosjek *et al.*, Biotechnol Bioeng. 86:55-62 (2004)) y *Pyrococcus furiosus* (van der *et al.*, Eur. J. Biochem. 268:3062-3068 (2001)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
Mdh	AAC76268.1	1789632	*Escherichia coli*
ldhA	NP_415898.1	16129341	*Escherichia coli*
Ldh	YP_725182.1	113866693	*Ralstonia eutropha*
bdh	AAA58352.1	177198	*Homo sapiens*
adh	AAA23199.2	60592974	*Clostridium beijerinckii* NRRL B593
adh	P14941.1	113443	*Thermoanaerobacter brockii* HTD4
adhA	AAC25556	3288810	*Pyrococcus furiosus*
sadh	*CAD36475*	21615553	*Rhodococcus ruber*

1.2.1.a Oxidorreductasa (aldehído a ácido): La oxidación de fenilacetaldehído a fenilacetato es catalizada por fenilacetaldehído deshidrogenasa (Etapa C de la Figura 1), una enzima en la clase EC 1.2.1. Enzimas de fenilacetaldehído deshidrogenasas dependientes de NAD^+ (EC 1.2.1.39) han sido caracterizadas en *E. coli*, *Pseudomonas putida* y *Antirrhinum majus* (Long *et al., Plant J* 59:256-265 (2009); Arias *et al., Environ.Microbiol* 10:413-432 (2008); Ferrandez *et al., FEBS Lett.* 406:23-27 (1997)). Enzimas aldehído deshidrogenasas dependientes de NAD^+- con alta actividad en fenilacetaldehído también han sido caracterizadas en mamíferos tales como *Bos taurus*, *Rattus norvegicus* y *Homo sapiens* (Klyosov, *Biochemistry* 35:4457-4467 (1996a); Lindahl *et al., J Biol.Chem.* 259:11991-11996 (1984)). Dos aldehído deshidrogenasas encontradas en hígado humano, ALDH-1 y ALDH-2, tienen amplios rangos de sustrato para una variedad de aldehídos alifáticos, aromáticos y policíclicos con actividad demostrada en fenilacetaldehído (Klyosov, *Biochemistry* 35:4457-4467 (1996b)). La benzaldehído deshidrogenasa dependiente de $NADP^+$ de *Pseudomonas putida* codificada por *badh* también demostró actividad en fenilacetaldehído (Yeung *et al., Biochim.Biophys.Acta* 1784:1248-1255 (2008)). Enzimas aldehído deshidrogenasas dependientes de NAD^+ con alta actividad en fenilacetaldehído también han sido caracterizadas en mamíferos tales como *Bos taurus*, *Rattus norvegicus* y *Homo sapiens* (Klyosov, *Biochemistry* 35:4457-4467 (1996a); Lindahl *et al., J Biol.Chem.* 259:11991-11996 (1984)). Dos aldehído

deshidrogenasas encontradas en hígado humano, ALDH-1 y ALDH-2, tienen amplios rangos de sustrato para una variedad de aldehídos alifáticos, aromáticos y policíclicos con actividad demostrada en fenilacetaldehído (Klyosov, *Biochemistry* 35:4457-4467 (1996b)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
feaB	AAC74467.2	87081896	*Escherichia coli*
peaE	ABR57205.1	150014683	*Pseudomonas putida*
BALDH	ACM89738.1	223452696	*Antirrhinum majus*
ALDH-2	P05091.2	118504	*Homo sapiens*
badh	P39849.1	731175	*Pseudomonas putida*

1.2.3.a Aldehído oxidasa: Una enzima aldehído oxidasa dependiente de O_2 puede ser empleada para convertir fenilacetaldehído o fenilpiruvato a fenilacetato (Etapas C y F de la Figura 1). Las enzimas de fenilacetaldehído oxidasa convierten fenilacetaldehído, agua y O_2 a fenilacetato y peróxido de hidrógeno. Enzimas de fenilacetaldehído oxidasa ejemplares se encuentran en *Metilobacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Streptomyces moderatus*, *Cavia porcellus* y *Zea mays* (Koshiba *et al., Plant Physiol* 110:781-789 (1996)). Las dos aldehído oxidasas que contienen flavina y molibdeno de *Zea mays* son codificadas por *zmAO-1* y *zmAO-2* (Sekimoto *et al., J Biol.Chem.* 272:15280-15285 (1997)). La actividad de fenilacetaldehído oxidasa también se ha demostrado en la indol-3-acetaldehído oxidasa (EC 1.2.3.7) de *Avena sativa,* aunque los genes asociados con esta actividad no han sido identificados a la fecha y no portan homología significante a los genes de aldehído oxidasa de *Zea mays* (Rajagopal, *Physiol.Plant* 24:272-281 (1971)). Fenilacetaldehído oxidasas adicionales pueden ser inferidas por homología de secuencia a los genes de *Z. mays* y se muestran abajo.

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
zmAO-1	NP_001105308.1	162458742	*Zea mays*
zmAO-2	BAA23227.1	2589164	*Zea mays*
Aox1	O54754.2	20978408	*Mus musculus*
ALDO1_ORYSJ	Q7XH05.1	75296231	*Oryza sativa*

AAO3	BAA82672.1	5672672	*Arabidopsis thaliana*
XDH	DAA24801.1	296482686	*Bos taurus*

Enzimas de fenilpiruvato oxidasa convierten fenilpiruvato y O2 a fenilacetato, CO2 y agua (Etapa F de la Figura 1). La 4-hidroxifenilpiruvato oxidasa (EC 1.2.3.13) de *Arthrobacter globiformis* se mostró que cataliza la oxidación de fenilpiruvato dependiente de O2 un fenilacetato durante el catabolismo de tirosina (Blakley, Can.J Microbiol 23:1128-1139 (1977)). Esta actividad enzimática se demostró en extractos celulares; sin embargo, el gen que codifica esta enzima no se ha identificado a la fecha.

1.4.1.a Oxidorreductasa (desaminación): La oxidación de fenilalanina dependiente de NAD(P)+ a fenilpiruvato (Etapa A de la Figura 1) es catalizada por fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), también llamada fenilalanina deshidrogenasa. Las enzimas de fenilalanina deshidrogenasas dependientes de NAD+ codificadas por genes pdh han sido caracterizadas en Bacillus *badius, Lysinibacillus sphaericus y Thermoactinomyces intermedius* (Yamada *et al., Biosci.Biotechnol.Biochem.* 59:1994-1995 (1995); Takada *et al., J Biochem.* 109:371-376 (1991); Okazaki *et al., Gene* 63:337-341 (1988)).

Gene	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
pdh	BAA08816.1	1228936	*Bacillus badius*
pdh	AAA22646.1	529017	*Lysinibacillus sphaericus*
pdh	P22823.1	118598	*Thermoactinomyces intermedius*

2.3.1.a Aciltransferasa (fosfotransacilasa): Una enzima con actividad de fosfotransbenzoilasa se requiere para fosforilar 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA a [(3-oxo-3-fenilpropionil)oxi]fosfoato (Etapa F de la Figura 3). Una enzima con esta actividad no ha sido caracterizada a la fecha. Aciltransferasas de transferencia de fosfato ejemplares incluyen fosfotransacetilasa (EC 2.3.1.8) y fosfotransbutirilasa (EC 2.3.1.19). El gen *pta* de *E. coli* codifica a fosfotransacetilasa que convierte reversiblemente acetil-CoA en acetil-fosfato (Suzuki, *Biochim.Biophys.Acta* 191:559-569 (1969)). Las enzimas fosfotransacetilasas en varios organismos también catalizan la conversión de propionil-CoA a propionilfosfato. Tales enzimas incluyen los productos del gen *pta* de *E. coli* (Hesslinger *et al., Mol.Microbiol* 27:477-492 (1998)), *Bacillus subtilis* (Rado *et al., Biochim.Biophys.Acta* 321:114-

125 (1973)), *Clostridium kluyveri* (Stadtman, 1:596-599 (1955)), y *Thermotoga maritima* (Bock *et al., J Bacteriol.* 181:1861-1867 (1999)). El gen *ptb* de *C. acetobutilicum* codifica fosfotransbutirilasa, una enzima que convierte reversiblemente butiril-CoA en butiril-fosfato (Wiesenborn *et al., Appl Environ.Microbiol* 55:317-322 (1989); Walter *et al., Gene* 134:107-111 (1993)). Genes *ptb* adicionales se encuentran en bacterias que producen butirato L2-50 (Louis *et al., J.Bacteriol.* 186:2099-2106 (2004)) y *Bacillus megaterium* (Vazquez *et al., Curr.Microbiol* 42:345-349 (2001)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
pta	NP_416800.1	71152910	*Escherichia coli*
pta	P39646	730415	*Bacillus subtilis*
pta	A5N801	146346896	*Clostridium kluyveri*
pta	Q9X0L4	6685776	*Thermotoga maritime*
ptb	NP_349676	34540484	*Clostridium acetobutilicum*
ptb	AAR19757.1	38425288	bacterias que producen butirato L2-50
ptb	CAC07932.1	10046659	*Bacillus megaterium*

2.3.1.b Beta-cetotiolasa. Una enzima beta-cetotiolasa se requiere para convertir benzoil-CoA y acetil-CoA a 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA (Etapa A de la Figura 3). Esta transformación no se sabe que ocurra naturalmente. Enzimas beta-cetotiolasa adecuadas incluyen 3-oxoadipil-CoA tiolasa (EC 2.3.1.174), 3-oxopimeloil-CoA:glutaril-CoA aciltransferasa (EC 2.3.1.16), 3-oxovaleril-CoA tiolasa y acetoacetil-CoA tiolasa (EC 2.1.3.9).

3-Oxoadipil-CoA tiolasa (EC 2.3.1.174) convierte beta-cetoadipil-CoA a succinil-CoA y acetil-CoA, y es una enzima clave para la trayectoria de beta-cetoadipato para degradación de compuestos aromáticos. La enzima es extendida en bacterias y hongos del suelo que incluyen *Pseudomonas putida* (Harwood *et al.,* J Bacteriol. 176:6479-6488 (1994)) y *Acinetobacter calcoaceticus* (Doten *et al.,* J Bacteriol. 169:3168-3174 (1987)). Los productos del gen codificados por pcaF en la cepa de *Pseudomonas* B13 (Kaschabek *et al.,* J Bacteriol. 184:207-215 (2002)), phaD en *Pseudomonas putida* U (Olivera *et al.,* Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A 95:6419-6424 (1998)), paaE en *Pseudomonas fluorescens* ST (Di *et al.,* Arch.Microbiol 188:117-125 (2007)), y paaJ de *E. coli* (Nogales *et al.,* Microbiology 153:357-365

(2007)) también catalizan esta transformación. Varias beta-cetotiolasas exhiben actividades significantes y selectivas en la dirección de formación de oxoadipil-CoA que incluye *bkt* de *Pseudomonas putida*, *pcaF y bkt* de *Pseudomonas aeruginosa PAO1*, *bkt* de *Burkholderia ambifaria* AMMD, *paaJ* de *E. coli*, y *phaD* de *P. putida*.

Nombre del gen	GI#	Acceso a GenBank #	Organismo
paaJ	16129358	NP_415915.1	*Escherichia coli*
pcaF	17736947	AAL02407	*Pseudomonas knackmussii* (B13)
phaD	3253200	AAC24332.1	*Pseudomonas putida*
pcaF	506695	AAA85138.1	*Pseudomonas putida*
pcaF	141777	AAC37148.1	*Acinetobacter calcoaceticus*
paaE	106636097	ABF82237.1	*Pseudomonas fluorescens*
bkt	115360515	YP_777652.1	*Burkholderia ambifaria AMMD*
bkt	9949744	AAG06977.1	*Pseudomonas aeruginosa PAO1*
pcaF	9946065	AAG03617.1	*Pseudomonas aeruginosa PAO1*

3-Oxopimeloil-CoA tiolasa catalizan la condensación de glutaril-CoA y acetil-CoA en 3-oxopimeloil-CoA (EC 2.3.1.16). Una enzima que cataliza esta transformación es codificada por genes *bktB y bktC* en *Ralstonia eutropha* (anteriormente conocida como *Alcaligenes eutrophus*) (Slater *et al., J.Bacteriol.* 180:1979-1987 (1998); Haywood *et al., FEMS Microbiology Letters* 52:91-96 (1988)). La secuencia de la proteína BktB se conoce pero la secuencia de la proteína BktC no se ha reportado a la fecha. El operón *pim* de *Rhodopseudomonas palustris* también codifica una beta-cetotiolasa, codificada por *pimB*, predicha por catalizar esta transformación en la dirección degradativa durante la degradación de benzoil-CoA (Harrison *et al., Microbiology* 151:727-736 (2005)). Una enzima beta-cetotiolasa en *S. aciditrophicus* se identificó por homología de secuencia a *bktB* (43% de identidad, valor e = 1e-93).

Nombre del gen	GI#	Acceso a GenBank #	Organismo

bktB	11386745	YP_725948	*Ralstonia eutropha*
pimB	39650633	CAE29156	*Rhodopseudomonas palustris*
syn_02642	85860483	YP_462685.1	*Syntrophus aciditrophicus*

Enzimas de beta-cetotiolasa que catalizan la formación de 3-oxovalerato de acetil-CoA y propionil-CoA también pueden ser capaces de catalizar la formación de 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA. *Zoogloea ramigera* posee dos cetotiolasas que pueden formar β-cetovaleril-CoA de propionil-CoA y acetil-CoA y *R. eutropha* tiene una β-oxidación de cetotiolasa que es también capaz de catalizar esta transformación (Gruys *et al.*, (1999)). Las secuencias de estos genes o sus proteínas traducidas no han sido reportadas, pero varios genes en *R. eutropha*, *Z. ramigera*, u otros organismos pueden ser identificados con base en la homología de secuencia a *bktB* de *R. eutropha y* se listan abajo.

Nombre del gen	GI#	Acceso a GenBank #	Organismo
phaA	113867452	YP_725941.1	*Ralstonia eutropha*
h16_A1713	113867716	YP_726205.1	*Ralstonia eutropha*
pcaF	116694155	YP_728366.1	*Ralstonia eutropha*
h16_B1369	116695312	YP_840888.1	*Ralstonia eutropha*
h16_A0170	113866201	YP_724690.1	*Ralstonia eutropha*
h16_A0462	113866491	YP_724980.1	*Ralstonia eutropha*
h16_A1528	113867539	YP_726028.1	*Ralstonia eutropha*
h16_B0381	116694334	YP_728545.1	*Ralstonia eutropha*
h16_B0662	116694613	YP_728824.1	*Ralstonia eutropha*
h16_B0759	116694710	YP_728921.1	*Ralstonia eutropha*
h16_B0668	116694619	YP_728830.1	*Ralstonia eutropha*
h16_A1720	113867723	YP_726212.1	*Ralstonia eutropha*
h16_A1887	113867867	YP_726356.1	*Ralstonia eutropha*
phbA	135759	P07097.4	*Zoogloea ramigera*
bktB	194289475	YP_002005382.1	*Cupriavidus taiwanensis*
Rmet_1362	94310304	YP_583514.1	*Ralstonia metallidurans*
Bphy_0975	186475740	YP_001857210.1	*Burkholderia phymatum*

Enzimas adicionales incluyen beta-cetotiolasas que se conocen por convertir dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA (EC 2.1.3.9). Enzimas de acetoacetil-CoA tiolasa ejemplares incluyen los productos del gen de *atoB* de *E. coli* (Martin *et al., Nat.Biotechnol* 21:796-802 (2003)), *thlA y thlB* de *C. acetobutilicum* (Hanai *et al., Appl Environ Microbiol* 73:7814-7818 (2007); Winzer *et al., J.Mol.Microbiol Biotechnol* 2:531-541 (2000)), y *ERG10* de *S. cerevisiae* (Hiser *et al., J.Biol.Chem.* 269:31383-31389 (1994)).

Nombre del gen	GI#	Acceso a GenBank #	Organismo
atoB	16130161	NP_416728	*Escherichia coli*
thlA	15896127	NP_349476.1	*Clostridium acetobutilicum*
thlB	15004782	NP_149242.1	*Clostridium acetobutilicum*
ERG10	6325229	NP_015297	*Saccharomyces cerevisiae*

2.6.1.a Aminotransferasa: Una fenilalanina aminotransferasa o transaminasa en la clase EC 2.6.1 se requiere para convertir fenilalanina a fenilpiruvato (Etapa A de la Figura 1). Una variedad de enzimas catalizan esta transformación, que incluyen fenilacetato aminotransferasa, aminotransferasa de aminoácido aromático, triptofano aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, aminotransferasa de aminoácido de cadena ramificada y otras. Enzimas con actividad de fenilalanina aminotransferasa en *E. coli* son codificadas por *tyrB*, *ilvE* y *aspC* (Lee-Peng *et al., J Bacteriol.* 139:339-345 (1979); Powell *et al., Eur.J Biochem.* 87:391-400 (1978)). Enzimas ejemplares con actividad de fenilalanina aminotransferasa en otros organismos incluyen la aminotransferasa de aminoácido aromático de *S. cerevisiae* codificada por *ARO9* (Iraqui *et al., Mol.Gen.Genet.* 257:238-248 (1998)) y la triptofano aminotransferasa de *Arabidopsis thaliana*, codificada por *TAA1* (Tao *et al., Cell* 133:164-176 (2008)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
tyrB	AAC77024.1	1790488	*Escherichia coli*
ilvE	AAT48207.1	48994963	*Escherichia coli*
aspC	NP_415448.1	16128895	*Escherichia coli*
ARO9	NP_012005.1	6321929	*Saccharomyces cerevisiae*

TAA1	NP_177213.1	15223183	*Arabidopsis thaliana*

2.7.2.a Fosfotransferasa: Enzimas de fosfotransferasa en la clase EC 2.7.2 convierten ácidos carboxílicos a ácidos fosfónicos con hidrólisis concurrente de un ATP. En la Etapa G de la Figura 3, una fosfotransferasa se requiere para convertir [(3-oxo-3-fenilpropionil)oxi]fosfonato y ADP a benzoil-acetato y ATP. Una enzima con esta actividad exacta no ha sido caracterizada a la fecha. Enzimas ejemplares incluyen butirato cinasa (EC 2.7.2.7), isobutirato cinasa (EC 2.7.2.14), aspartocinasa (EC 2.7.2.4), acetato cinasa (EC 2.7.2.1) y gamma-glutamil cinasa (EC 2.7.2.11). Aspartocinasa catalizan la fosforilación dependiente de ATP de aspartato y participa en la síntesis de varios aminoácidos. La enzima aspartocinasa III en *E. coli,* codificada por *lysC,* tiene un amplio rango de sustrato que incluye el compuesto aromático éster 1-bencílico del ácido aspártico, y los residuos catalíticos involucrados en la especificidad del sustrato han sido elucidados (Keng *et al., Arch.Biochem.Biophys.* 335:73-81 (1996)). Dos cinasas adicionales en *E. coli* incluyen acetato cinasa y gamma-glutamil cinasa. La acetato cinasa de *E. coli*, codificada por *ackA* (Skarstedt *et al., J.Biol.Chem.* 251:6775-6783 (1976)), fosforila a propionato además de acetato (Hesslinger *et al., Mol.Microbiol* 27:477-492 (1998)). La gamma-glutamil cinasa de *E. coli*, codificada por *proB* (Smith *et al., J.Bacteriol.* 157:545-551 (1984)), fosforila el grupo de ácido carbónico gamma de glutamato. La butirato cinasa realiza la conversión reversible de butiril-fosfato a butirato durante la acidogénesis en *C. acetobutilicum* (Cary *et al., Appl.Environ.Microbiol* 56:1576-1583 (1990)). Esta enzima es codificada por cualquiera de los dos productos del gen *buk* (Huang *et al., J Mol.Microbiol Biotechnol* 2:33-38 (2000)). Otras enzimas de butirato cinasa se encuentran en *C. butyricum y C. tetanomorphum* (TWAROG *et al., J Bacteriol.* 86:112-117 (1963)). Una enzima relacionada, isobutirato cinasa de *Thermotoga maritime,* fue expresada en *E. coli* y cristalizada (Diao *et al., J Bacteriol.* 191:2521-2529 (2009); Diao *et al., Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 59:1100-1102 (2003)).

Nombre del gen	GI#	Acceso a GenBank #	Organismo
lysC	16131850	NP_418448.1	*Escherichia coli*
ackA	16130231	NP_416799.1	*Escherichia coli*
proB	16128228	NP_414777.1	*Escherichia coli*

buk1	15896326	NP_349675	*Clostridium acetobutilicum*
buk2	20137415	Q97II1	*Clostridium acetobutilicum*
buk2	6685256	Q9X278.1	*Thermotoga maritima*

2.8.3.a CoA transferasa: CoA transferasas catalizan la transferencia reversible de una porción de CoA de una molécula a otra. La etapa B de la Figura 3 es catalizada por una enzima con actividad de 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA transferasa. En esta transformación, benzoil-acetato se forma de 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA por la transferencia del CoA a un aceptor de CoA tal como acetato, succinato u otros. Enzimas de CoA transferasas ejemplares que reaccionan con sustratos similares incluyen cinamoil-CoA transferasa (EC 2.8.3.17) y bencilsuccinil-CoA transferasa. Cinamoil-CoA transferasa, codificada por *fldA* en *Clostridium sporogenes*, transfiere una porción de CoA de cinamoil-CoA a una variedad de sustratos de ácido aromático que incluyen fenilacetato, 3-fenilpropionato y 4-fenilbutirato (Dickert *et al., Eur.J Biochem.* 267:3874-3884 (2000)). Bencilsuccinil-CoA transferasa utiliza succinato o maleato como el aceptor de CoA, formando bencilsuccinato de bencilsuccinil-CoA. Esta enzima se caracteriza en la dirección reversa en la desnitrificación de la bacteria *Thauera aromatica*, donde es codificada por *bbsEF* (Leutwein *et al., J Bacteriol.* 183:4288-4295 (2001)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
fldA	AAL18808.1	16417587	*Clostridium sporogenes*
bbsE	AAF89840.1	9622535	*Thauera aromatica*
bbsF	AAF89841.1	9622536	*Thauera aromatica*

Enzimas CoA transferasa adicionales con diversos rangos de sustrato incluyen succinil-CoA transferasa, 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, butiril-CoA transferasa, glutaconil-CoA transferasa y acetoacetil-CoA transferasa. Los productos del gen de *cat1*, *cat2*, y *cat3* de *Clostridium kluyveri* han sido mostrados por presentar actividad de succinil-CoA, 4-hidroxibutiril-CoA, y butiril-CoA transferasa, respectivamente (Seedorf *et al., Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 105:2128-2133 (2008); Sohling *et al., J Bacteriol.* 178:871-880 (1996)). Actividades similares de CoA transferasa están también presentes en *Trichomonas vaginalis* (van Grinsven *et al., J.Biol.Chem.* 283:1411-1418 (2008)) y *Trypanosoma brucei*

(Riviere *et al., J.Biol.Chem.* 279:45337-45346 (2004)). La glutaconil-CoA-transferasa (EC 2.8.3.12) de la bacteria anaeróbica *Acidaminococcus fermentans* reacciona con glutaconil-CoA y 3-butenoil-CoA (Mack *et al., Eur.J.Biochem.* 226:41-51 (1994)). Los genes que codifican esta enzima son *gctA* y *gctB*. Esta enzima presenta actividad reducida pero detectable con varios sustratos alternos que incluyen glutaril-CoA, 2-hidroxiglutaril-CoA, adipil-CoA, crotonil-CoA y acrilil-CoA (Buckel *et al., Eur.J Biochem.* 118:315-321 (1981)). La enzima ha sido clonada y expresada en *E. coli* (Mack *et al., Eur.J.Biochem.* 226:41-51 (1994)). La actividad de Glutaconato CoA-transferasa también se ha detectado en *Clostridium sporosphaeroides* y *Clostridium symbiosum*. Acetoacetil-CoA transferasa utiliza acetil-CoA como el donador de CoA. Esta enzima es codificada por los genes *atoA* (subunidad alfa) y *atoD* (subunidad beta) de *E. coli* (Korolev *et al., Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 58:2116-2121 (2002); Vanderwinkel *et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.* 33:902-908 (1968)). Esta enzima tiene un amplio rango de sustrato (Sramek *et al., Arch.Biochem.Biophys.* 171:14-26 (1975)) y se ha mostrado por transferir la porción CoA de acetil-CoA a una variedad de sustratos, que incluyen isobutirato (Matthies *et al., Appl Environ.Microbiol* 58:1435-1439 (1992)), valerato y butanoato (Vanderwinkel *et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.* 33:902-908 (1968)). Existen enzimas similares en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Duncan *et al., Appl.Environ.Microbiol* 68:5186-5190 (2002)), *Clostridium acetobutilicum* (Cary *et al., Appl.Environ.Microbiol* 56:1576-1583 (1990); Wiesenborn *et al., Appl.Environ.Microbiol* 55:323-329 (1989)), y *Clostridium saccharoperbutilacetonicum* (Kosaka *et al., Biosci.Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
cat1	P38946.1	729048	*Clostridium kluyveri*
cat2	P38942.2	172046066	*Clostridium kluyveri*
cat3	EDK35586.1	146349050	*Clostridium kluyveri*
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	*Trichomonas vaginalis G3*
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	*Trypanosoma brucei*
gctA	CAA57199.1	559392	*Acidaminococcus fermentans*

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
gctB	CAA57200.1	559393	*Acidaminococcus fermentans*
gctA	ACJ24333.1	212292816	*Clostridium symbiosum*
gctB	ACJ24326.1	212292808	*Clostridium symbiosum*
atoA	P76459.1	2492994	*Escherichia coli* K12
atoD	P76458.1	2492990	*Escherichia coli* K12
actA	YP_226809.1	62391407	*Corynebacterium glutamicum*
cg0592	YP_224801.1	62389399	*Corynebacterium glutamicum*
ctfA	NP_149326.1	15004866	*Clostridium acetobutilicum*
ctfB	NP_149327.1	15004867	*Clostridium acetobutilicum*
ctfA	AAP42564.1	31075384	*Clostridium saccharoperbutilacetonicum*
ctfB	AAP42565.1	31075385	*Clostridium saccharoperbutilacetonicum*

3.1.2.a CoA hidrolasa: 3-Oxo-3-fenilpropionil-CoA puede ser hidrolizada a su ácido correspondiente por una CoA hidrolasa o tioesterasa en la clase EC 3.1.2 (Etapa B de la Figura 3). Tioésteres CoA ejemplares que hidrolizan sustratos aromáticos incluyen benzoil-CoA hidrolasa, 4-hidroxibenzoil-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.23) y fenilacetil-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.25). El gen *orf1* de *Azoarcus evansii* codifica una enzima con actividad de benzoil-CoA hidrolasa que participa en el metabolismo de benzoato (Ismailo, *Arch.Microbiol* 190:451-460 (2008)). Esta enzima, cuando es expresada heterólogamente en *E. coli*, demuestra actividad en un número de sustratos alternos. Enzimas adicionales de benzoil-CoA hidrolasa se identificaron en agrupamientos del gen de degradación de benzoato de *Magnetospirillum magnetotacticum*, *Jannaschia* sp. CCS1 y *Sagittula stellata* E-37 por similitud de secuencia (Ismailo, *Arch.Microbiol* 190:451-460 (2008)). La 4-hidroxibenzoil-CoA hidrolasa de *Pseudomonas* sp. CBS3 presenta actividad en los sustratos alternos benzoil-CoA y p-metilbenzoil-CoA, y ha sido expresada heterólogamente y caracterizada en *E. coli* (Song *et al., Bioorg.Chem.* 35:1-10 (2007)). Enzimas adicionales con actividad de aril-CoA

hidrolasa incluyen la palmitoil-CoA hidrolasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Wang *et al., Chem.Biol.* 14:543-551 (2007)) y la acil-CoA hidrolasa de *E. coli* codificada por *entH* (Guo *et al., Biochemistry* 48:1712-1722 (2009)).

Gene	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
orf1	AAN39365.1	23664428	*Azoarcus evansii*
Magn03011230	ZP_00207794	46200680	*Magnetospirillum magnetotacticum*
Jann_0674	YP_508616	89053165	*Jannaschia* sp. CCS1
SSE37_24444	ZP_01745221	126729407	*Sagittula stellata*
EF569604.1:4745..5170	ABQ44580.1	146761194	*Pseudomonas* sp. CBS3
Rv0098	NP_214612.1	15607240	*Mycobacterium tuberculosis*
entH	AAC73698.1	1786813	*Escherichia coli*

Varias CoA hidrolasas adicionales con amplios rangos de sustratos son adecuadas para hidrolizar benzoil-CoA y/o p-metilbenzoil-CoA. Por ejemplo, la enzima codificada por *acot12* de cerebro de *Rattus norvegicus* (Robinson *et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.* 71:959-965 (1976)) puede reaccionar con butiril-CoA, hexanoil-CoA y malonil-CoA. La tioesterasa de ácido dicarboxílico humana, codificada por *acot8,* presenta actividad en glutaril-CoA, adipil-CoA, suberil-CoA, sebacil-CoA, y dodecanodioil-CoA (Westin *et al., J.Biol.Chem.* 280:38125-38132 (2005)). El homólogo más cercano de *E. coli* a esta enzima, *tesB*, can también hidroliza un rango de CoA tiolésteres (Naggert *et al., J Biol Chem* 266:11044-11050 (1991)). Una enzima similar también ha sido caracterizada en el hígado de rata (Deana R., *Biochem Int* 26:767-773 (1992)). Enzimas adicionales con actividad de hidrolasa en *E. coli* incluyen *ybgC*, *paaI*, y *ybdB* (Kuznetsova, *et al.,* FEMS Microbiol Rev, 2005, 29(2):263-279; Song *et al.,* J Biol Chem, 2006, 281(16):11028-38).

Nombre del gen	Acceso a GenBank #	GI#	Organismo
acot12	NP_570103.1	18543355	*Rattus norvegicus*
tesB	NP_414986	16128437	*Escherichia coli*
acot8	CAA15502	3191970	*Homo sapiens*
acot8	NP_570112	51036669	*Rattus norvegicus*
tesA	NP_415027	16128478	*Escherichia coli*
ybgC	NP_415264	16128711	*Escherichia coli*
paaI	NP_415914	16129357	*Escherichia coli*
ybdB	NP_415129	16128580	*Escherichia coli*

4.1.1a. Carboxi-liasa: Enzimas descarboxilasas en la clase EC 4.1.1 son requeridas para catalizar varias transformaciones en la Figuras 1-3. La conversión de fenilpiruvato a fenilacetaldehído (Etapa B de la Figura 1) es catalizada por una ceto-ácido descarboxilasa. La descarboxilación de fenilacetato a tolueno (Etapa D de la Figura 1) es catalizada por una enzima con actividad de fenilacetato descarboxilasa. Una 3-oxoácido descarboxilasa se requiere para descarboxilar benzoil-acetato a acetofenona (Etapa C de la Figura 7). Las descarboxilasas (también conocidas como carboxi liasas) catalizan la pérdida de dióxido de carbono de un compuesto orgánico o un metabolito celular que posee una función de ácido carboxílico. Las descarboxilasas son prevalentes en la naturaleza y pueden requerir ya sea piruvato o fosfato piridoxal como un co-factor, aunque muchas requieren co-factores no unidos. Más de 50 enzimas descarboxilasas han sido reportadas y caracterizadas por métodos bioquímicos y/o analíticos.

Una fenilacetato descarboxilasa se requiere para catalizar la descarboxilación de fenilacetato a tolueno (Etapa D de la Figura 1). Tal actividad no se ha detectado en enzimas descarboxilasas caracterizadas a la fecha. Una enzima que cataliza una reacción similar es 4-hidroxifenilacetato descarboxilasa (EC 4.1.1.83), la cual naturalmente descarboxila 4-hidroxifenilacetato a p-cresol. Las enzimas 4-hidroxifenilacetato descarboxilasas caracterizadas de *Clostridium difficile* y *Clostridium scatologenes* están compuestas de dos subunidades y requieren activación por una enzima de activación específica (Yu *et al., Biochemistry* 45:9584-9592 (2006); Andrei *et al., Eur.J Biochem.* 271:2225-2230 (2004)). Estas enzimas, codificadas por *csdABC* en *C. scatologenes* y *hpdABC* en *C. difficile*, han sido homólogamente expresadas en *E. coli.* Otra enzima adecuada

es la arilmalonato descarboxilasa (EC 4.1.1.76) de *Enterobacter cloacae*, la cual tiene actividad en el sustrato estructuralmente relacionado, 2-fenilpropionato (Yatake *et al., Appl.Microbiol Biotechnol.* 78:793-799 (2008)). La secuencia de esta enzima está disponible en la publicación por Yatake *et al*; sin embargo esta enzima no se le ha asignado un número de Acceso a GenBank a la fecha. Una enzima relacionada de *Bordetella bronchiseptica* (98% de identidad de aminoácido) codificada por *AMDA_BORBR* fue recientemente cristalizada (Kuettner *et al., J Mol.Biol.* 377:386-394 (2008)).

Nombre del gen	Acceso a GenBank #	GI#	Organismo
csdA	ABB05048.1	77863917	*Clostridium scatologenes*
csdB	ABB05046.1	77863915	*Clostridium scatologenes*
csdC	ABB05047.1	77863916	*Clostridium scatologenes*
hpdA	CAD65891.1	28300943	*Clostridium difficile*
hpdB	CAD65889.1	28300939	*Clostridium difficile*
hpdC	CAD65890.1	28300941	*Clostridium difficile*
AMDA_BORBR	Q05115.1	728844	*Bordetella bronchiseptica*

La conversión de fenilpiruvato a fenilacetaldehído (Figura 1, la etapa B) es catalizada por una enzima con actividad de fenilpiruvato descarboxilasa. Varias enzimas de ceto-ácido descarboxilasas han demostrado actividad en fenilpiruvato que incluye fenilpiruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.43), piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1), alfa-cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada (EC 4.1.1.72) y bencilformiato descarboxilasa (EC 4.1.1.7). Una fenilpiruvato descarboxilasa ejemplar es codificada por el gen *ipdC* de *Azospirillum brasilense* (Spaepen *et al., J Bacteriol.* 189:7626-7633 (2007)). Fenilpiruvato es el sustrato favorecido de esta enzima. Las enzimas de *Saccharomyces cerevisiae* codificadas por los genes *PDC1*, *PDC5*, *PDC6* y *ARO10* también presentan actividad de fenilpiruvato descarboxilasa (Dickinson *et al., J Biol.Chem.* 278:8028-8034 (2003)). Otras enzimas con actividad de fenilpiruvato descarboxilasa incluyen la enzima piruvato deshidrogenasa de *Zygosaccharomyces bisporus* (Neuser *et al., Biol.Chem.* 381:349-353 (2000)), las enzimas de 2-oxoácido descarboxilasas de cadena ramificada de *Mycobacterium tuberculosis H37Rv y Lactococcus lactis (Gocke et al., Adv.Synth.Catal. 349:1425-1435 (2007); Werther et al., J Biol.Chem.*

283:5344-5354 (2008)), y la enzima de bencilformiato descarboxilasa de *Pseudomonas putida* (Siegert *et al., Protein Eng Des Sel* 18:345-357 (2005)). Otra enzima adecuada es la piruvato descarboxilasa de *Zymomonas mobilus,* ya que esta enzima tiene un amplio rango de sustrato y ha sido un sujeto de estudios de ingeniería dirigidos para alterar la especificidad del sustrato (Siegert *et al., Protein Eng Des Sel* 18:345-357 (2005)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
ipdC	P51852.1	1706320	*Azospirillum brasilense*
PDC1	P06169.7	30923172	*Saccharomyces cerevisiae*
PDC5	P16467.4	1352225	*Saccharomyces cerevisiae*
PDC6	P26263.3	118389	*Saccharomyces cerevisiae*
ARO10	Q06408.1	50400299	*Saccharomyces cerevisiae*
pdc1	CAB65554.1	6689662	*Zygosaccharomyces bisporus*
Rv0853c	NP_215368.1	15607993	*Mycobacterium tuberculosis H37Rv*
kdcA	AAS49166.1	44921617	*Lactococcus lactis*
mdlC	P20906.2	3915757	*Pseudomonas putida*
pdc	P06672.1	118391	*Zymomonas mobilis*

La descarboxilación de benzoil-acetato a acetofenona (Etapa C de la Figura 3) es catalizada por una enzima con actividad de benzoil-acetato descarboxilasa. Una enzima dependiente de ATP con esta actividad, acetofenona carboxilasa, opera en la dirección reversa (carboxilación) durante la degradación de etilbenceno en *Aromatoleum aromaticum EbN1* (Rabus *et al., Arch.Microbiol* 178:506-516 (2002)). Esta enzima está compuesta de cinco subunidades codificadas por *apc1-5* y es dependiente de ATP (formando AMP) en la dirección de carboxilación. Enzimas similares se encuentran por homología de secuencia en *Azotobacter vinelandii y Rubrobacter xilanophilus.*

Nombre del gen	Acceso a GenBank #	GI#	Organismo
apc1	YP_158351.1	56476762	*Aromatoleum aromaticum EbN1*
apc2	YP_158350.1	56476761	*Aromatoleum aromaticum*

			EbN1
apc3	YP_158349.1	56476760	*Aromatoleum aromaticum EbN1*
apc4	YP_158348.1	56476759	*Aromatoleum aromaticum EbN1*
apc5	YP_158347.1	56476758	*Aromatoleum aromaticum EbN1*
apc1	YP_002798345.1	226943272	*Azotobacter vinelandii*
apc2	ACO77369.1	226718198	*Azotobacter vinelandii*
apc3	YP_002798343.1	226943270	*Azotobacter vinelandii*
apc4	YP_002798342.1	226943269	*Azotobacter vinelandii*
apc1	YP_644617.1	108804680	*Rubrobacter xilanophilus*
apc2	YP_644616.1	108804679	*Rubrobacter xilanophilus*
apc3	YP_644615.1	108804678	*Rubrobacter xilanophilus*
apc4	YP_644614.1	108804677	*Rubrobacter xilanophilus*
apc5	YP_644613.1	108804676	*Rubrobacter xilanophilus*

Alternativamente, una 3-oxoácido descarboxilasa puede convertir benzoil-acetato a acetofenona. Una 3-oxoácido descarboxilasa ejemplar es acetoacetato descarboxilasa (EC 4.1.1.4), la cual naturalmente convierte acetoacetato en acetona y CO_2. La enzima de *Clostridium* acetobutilicum, codificada por *adc*, tiene un amplio rango de sustrato y se ha mostrado por catalizar la descarboxilación deseada de benzoil-acetato a acetofenona (Rozzel *et al., J.Am.Chem.Soc.* 106:4937-4941 (1984); Benner *et al., J.Am.Chem.Soc.* 103:993-994 (1981); Autor *et al., J Biol.Chem.* 245:5214-5222 (1970)). Una acetoacetato descarboxilasa relacionada ha sido caracterizada en *Clostridium beijerinckii* (Ravagnani *et al., Mol.Microbiol* 37:1172-1185 (2000)). La acetoacetato descarboxilasa de *Bacillus polymyxa*, caracterizada en extractos libres de célula, también tiene una amplia especificidad de sustrato para 3-ceto ácidos y puede descarboxilar 3-oxopentanoato (Matiasek *et al., Curr.Microbiol* 42:276-281 (2001)). El gen que codifica esta enzima no se ha identificado a la fecha y la secuencia genómica de *B. polymyxa* aún no está disponible. Otro *adc* se encuentra en *Clostridium saccharoperbutilacetonicum* (Kosaka, *et al., Biosci.Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007)). Genes adicionales en otros organismos, que incluyen *Clostridium botulinum* y *Bacillus amiloliquefaciens FZB42*, pueden ser inferidos por

homología de secuencia.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
adc	NP_149328.1	15004868	*Clostridium acetobutilicum*
adc	AAP42566.1	31075386	*Clostridium saccharoperbutilacetonicum*
adc	YP_001310906.1	150018652	*Clostridium beijerinckii*
CLL_A2135	YP_001886324.1	187933144	*Clostridium botulinum*
RBAM_030030	YP_001422565.1	154687404	*Bacillus amiloliquefaciens*

4.1.99.a Descarbonilasa: Una enzima de descarbonilasa se requiere para convertir fenilacetaldehído a tolueno (Etapa E de la Figura 1). Enzimas de descarbonilasa catalizan la etapa final de la biosíntesis de alcano en plantas, mamíferos, insectos y bacterias (Dennis *et al., Arch.Biochem.Biophys.* 287:268-275 (1991)). Descarbonilasas no oxidativas transforman aldehídos en alcanos con la liberación concurrente de CO, mientras las descarboxilasas oxidativas son enzimas del citocromo P450 que utilizan NADPH y O_2 como cofactores y liberan CO_2, agua y $NADP^+$. Enzimas ejemplares de descarbonilasa incluyen octadecanal descarbonilasa (EC 4.1.99.5), esterol desaturasa y aldehído descarbonilasa graso. Una descarbonilasa que contiene cobalto-porfirina se purificó y caracterizó en las algas *Botryococcus braunii;* sin embargo, ningún gen está asociado con esta actividad a la fecha (Dennis *et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:5306-5310 (1992)). Una descarbonilasa que contiene cobre de *Pisum sativum* también se purificó y caracterizó (Schneider-Belhaddad *et al., Arch.Biochem.Biophys.* 377:341-349 (2000)). El gen *CER1* de *Arabidopsis thaliana* codifica una descarbonilasa de ácido graso involucrada en la formación de cera epicuticular (US 6,437,218). Las descarbonilasas de ácido graso adicionales se encuentran en *Medicago truncatula, Vitis vinifera y Oryza sativa* (Solicitud de Patente Estadounidense 2009/0061493).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
CER1	NP_850932	145361948	*Arabidopsis thaliana*
MtrDRAFT_AC153128g2v2	ABN07985	124359969	*Medicago truncatula*

VITISV_029045	CAN60676	147781102	*Vitis vinifera*
OSJNBa0004N05.14	CAE03390.2	38345317	*Oryza sativa*

Enzimas oxidativas de descarbonilasa son codificadas por los productos del gen *CYP4G2v1* y *CYP4G1* de *Musca domestica y Drosophila melanogaster* (Solicitud de Patente Estadounidense 2010/0136595). Enzimas adicionales con actividad oxidativa de descarbonilasa pueden ser identificadas en otros organismos, por ejemplo *Mamestra brassicae*, *Helicoverpa zea y Acyrthosiphon pisum*, por homología de secuencia.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
CYP4G2v1	ABV48808.1	157382740	*Musca domestica*
CYP4G1	NP_525031.1	17933498	*Drosophila melanogaster*
CYP4G25	BAD81026.1	56710314	*Antheraea yamamai*
CYP4M6	AAM54722.1	21552585	*Helicoverpa zea*
LOC100164072	XP_001944205.1	193650239	*Acyrthosiphon pisum*

4.1.99.b Liasa: La conversión de fenilalanina a benceno en la Figura 2 es catalizada por una enzima con actividad de fenilalanina benceno-liasa. La nueva actividad requerida es similar a aquella de tirosina fenol-liasa (EC 4.1.99.2), la cual reversiblemente interconvierte tirosina y fenol, con liberación concomitante de piruvato y amoníaco. La enzima de *Pantoea agglomerans* (anteriormente *Erwinia herbicola*), codificada por *tutA*, reacciona con un rango de derivados sustituidos que incluyen dihidroxifenilalanina (Foor *et al., Appl.Environ.Microbiol* 59:3070-3075 (1993)). Esta enzima fue heterólogamente expresada en *E. coli* y utilizada para sintetizar dihidroxifenilalanina de catecol, piruvato y amoníaco. Enzimas adicionales de tirosina fenol-liasa incluidas se encuentran en *Citrobacter intermedius* (Nagasawa *et al., Eur.J Biochem.* 117:33-40 (1981)), *Citrobacter freundii* (Phillips *et al., Biochim.Biophys.Acta* 1647:167-172 (2003)) y *Symbiobacterium thermophilum* (Hirahara *et al., Appl.Microbiol Biotechnol.* 39:341-346 (1993)). La enzima *Citrobacter freundii* ha sido estructuralmente caracterizada y se identificaron residuos involucrados en el enlace del sustrato (Milic *et al., J Biol.Chem.* 283:29206-29214 (2008)). La fenilalanina no es un sustrato natural de cualquier enzima de tirosina fenol-liasa caracterizada; preferentemente se ha mostrado por actuar como inhibidor de algunas enzimas. La evolución dirigida u

otros procedimientos de ingeniería de proteína bien conocidos en la técnica probablemente serán requeridos para ganar esta actividad y mejorar el desempeño.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
tutA	AAA66390.1	806897	*Pantoea agglomerans*
tpl	ABI75028.1	114451977	*Citrobacter freundii*
tpl	BAA00763.1	216675	*Citrobacter intermedius*
tpl	YP_076671.1	51893980	*Symbiobacterium thermophilum*

Una enzima que cataliza una reacción similar es triptofano indol-liasa (EC 4.1.99.1), también llamada triptofanasa, la cual convierte triptofano y agua a indol y piruvato. Enzimas ejemplares de triptofano indol-liasa incluyen los productos del gen *tnaA* de *E. coli*, *tna1* de *Symbiobacterium thermophilum* y *tnaA* de *Enterobacter aerogenes* (Kogan *et al., Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 60:2073-2075 (2004); Kawasaki *et al., Biosci.Biotechnol.Biochem.* 59:1938-1943 (1995); Suzuki *et al., Agric.Biol.Chem.* 55:3059-3066 (1991)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
tnaA	NP_418164.4	90111643	*Escherichia coli*
tna1	BAA24688.1	2842554	*Symbiobacterium thermophilum*
tnaA	Q59342.1	2501228	*Enterobacter aerogenes*

4.2.1.a Deshidratasa: La Etapa E de la Figura 3 emplea una deshidratasa (EC 4.1.2.-) para convertir 1-feniletanol a estireno. Enzimas ejemplares para catalizar esta reacción incluyen fumarasa (EC 4.2.1.2), citramalato hidratasa (EC 4.2.1.34) y dimetilmaleato hidratasa (EC 4.2.1.85). Enzimas de fumarasa naturalmente catalizan la deshidratación reversible de malato a fumarato. Aunque la adecuabilidad de 1-feniletanol como un sustrato para enzimas de fumarasa no se ha descrito en la literatura a la fecha, una riqueza de la información estructural está disponible para esta enzima y los investigadores han diseñado por ingeniería de manera exitosa la enzima para alterar la actividad, inhibición y localización (Weaver, 61:1395-1401 (2005)). *E. coli* tiene tres fumarasas: FumA, FumB, y FumC que son reguladas por condiciones de crecimiento. FumB es sensible al oxígeno y solamente activa bajo condiciones

anaeróbicas. FumA es activa bajo condiciones microanaeróbicas, y FumC es la única enzima activa durante el crecimiento aeróbico (Tseng *et al.,* 183:461-467 (2001); Woods *et al.,* 954:14-26 (1988); Guest *et al., J Gen Microbiol* 131:2971-2984 (1985)). Enzimas adicionales se encuentran en *Campilobacter jejuni* (Smith *et al., Int.J Biochem.Cell Biol* 31:961-975 (1999)), *Thermus thermophilus* (Mizobata *et al., Arch.Biochem.Biophys.* 355:49-55 (1998)) *y Rattus norvegicus* (Kobayashi *et al.,* 89:1923-1931 (1981)). Enzimas similares con alta homología de secuencia incluyen *fum1* de *Arabidopsis thaliana* y *fumC* de *Corynebacterium glutamicum.* La fumarasa *mmcBC* de *Pelotomaculum thermopropionicum* es otra clase de fumarasa con dos subunidades (Shimoyama *et al.,* 270:207-213 (2007)). Citramalato hidroliasa naturalmente deshidrata 2-metilmalato a mesaconato. Esta enzima ha sido estudiada en *Methanocaldococcus jannaschii* en el contexto de la trayectoria de piruvato a 2-oxobutanoato, donde se ha mostrado por tener una amplia especificidad de sustrato (Drevland *et al., J Bacteriol.* 189:4391-4400 (2007)). Esta actividad enzimática también se detectó en *Clostridium tetanomorphum*, *Morganella morganii, Citrobacter amalonaticus* donde se piensa participa en la degradación de glutamato (Kato y Asano, *Arch.Microbiol* 168:457-463 (1997)). La secuencia de proteína *M. jannaschii* no porta homología significantes a genes en estos organismos. La dimetilmaleato hidratasa es una enzima sensible al oxígeno y dependiente de Fe^{2+} reversible en la familia aconitasa que hidrata dimetilmaleato para formar (2R,3S)-2,3-dimetilmalato. Esta enzima es codificada por *dmdAB* en *Eubacterium barkeri* (Alhapel *et al., supra*; Kollmann-Koch *et al., Hoppe Seilers.Z.Physiol Chem.* 365:847-857 (1984)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
fumA	NP_416129.1	16129570	*Escherichia coli*
fumB	NP_418546.1	16131948	*Escherichia coli*
fumC	NP_416128.1	16129569	*Escherichia coli*
fumC	O69294	9789756	*Campilobacter jejuni*
fumC	P84127	75427690	*Thermus thermophilus*
fumH	P14408	120605	*Rattus norvegicus*
fum1	P93033	39931311	*Arabidopsis thaliana*
fumC	Q8NRN8	39931596	*Corynebacterium glutamicum*
mmcB	YP_001211906	147677691	*Pelotomaculum thermopropionicum*

mmcC	YP_001211907	147677692	*Pelotomaculum thermopropionicum*
leuD	Q58673.1	3122345	*Methanocaldococcus jannaschii*
dmdA	ABC88408	86278276	*Eubacterium barkeri*
dmdB	ABC88409.1	86278277	*Eubacterium barkeri*

6.2.1.a Ácido-tiol ligasa: La conversión de 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA a benzoil-acetato (Etapa B de la Figura 3) puede ser catalizada por una CoA sintetasa o Ácido-tiol ligasa en la clase EC 6.2.1. Las CoA sintetasas que forman ATP que catalizan esta transformación exacta no han sido caracterizadas a la fecha; sin embargo, varias enzimas con amplias especificidades de sustrato se han descrito en la literatura. La acetil-CoA sintetasa que forma ADP (ACD, EC 6.2.1.13) de *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por AF1211, se mostró por operar en una variedad de sustratos de cadena lineal y ramificada que incluyen isobutirato, isopentanoato, y fumarato (Musfeldt *et al., J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). Un segundo ACD reversible en *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por *AF1983*, también se mostró por tener un amplio rango de sustrato con alta actividad en compuestos aromáticos fenilacetato e indolacetato (Musfeldt *et al., supra*). La enzima de *Haloarcula marismortui*, anotada como una succinil-CoA sintetasa, acepta propionato, butirato y ácidos de cadena ramificada (isovalerato e isobutirato) como sustratos, y se mostró por operar en las direcciones delantera y reversa (Brasen *et al., Arch.Microbiol* 182:277-287 (2004)). La ACD codificada por *PAE3250* de crenarchaeon hipertermofílica de *Pyrobaculum aerophilum* mostró el rango de sustrato más amplio de todas las ACDs caracterizadas, que reaccionan con acetil-CoA, isobutiril-CoA (sustrato preferido) y fenilacetil-CoA (Brasen and Schonheit, *Arch.Microbiol* 182:277-287 (2004)). La evolución dirigida o ingeniería puede ser usada para modificar esta enzima para operar a la temperatura fisiológica el organismo hospedero. Las enzimas de *A. fulgidus*, *H. marismortui* y *P. aerophilum* todas han sido clonadas, funcionalmente expresadas, y caracterizadas en *E. coli* (Brasen and Schonheit, *Arch.Microbiol* 182:277-287 (2004); Musfeldt and Schonheit, *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). Una enzima adicional es codificada por *sucCD* en *E. coli,* la cual naturalmente catalizan la formación de succinil-CoA de succinato con el consumo concomitante de una ATP, una reacción la cual es reversible *in vivo* (Buck *et al., Biochemistry* 24:6245-6252 (1985)). La acil CoA ligasa de *Pseudomonas putida* ha sido demostrada por

funcionar en varios sustratos alifáticos que incluyen ácidos acético, propiónico, butírico, valérico, hexanoico, heptanoico y octanoico y en compuestos aromáticos tales como ácidos fenilacético y fenoxiacético (Fernandez-Valverde *et al., Appl.Environ.Microbiol.* 59:1149-1154 (1993)). Una enzima relacionada, malonil CoA sintetasa (6.3.4.9) de *Rhizobium leguminosarum* podría convertir varios diácidos, es decir, etil-, propil-, alil-, isopropil-, dimetil-, ciclopropil-, ciclopropilmetileno-, ciclobutil-, y bencil-malonato en sus monotioésteres correspondientes (Pohl *et al., J.Am.Chem.Soc.* 123:5822-5823 (2001)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
AF1211	NP_070039.1	11498810	*Archaeoglobus fulgidus*
AF1983	NP_070807.1	11499565	*Archaeoglobus fulgidus*
scs	YP_135572.1	55377722	*Haloarcula marismortui*
PAE3250	NP_560604.1	18313937	*Pyrobaculum aerophilum* str. IM2
sucC	NP_415256.1	16128703	*Escherichia coli*
sucD	AAC73823.1	1786949	*Escherichia coli*
paaF	AAC24333.2	22711873	*Pseudomonas putida*
matB	AAC83455.1	3982573	*Rhizobium leguminosarum*

EJEMPLO II

Trayectorias a 1,3-butadieno de Isómeros de Muconato

Este ejemplo muestra trayectorias de isómeros de muconato a 1,3-butadieno.

La Figura 4 muestra la conversión de isómeros de muconato a 1,3-butadieno por enzimas descarboxilasas. Cis,cis-muconato, cis,trans-muconato o trans,trans-muconato son primero descarboxilados a ya sea cis-2,4-pentadienoato o trans-2,4-pentadienoato (Etapas A, B, C y D de la Figura 4). 2,4-Pentadienoato es subsecuentemente descarboxilado para formar 1,3-butadieno (Etapas E, F de la Figura 4).

Se entiende que la descarboxilación de cualquier isómero de muconato puede servir como parte de una trayectoria a 1,3-butadieno. La producción biológica de cis,cis-muconato es bien conocida en la técnica (Draths and Frost. J Am Chem Soc. 116:399-400 (1994); Niu et al. Biotechnol Prog.

18:201-211 (2002); Bang y Choi. J Ferm Bioeng. 79(4):381-383 (1995)). Los isómeros de muconato pueden ser interconvertidos por las enzimas de muconato isomerasa en la clase EC 5.2.1.

Se entiende además que la descarboxilación de cualquier isómero de 2,4-pentadienoato formará 1,3-butadieno. Los isómeros de 2,4-pentadienoato can alternativamente ser formados de materiales de partida distintos de muconato (por ejemplo, introducción de un segundo enlace doble vía deshidrogenación de pent-2-enoato o pent-4-enoato; remoción de CoA de 2,4-pentadienoil-CoA vía una hidrolasa, sintetasa, o transferasa, deshidrogenación de 2,4-pentadienal o 2,4-pentadienol vía una aldehído o aldehído/alcohol deshidrogenasa, respectivamente). Los isómeros de 2,4-pentadienoato pueden ser interconvertidos por enzimas isomerasas en la clase EC: 5.2.1.

Numerosas enzimas descarboxilasas han sido caracterizadas y mostradas para descarboxilar sustratos estructuralmente similares a isómeros de muconato o 2,4-pentadienoato. Enzimas ejemplares incluyen descarboxilasa de ácido sórbico, aconitato descarboxilasa (EC 4.1.1.16), 4-oxalocrotonato descarboxilasa (EC 4.1.1.77), cinamato descarboxilasa y descarboxilasa de ácido ferúlico. Estas enzimas son aplicables para uso en la presente invención para descarboxilar muconato y/o 2,4-pentadienoato como se muestra en la Figura 4.

Una enzima descarboxilasa con función estrechamente relacionada es descarboxilasa de ácido sórbico la cual convierte ácido sórbico a 1,3-pentadieno. La descarboxilación de ácido sórbico por *Aspergillus niger* requiere tres genes: padA1, ohbA1, y sdrA (Plumridge et al. Fung. Genet. Bio, 47:683-692 (2010). PadA1 es anotada como una descarboxilasa de ácido fenilacrílico, ohbA1 es una descarboxilasa putativa de ácido 4-hidroxibenzoico, y sdrA es un regulador de descarboxilasa de ácido sórbico. Especies adicionales también se han mostrado por descarboxilar ácido sórbico que incluye varias especies fúngicas y de levadura (Kinderlerler and Hatton, Food Addit Contam., 7(5):657-69 (1990); Casas *et al.,* Int J Food Micro., 94(1):93-96 (2004); Pinches and Apps, Int. J. Food Microbiol. 116: 182–185 (2007)). Por ejemplo, *Aspergillus oryzae* y *Neosartorya fischeri* se han mostrado por descarboxilar ácido sórbico y tener homólogos cercanos a *padA1*, *ohbA1*, y *sdrA*.

Nombre del gen	GenBankID	Número GI	Organismo
padA1	XP_001390532.1	145235767	*Aspergillus niger*
ohbA1	XP_001390534.1	145235771	*Aspergillus niger*
sdrA	XP_001390533.1	145235769	*Aspergillus niger*
padA1	XP_001818651.1	169768362	*Aspergillus oryzae*
ohbA1	XP_001818650.1	169768360	*Aspergillus oryzae*
sdrA	XP_001818649.1	169768358	*Aspergillus oryzae*
padA1	XP_001261423.1	119482790	*Neosartorya fischeri*
ohbA1	XP_001261424.1	119482792	*Neosartorya fischeri*
sdrA	XP_001261422.1	119482788	*Neosartorya fischeri*

Aconitato descarboxilasa es otra enzima útil para esta invención. Esta enzima cataliza la etapa final en la biosíntesis de itaconato en una cepa de *Candida* y también en el hongo filamentoso *Aspergillus terreus*. (Bonnarme et al. *J Bacteriol.* 177:3573-3578 (1995); Willke y Vorlop, *Appl Microbiol. Biotechnol* 56:289-295 (2001)). La aconitato descarboxilasa ha sido purificada y caracterizada de *Aspergillus terreus*. (Dwiarti *et al., J. Biosci. Bioeng.* 94(1): 29-33 (2002)) El gen y secuencia de proteína para la enzima de descarboxilasa de ácido cis-aconítico (CAD) fueron reportados previamente (EP 2017344 A1; WO 2009/014437 A1), junto con varios homólogos cercanos listados en la tabla siguiente.

Nombre del gen	GenBankID	Número GI	Organismo
CAD	XP_001209273	115385453	*Aspergillus terreus*
	XP_001217495	115402837	*Aspergillus terreus*
	XP_001209946	115386810	*Aspergillus terreus*
	BAE66063	83775944	*Aspergillus oryzae*
	XP_001393934	145242722	*Aspergillus niger*
	XP_391316	46139251	*Gibberella zeae*
	XP_001389415	145230213	*Aspergillus niger*
	XP_001383451	126133853	*Pichia stipitis*
	YP_891060	118473159	*Mycobacterium smegmatis*
	NP_961187	41408351	*Mycobacterium avium subsp. pratuberculosis*
	YP_880968	118466464	*Mycobacterium avium*
	ZP_01648681	119882410	*Salinispora arenicola*

4-Oxalocronato descarboxilasa cataliza la descarboxilación de 4-oxalocrotonato a 2-oxopentanoato. Esta enzima ha sido aislada de numerosos organismos y caracterizada. Genes que codifican esta enzima incluyen *dmpH* y *dmpE* en *Pseudomonas sp. (cepa 600)* (Shingler *et al.*, 174:711-724 (1992)), *xilII* y *xilIII* de *Pseudomonas putida* (Kato *et al., Arch.Microbiol* 168:457-463 (1997); Stanley *et al., Biochemistry* 39:3514 (2000); Lian *et al., J.Am.Chem.Soc.* 116:10403-10411 (1994)) y *Reut_B5691* y *Reut_B5692* de *Ralstonia eutropha JMP134* (Hughes *et al.*, 158:79-83 (1984)). Los genes que codifican la enzima de *Pseudomonas sp. (cepa 600)* se han clonado y expresado en *E. coli* (Shingler *et al.*, 174:711-724 (1992)).

Nombre del gen	GenBankID	Número GI	Organismo
dmpH	CAA43228.1	45685	*Pseudomonas sp. CF600*
dmpE	CAA43225.1	45682	*Pseudomonas sp. CF600*
xilII	YP_709328.1	111116444	*Pseudomonas putida*
xilIII	YP_709353.1	111116469	*Pseudomonas putida*
Reut_B5691	YP_299880.1	73539513	*Ralstonia eutropha JMP134*
Reut_B5692	YP_299881.1	73539514	*Ralstonia eutropha JMP134*

Finalmente, una clase de descarboxilasas ha sido caracterizada que cataliza la conversión de cinamato (fenilacrilato) y derivados de cinamato sustituidos a sus derivados de estireno correspondientes. Estas enzimas son comunes en una variedad de organismos y genes específicos que codifican estas enzimas que se han clonado y expresado en *E. coli* incluyen: *pad 1* de *Saccharomyces cerevisae* (Clausen *et al., Gene* 142:107-112 (1994)), *pdc* de *Lactobacillus plantarum* (Barthelmebs *et al.*, 67:1063-1069 (2001); Qi *et al., Metab Eng* 9:268-276 (2007); Rodriguez *et al., J.Agric.Food Chem.* 56:3068-3072 (2008)), *pofK* (*pad*) de *Klebsiella oxytoca* (Uchiyama *et al., Biosci.Biotechnol.Biochem.* 72:116-123 (2008); Hashidoko *et al., Biosci.Biotech.Biochem.* 58:217-218 (1994)), *Pedicoccus pentosaceus* (Barthelmebs *et al.*, 67:1063-1069 (2001)), y *padC* de *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* (Shingler *et al.*, 174:711-724 (1992)). Una descarboxilasa de ácido ferúlico

de *Pseudomonas fluorescens* también ha sido purificada y caracterizada (Huang *et al., J.Bacteriol.* 176:5912-5918 (1994)). Enzimas en esta clase son estables y no requieren ya sea co-factores exógenos o internamente unidos, de este modo haciendo estas enzimas idealmente adecuadas para biotransformaciones (Sariaslani, *Annu.Rev.Microbiol.* 61:51-69 (2007)).

Nombre del gen	GenBankID	Número GI	Organismo
pad1	BAG32372.1	188496949	*Saccharomyces cerevisae*
pdc	AAC45282.1	1762616	*Lactobacillus plantarum*
pofK (pad)	BAF65031.1	149941607	*Klebsiella oxytoca*
padC	AAC46254.1	2394282	*Bacillus subtilis*
pad	CAC16793.1	11322457	*Pedicoccus pentosaceus*
pad	CAC18719.1	11691810	*Bacillus pumilus*

Cada una de las descarboxilasas listadas anteriormente representa una enzima adecuada posible para las transformaciones deseadas mostradas en la Figura 4. Si la actividad o productividad deseada de la enzima no se observa en las conversiones deseadas (por ejemplo, muconato a 2,4-pentadienoato, 2,4-pentadienoato a butadieno), las enzimas descarboxilasas pueden ser evolucionadas usando métodos de ingeniería de proteína conocidos por lograr el desempeño requerido. De manera importante, se mostró a través del uso de enzimas quiméricas que la región C-terminal de descarboxilasas parece ser responsable por especificidad del sustrato (Barthelmebs, L.; Divies, C.; Cavin, J.-F. 2001. Expression in *Escherichia coli* of Native and Chimeric Fenolic Acid Decarboxilases with Modified Enzymatic Activities and Method for Screening Recombinant *E. coli* Strains Expressing These Enzymes, Appl. Environ. Microbiol. 67, 1063-1069.). Por consiguiente, experimentos de evolución dirigida para ampliar la especificidad de descarboxilasas para ganar actividad con muconato o 2,4-pentadienoato pueden ser enfocados en la región C-terminal de estas enzimas.

Algunas de las descarboxilasas requeridas para catalizar las transformaciones en la Figura 4 pueden presentar actividad superior en isómeros específicos de muconato o 2,4-pentadienoato. Las enzimas de isomerasa pueden

ser aplicadas para convertir isómeros menos deseables de muconato y 2,4-pentadienoato en isómeros más deseables para la descarboxilación. Isomerasas ejemplares que catalizan transformaciones similares y de este modo representan enzimas adecuadas para esta invención incluyen maleato cis-trans isomerasa (EC 5.2.1.1), maleilacetona cis-trans isomerasa (EC 5.2.1.2) e cis-trans isomerasa de ácido graso. Maleato cis-trans isomerasa convierte fumarato a maleato. Esta enzima es codificada por el gen *maiA* de *Alcaligenes faecalis* (Hatakeyama, *et al.,* 1997, Gene Cloning and Characterization of Maleate cis-trans Isomerase of Alcaligenes faecalis, *Biochem. Biophys. Research Comm.* 239, 74-79) o *Serratia marcescens* (Hatakeyama *et al.,* Biosci. Biotechnol. Biochem. 64:1477-1485 (2000)). Genes similares que pueden ser identificados por homología de secuencia incluyen aquellos de *Geobacillus stearothermophilus*, *Ralstonia pickettii* 12D, y *Ralstonia eutropha* H16. Enzimas de isomerasa adicionales de maleato cis-trans son codificadas por las enzimas cuyas secuencias de aminoácido son proporcionadas como ID 1 a 4 de secuencias en ref (Mukouyama *et al.,* Patente Estadounidense 6,133,014). Maleilacetona *cis,trans*-isomerasa cataliza la conversión de 4-maleil-acetoacetato a 4-fumaril-acetilacetato, una conversión cis a trans. Esta enzima es codificada por *maiA* en *Pseudomonas aeruginosa* (Fernandez-Canon *et al., J Biol.Chem.* 273:329-337 (1998))) y *Vibrio cholera* (Seltzer, *J Biol.Chem.* 248:215-222 (1973)). Una enzima similar se identificó por homología de secuencia en *E. coli O157*. El producto del gen *cti* cataliza la conversión de ácidos grasos insaturados *cis* (UFA) a *trans*- UFA. La enzima ha sido caracterizada en *P. putida* (Junker *et al., J Bacteriol.* 181:5693-5700 (1999)). Enzimas similares se encuentran en *Shewanella* sp. MR-4 y *Vibrio cholerae*.

Nombre del gen	GenBankID	Número GI	Organismo
maiA	BAA23002.1	2575787	*Alcaligenes faecalis*
maiA	BAA96747.1	8570038	*Serratia marcescens*
maiA	BAA77296	4760466	*Geobacillus stearothermophilus*
Rpic12DDRAFT_0600	ZP_02009633	153888491	*Ralstonia pickettii 12D*
maiA	YP_725437	113866948	*Ralstonia eutropha* H16
maiA	NP_250697	15597203	*Pseudomonas aeruginosa*

maiA	NP_230991	15641359	*Vibrio cholerae*
maiA	EDU73766	189355347	*Escherichia coli O157*
cti	AAD41252	5257178	*Pseudomonas putida*
cti	YP_732637	113968844	*Shewanella* sp. MR-4
cti	ZP_04395785	229506276	*Vibrio cholerae*

EJEMPLO III

Trayectoria Ejemplar para producir (2-Hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato

Este ejemplo describe una trayectoria ejemplar para producir (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato (2H3M4OP) precursor de ácido tereftálico (PTA).

El precursor a las trayectorias de *p*-toluato y PTA es 2H3M4OP. Este químico puede ser derivado de metabolitos centrales gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y piruvato en tres etapas enzimáticas como se muestra en la Figura 5. Las primeras dos etapas son nativas a *E. coli* y otros organismos que utilizan la trayectoria de metileritritol fosfato (sin-mevalonato) para la biosíntesis isoprenoide. El piruvato y G3P son primero condensados para formar 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP) por DXP sintasa. El reacomodo y reducción subsecuente de la estructura de carbono es catalizada por reductoisomerasa de DXP. Finalmente, una nueva diol deshidratasa transforma 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato al precursor de *p*-toluato 2H3M4OP.

A. 1- Desoxixilulosa-5-fosfato (DXP) sintasa. Piruvato y G3P son condensados para formar DXP por DXP sintasa (EC 2.2.1.7). Esta enzima cataliza la primera etapa en la trayectoria sin mevalonato de biosíntesis de isoprenoide. La enzima requiere tiamina difosfato como un cofactor, y también requiere FAD reducida, aunque no existe un cambio rédox puro. Una estructura cristalina de la enzima de *E. coli* está disponible (Xiang *et al.,* J. Biol. Chem. 282:2676-2682 (2007)). Otras enzimas han sido clonadas y caracterizadas en *M. tuberculosis* (Bailey *et al.,* Glycobiology 12:813-820 (2002) y *Agrobacterium tumefaciens* (Lee *et al.,* J. Biotechnol. 128:555-566 (2007)). Enzimas DXP sintasa de *B. subtilis y Synechocystis* sp. PCC 6803 fueron clonadas en *E. coli* (Harker y Bramley, *FEBS Lett.* 448:115-119 (1999)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
dxs	AAC73523.1	1786622	*Escherichia coli*
dxs	P0A554.1	61222979	*M. tuberculosis*
dxs11	AAP56243.1	37903541	*Agrobacterium tumefaciens*
dxs	P54523.1	1731052	*Bacillus subtilis*
sll1945	BAA17089.1	1652165	*Synechocystis* sp. PCC 6803

B. 1-Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (EC 1.1.1.267). La reducción y reacomodo dependiente de NAD(P)H- de 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP) una 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato es catalizada por DXP reductoisomerasa (DXR, EC 1.1.1.267) en la segunda etapa de la trayectoria sin mevalonato para biosíntesis isoprenoide. La enzima de *E. coli* dependiente de NADPH es codificada por *dxr* (Takahashi *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:9879-9884 (1998)). Una enzima recombinante de *Arabidopsis thaliana* fue funcionalmente expresada en *E. coli* (Carretero-Paulet *et al., Plant Physiol.* 129:1581-1591 (2002)). Enzimas DXR de *Zymomonas mobilis* y *Mycobacterium tuberculosis* han sido caracterizada y las estructuras cristalinas están disponibles (Grolle *et al., FEMS Microbiol. Lett.* 191:131-137 (2000)); Henriksson *et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 62:807-813 (2006)). Enzimas DXR muy caracterizadas son estrictamente dependientes de NADPH, pero las enzimas de *A. thaliana* y *M. tuberculosis* reaccionan con NADH a una relación reducida (Argyrou y Blanchard, *Biochemistry* 43:4375-4384 (2004)); Rohdich *et al., FEBS J.* 273:4446-4458 (2006)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
dxr	AAC73284.1	1786369	*Escherichia coli*
dxr	AAF73140.1	8131928	*Arabisopsis thaliana*
dxr	CAB60758.1	6434139	*Zymomonas mobilis*
dxr	NP_217386.2	57117032	*Mycobacterium tuberculosis*

C. 2-C-Metil-D-eritritol-4-fosfato deshidratasa. Una diol deshidratasa se requiere para convertir 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato en el precursor de *p*-toluato (Altmiller and Wagner, *Arch. Biochem.* Biophys. 138:160-170 (1970)). Aunque esta transformación no ha sido demostrada experimentalmente varias enzimas catalizan transformaciones similares que incluyen dihidroxi-ácido deshidratasa (EC 4.2.1.9), propanodiol deshidratasa (EC 4.2.1.28), glicerol deshidratasa (EC 4.2.1.30) y myo-inositosa deshidratasa (EC 4.2.1.44).

Enzimas de diol deshidratasa o propanodiol deshidratasa (EC 4.2.1.28) capaces de convertir el diol secundario 2,3-butanodiol a 2-butanona son excelentes candidatos para esta transformación. Diol deshidratadas dependientes de adenosilcoalamina contienen subunidades alfa, beta y gama, las cuales son todas requeridas para la función enzimática. Candidatos de gen ejemplares se encuentran en *Klebsiella pneumoniae* (Tobimatsu *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62:1774-1777 (1998); Toraya *et al.,. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69:475-480 (1976)), *Salmonella typhimurium* (Bobik *et al., J. Bacteriol.* 179:6633-6639 (1997)), *Klebsiella oxytoca* (Tobimatsu *et al., J. Biol. Chem.* 270:7142-7148 (1995)) y *Lactobacillus collinoides* (Sauvageot *et al., FEMS Microbiol. Lett.* 209:69-74 (2002)). Métodos para aislar candidatos de gel de diol deshidratasa en otros organismos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,686,276).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
pddA	BAA08099.1	868006	*Klebsiella oxytoca*
pddB	BAA08100.1	868007	*Klebsiella oxytoca*
pddC	BAA08101.1	868008	*Klebsiella oxytoca*
pduC	AAB84102.1	2587029	*Salmonella typhimurium*
pduD	AAB84103.1	2587030	*Salmonella typhimurium*
pduE	AAB84104.1	2587031	*Salmonella typhimurium*
pduC	CAC82541.1	18857678	*Lactobacullus collinoides*
pduD	CAC82542.1	18857679	*Lactobacullus*

			collinoides
pduE	CAD01091.1	18857680	*Lactobacullus collinoides*
pddA	AAC98384.1	4063702	*Klebsiella pneumoniae*
pddB	AAC98385.1	4063703	*Klebsiella pneumoniae*
pddC	AAC98386.1	4063704	*Klebsiella pneumoniae*

Enzimas en la familia glicerol deshidratasa (EC 4.2.1.30) también pueden ser usadas para deshidratar 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato. Candidatos de gen ejemplares codificados por *gldABC* y *dhaB123* en *Klebsiella pneumoniae* (WO 2008/137403) y (Toraya *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69:475-480 (1976)), *dhaBCE* en *Clostridium pasteuranum* (Macis *et al., FEMS Microbiol Lett.* 164:21-28 (1998)) y *dhaBCE* en *Citrobacter freundii* (Seyfried *et al., J. Bacteriol.* 178:5793-5796 (1996)). Variantes de la diol deshidratasa dependientes de B12 de *K. pneumoniae* con actividad mejorada 80 a 336 veces fueron recientemente diseñadas por ingeniería introduciendo mutaciones en dos residuos de la subunidad beta (Qi *et al., J. Biotechnol.* 144:43-50 (2009)). Enzimas de diol deshidratasa con cinéticas de inactivación reducidas fueron desarrolladas por DuPont usando PCR propensa a error (WO 2004/056963).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
gldA	AAB96343.1	1778022	*Klebsiella pneumoniae*
gldB	AAB96344.1	1778023	*Klebsiella pneumoniae*
gldC	AAB96345.1	1778024	*Klebsiella pneumoniae*
dhaB1	ABR78884.1	150956854	*Klebsiella pneumoniae*
dhaB2	ABR78883.1	150956853	*Klebsiella pneumoniae*
dhaB3	ABR78882.1	150956852	*Klebsiella pneumoniae*
dhaB	AAC27922.1	3360389	*Clostridium pasteuranum*
dhaC	AAC27923.1	3360390	*Clostridium pasteuranum*
dhaE	AAC27924.1	3360391	*Clostridium pasteuranum*
dhaB	P45514.1	1169287	*Citrobacter freundii*
dhaC	AAB48851.1	1229154	*Citrobacter freundii*
dhaE	AAB48852.1	1229155	*Citrobacter freundii*

Si se utiliza una diol deshidratasa dependiente de B12, la expresión heteróloga del factor de reactivación correspondiente es recomendada. Las diol deshidratasas dependientes de B12 son sometidas a activación suicida a base de mecanismos por sustratos y algunos productos corriente abajo. La inactivación, causada por una estrecha asociación con cobalamina inactiva, puede ser parcialmente superada por factores que reactivan la diol deshidratasa en un proceso dependiente de ATP. La regeneración del cofactor B12 requiere una ATP adicional. Los factores de regeneración de diol deshidratasa son proteínas de dos subunidades. Candidatos ejemplares se encuentran en *Klebsiella oxytoca* (Mori *et al., J. Biol. Chem.* 272:32034-32041 (1997)), *Salmonella typhimurium* (Bobik *et al., J. Bacteriol.* 179:6633-6639 (1997); Chen *et al., J. Bacteriol.* 176:5474-5482 (1994)), *Lactobacillus collinoides* (Sauvageot *et al., FEMS Microbiol. Lett.* 209:69-74 (2002)), y *Klebsiella pneumonia* (WO 2008/137403).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
ddrA	AAC15871.1	3115376	*Klebsiella oxytoca*
ddrB	AAC15872.1	3115377	*Klebsiella oxytoca*
pduG	AAL20947.1	16420573	*Salmonella typhimurium*
pduH	AAL20948.1	16420574	*Salmonella typhimurium*
pduG	YP_002236779	206579698	*Klebsiella pneumonia*
pduH	YP_002236778	206579863	*Klebsiella pneumonia*
pduG	CAD01092	29335724	*Lactobacillus collinoides*
pduH	CAD01093	29335725	*Lactobacillus collinoides*

Enzimas diol deshidratasas independientes de B12 utilizan S-adenosilmetionina (SAM) como un cofactor, funcionando bajo condiciones estrictamente anaeróbicas, y requieren activación por una enzima de activación específica (Frey *et al., Chem. Rev.* 103:2129-2148 (2003)). La glicerol deshidrogenasa y factor de activación correspondiente de *Clostridium butyricum*, codificados por *dhaB1 y dhaB2*, han sido bien caracterizados (O'Brien *et al., Biochemistry* 43:4635-4645 (2004); Raynaud *et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA* 100:5010-5015 (2003)). Esta enzima fue recientemente empleada en una cepa que produce en exceso 1,3-propanodiol de *E. coli* y fue capaz de lograr tituladores muy altos de producto (Tang *et al., Appl. Environ. Microbiol.* 75:1628-1634 (2009)).

Una enzima diol deshidratasa independiente de B12 y factor de activación de *Roseburia inulinivorans* se mostró por catalizar la conversión de 2,3-butanodiol a 2-butanona (Publicación Estadounidense 2009/09155870).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
dhaB1	AAM54728.1	27461255	*Clostridium butyricum*
dhaB2	AAM54729.1	27461256	*Clostridium butyricum*
rdhtA	ABC25539.1	83596382	*Roseburia inulinivorans*
rdhtB	ABC25540.1	83596383	*Roseburia inulinivorans*

Dihidroxi-ácido deshidratasa (DHAD, EC 4.2.1.9) es una enzima independiente de B12 que participa en la biosíntesis del aminoácido de cadena ramificada. En su papel nativo, convierte 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato a 2-ceto-3-metil-valerato, un precursor de isoleucina. En la biosíntesis de valina, la enzima cataliza la deshidratación de 2,3-dihidroxi-isovalerato a 2-oxoisovalerato. La DHAD de *Sulfolobus solfataricus* tiene un amplio rango de sustrato, y la actividad de una enzima recombinante expresada en *E. coli* se demostró en una variedad de ácidos aldónicos (Kim y Lee, *J. Biochem.* 139:591-596 (2006)). La enzima *S. solfataricus* es tolerante de oxígeno distinta de muchas enzimas de diol deshidratasa. La enzima de *E. coli*, codificada por *ilvD,* es sensible al oxígeno, el cual inactiva su agrupamiento de hierro-azufre (Flint *et al., J. Biol. Chem.* 268:14732-14742 (1993)). Enzimas similares han sido caracterizadas en *Neurospora crassa* (Altmiller y Wagner, *Arch. Biochem. Biophys.* 138:160-170 (1970)) y *Salmonella typhimurium* (Armstrong *et al., Biochim. Biophys. Acta* 498:282-293 (1977)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
ilvD	NP_344419.1	15899814	*Sulfolobus solfataricus*
ilvD	AAT48208.1	48994964	*Escherichia coli*
ilvD	NP_462795.1	16767180	*Salmonella typhimurium*
ilvD	XP_958280.1	85090149	*Neurospora crassa*

La diol deshidratasa myo-inososa-2-deshidratasa (EC 4.2.1.44) es otro candidato ejemplar. Myo-inososa es un anillo de seis elementos que contiene

grupos de alcohol adyacentes. Una enzima purificada que codifica la funcionalidad de myo-inososa-2-deshidratasa ha sido estudiada en *Klebsiella aerogenes* en el contexto de la degradación de myo-inositol (Berman and Magasanik, *J. Biol. Chem.* 241:800-806 (1966)), pero no se ha asociado con un gen a la fecha. La myo-inososa-2-deshidratasa de *Sinorhizobium fredii* se clonó y funcionalmente expresó en *E. coli* (Yoshida *et al., Biosci.Biotechnol. Biochem.* 70:2957-2964 (2006)). Una enzima similar de *B. subtilis*, codificada por *iolE*, también ha sido estudiada (Yoshida *et al., Microbiology* 150:571-580 (2004)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
iolE	P42416.1	1176989	*Bacillus subtilis*
iolE	AAX24114.1	60549621	*Sinorhizobium fredii*

EJEMPLO IV

Trayectoria Ejemplar para la Síntesis de *p*-toluato de (2-Hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato por las enzimas de la trayectoria de shikimato

Este ejemplo describes trayectorias ejemplares para la síntesis de *p*-toluato usando las enzimas de la trayectoria de shikimato.

La estructura química de *p*-toluato se asemeja estrechamente a *p*-hidroxibenzoato, un precursor de la ubiquinona del portador de electrón. 4-Hidroxibenzoato es sintetizado de precursores metabólicos centrales por enzimas en la trayectoria de shikimato, encontrada en bacterias, plantas y hongos. La trayectoria de shikimato está comprendida de siete etapas enzimáticas que transforman D-eritrosa-4-fosfato (E4P) y fosfoenolpiruvato (PEP) a corismato. Las enzimas de la trayectoria incluyen 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato (DAHP) sintasa, deshidroquinato (DHQ) sintasa, DHQ deshidratasa, shikimato deshidrogenasa, shikimato cinasa, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa y corismato sintasa. En la primera etapa de la trayectoria, eritrosa-4-fosfato y fosfoenolpiruvato se unen por DAHP sintasa para formar 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato. Este compuesto es entonces desfosforilado, deshidratado y reducido para formar shikimato. El shikimato es convertido a corismato por las acciones de tres enzimas: shikimato cinasa, 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa y corismato sintasa. La conversión subsecuente de corismato a 4-hidroxibenzoato es catalizada por corismato liasa.

La síntesis de *p*-toluato procede en una manera análoga como se

muestra en la Figura 6. La trayectoria origina con PEP y 2H3M4OP, un compuesto análogo a E4P con un grupo metilo en lugar del grupo 3-hidroxilo de E4P. El grupo hidroxilo de E4P no participa directamente en la química de la trayectoria de las reacciones de shikimato, así el precursor 2H3M4OP metilo-sustituido se espera reaccione como un sustrato alterno. La evolución dirigida o adaptiva puede ser usada para mejorar la preferencia para 2H3M4OP y derivados corriente abajo como sustratos. Tales métodos son bien conocidos en la técnica.

Estrategias de ingeniería de cepas para mejorar la eficiencia del flujo a través de las enzimas de la trayectoria de shikimato también son aplicables aquí. La disponibilidad del PEP precursor de la trayectoria puede ser incrementada alterando los sistemas de transporte de glucosa (Yi *et al.,* Biotechnol. Prog. 19:1450-1459 (2003)). Se diseñaron por ingeniería cepas que producen en exceso 4-hidroxibenzoato para mejorar el flujo a través de la trayectoria de shikimato por medio de la sobre expresión de una isozima insensible a la retroalimentación de 3-desoxi-D-ácido arabinoheptulosónico-7-fosfato sintasa (Barker and Frost, Biotechnol. Bioeng. 76:376-390 (2001)). Adicionalmente, los niveles de expresión de las enzimas de la trayectoria de shikimato y corismato liasa fueron mejorados. Estrategias similares pueden ser empleadas en una cepa para sobreproducción de *p*-toluato.

A. 2-Deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa (EC 2.5.1.54). La condensación de eritrosa-4-fosfato y fosfoenolpiruvato es catalizada por 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato (DAHP) sintasa (EC 2.5.1.54). Tres isozimas de esta enzima son codificadas en el genoma de *E. coli* por aroG, aroF y aroH y son sometidas a inhibición por retroalimentación por fenilalanina, tirosina y triptofano, respectivamente. En células de tipo nativo que crecen en medio mínimo, los productos del gen aroG, aroF y aroH contribuyen a 80%, 20% y 1% de la actividad de DAHP sintasa, respectivamente (Hudson and Davidson, J. Mol. Biol. 180:1023-1051 (1984)). Dos residuos de AroG se encontraron por aliviar la inhibición por fenilalanina (Kikuchi *et al.,* Appl. Environ. Microbiol. 63:761-762 (1997)). La inhibición de retroalimentación de AroF por tirosina se removió por un cambio de par base único (Weaver and Herrmann, J. Bacteriol. 172:6581-6584 (1990)). La DAHP sintasa insensible a tirosina fue sobre expresada en una cepa de *E. coli* que sobre expresa 4-hidroxibenzoato (Barker y Frost, Biotechnol. Bioeng. 76:376-390 (2001)). El producto del gen aroG se mostró por aceptar una variedad de sustratos alternos de 4 y 5 carbonos de longitud (Sheflyan *et al.,* J. Am. Chem. Soc. 120(43):11027-11032 (1998); Williamson *et al.,* Bioorg. Med. Chem. Lett. 15:2339-

2342 (2005)). La enzima reacciona eficientemente con (3S)-2-desoxieritrosa-4-fosfato, un sustrato análogo a eritrosa-4-fosfato pero carece del alcohol en la posición 2 (Williamson *et al.*, supra 2005). Enzimas de *Helicobacter pilori* y *Pyrococcus furiosus* también aceptan este sustrato alterno (Schofield *et al.*, Biochemistry 44:11950-11962 (2005)); Webby *et al.*, Biochem. J. 390:223-230 2005)) y han sido expresadas en *E. coli*. Una variante evolucionada de DAHP sintasa, que difiere de la enzima AroG de *E. coli* de tipo nativa por 7 amino ácidos, se mostró por presentar un ambiente de 60-partes en Kcat/KM (Ran y Frost, *J. Am. Chem. Soc.* 129:6130-6139 (2007)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
aroG	AAC73841.1	1786969	*Escherichia coli*
aroF	AAC75650.1	1788953	*Escherichia coli*
aroH	AAC74774.1	1787996	*Escherichia coli*
aroF	Q9ZMU5	81555637	*Helicobacter pilori*
PF1690	NP_579419.1	18978062	*Pyrococcus furiosus*

B. 3-Deshidroquinato sintasa (EC 4.2.3.4). La desfosforilación del sustrato (2)(2,4-dihidroxi-5-metil-6-[(fosfonooxi)metil]oxan-2-carboxilato) al sustrato (3)(1,3-dihidroxi-4-metilcilohex-1-eno-1-carboxilato) como se muestra en la Figura 2 es análogo a la desfosforilación de 3-desoxi-arabino-heptulonato-7-fosfato por 3-deshidroquinato sintasa. La enzima ha sido caracterizada en *E. coli* (Mehdi *et al.*, *Métodos Enzymol.* 142:306-314 (1987), *B. subtilis* (Hasan y Nester, *J. Biol. Chem.* 253:4999-5004 (1978)) y *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* (de Mendonca *et al.*, *J. Bacteriol.* 189:6246-6252 (2007)). La enzima de *E. coli* es sometida a inhibición por L-tirosina (Barker y Frost, *Biotechnol. Bioeng.* 76:376-390 2001)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
aroB	AAC76414.1	1789791	*Escherichia coli*
aroB	NP_390151.1	16079327	*Bacillus subtilis*
aroB	CAB06200.1	1781064	*Mycobacterium tuberculosis*

C. 3-Deshidroquinato deshidratasa (EC 4.2.1.10). 3-Deshidroquinato deshidratasa, también llamada 3-deshidrocinasa (DHQase), naturalmente cataliza la deshidratación de 3-deshidroquinato a 3-deshidroshikimato, análogo a la etapa C en la trayectoria de *p*-toluato de la Figura 2. Enzimas de DHQase pueden ser divididas en dos clases con base en el mecanismo, estereoquímica y homología de secuencia (Gourley *et al., Nat. Struct. Biol.* 6:521-525. (1999)). En general las enzimas tipo 1 están involucradas en la biosíntesis, mientras las enzimas de tipo 2 operan en la dirección reversa (degradativa). Las enzimas tipo 1 de *E. coli* (Kinghorn *et al., Gene* 14:73-80. 1981)), *Salmonella typhi* (Kinghorn *et al., supra* 1981; Servos *et al., J. Gen. Microbiol.* 137:147-152 (1991)) y *B. subtilis* (Warburg *et al., Gene* 32:57-66 1984)) han sido clonadas y caracterizadas. Enzimas 3-deshidroquinato deshidratasa tipo II ejemplares se encuentran en *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces coelicolor* (Evans *et al., FEBS Lett.* 530:24-30 (2002)) y *Helicobacter pilori* (Lee *et al., Proteins* 51:616-7 (2003)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
aroD	AAC74763.1	1787984	*Escherichia coli*
aroD	P24670.2	17433709	*Salmonella typhi*
aroC	NP_390189.1	16079365	*Bacillus subtilis*
aroD	P0A4Z6.2	61219243	*Mycobacterium tuberculosis*
aroQ	P15474.3	8039781	*Streptomyces coelicolor*
aroQ	Q48255.2	2492957	*Helicobacter pilori*

D. Shikimato deshidrogenasa (EC 1.1.1.25). Shikimato deshidrogenasa cataliza la reducción dependiente de NAD(P)H de 3-deshidroshikimato a shikimato, análogo a la Etapa D de la Figura 2. El genoma de *E. coli* codifica dos parálogos de shikimato deshidrogenasa con diferentes especificidades del cofactor. La enzima codificada por *aroE* es específica de NADPH, mientras el producto del gen *ydiB* es una quinato/shikimato deshidrogenasa la cual puede utilizar NADH (preferida) o NADPH como un cofactor (Michel *et al., J. Biol. Chem.* 278:19463-19472 (2003)). Enzimas dependientes de NADPH de *Mycobacterium tuberculosis* (Zhang *et al., J. Biochem. Mol. Biol.* 38:624-631 (2005)), *Haemophilus influenzae* (Ye *et al., J.*

Bacteriol. 185:4144-4151 (2003)) y *Helicobacter pilori* (Han *et al., FEBS J.* 273:4682-4692 (2006)) han sido funcionalmente expresadas en *E. coli.*

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
aroE	AAC76306.1	1789675	*Escherichia coli*
ydiB	AAC74762.1	1787983	*Escherichia coli*
aroE	NP_217068.1	15609689	*Mycobacterium tuberculosis*
aroE	P43876.1	1168510	*Haemophilus influenzae*
aroE	AAW22052.1	56684731	*Helicobacter pilori*

E. Shikimato cinasa (EC 2.7.1.71). Shikimato cinasa cataliza la fosforilación dependiente de ATP del grupo 3-hidroxil de shikimato análogo a la Etapa E de la Figura 2. Dos enzimas de shikimato cinasa son codificadas por *aroK* (SK1) y *aroL* (SK2) en *E. coli* (DeFeyter and Pittard, J. *Bacteriol.* 165:331-333 (1986); Lobner-Olesen and Marinus, *J. Bacteriol.* 174:525-529 (1992)). La Km de SK2, codificada por *aroL*, es 100-veces inferior que aquella de SK1, indicando que esta enzima es responsable de la biosíntesis aromática (DeFeyter *et al., supra* 1986). Enzimas de shikimato cinasa adicionales de *Mycobacterium tuberculosis* (Gu *et al., J. Mol. Biol.* 319:779-789 (2002)); Oliveira *et al., Protein Expr. Purif.* 22:430-435 (2001)(doi:10.1006/prep.2001.1457, doi;S1046-5928(01)91457-3, pii), *Helicobacter pilori* (Cheng *et al., J. Bacteriol.* 187:8156-8163 (2005)) y *Erwinia chrysanthemi* (Krell *et al., Protein Sci.* 10:1137-1149 (2001)) han sido clonadas en *E. coli.*

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
aroK	YP_026215.2	90111581	*Escherichia coli*
aroL	NP_414922.1	16128373	*Escherichia coli*
aroK	CAB06199.1	1781063	*Mycobacterium tuberculosis*
aroK	NP_206956.1	15644786	*Helicobacter pilori*
SK	CAA32883.1	42966	*Erwinia chrysanthemi*

F. 3-Fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa (EC 2.5.1.19). 3-Fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa, también conocida como 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), cataliza la transferencia de la porción enolpiruvil de fosfoenolpiruvato al 5-hidroxilo de shikimato-3-fosfato. La enzima es codificada por *aroA* en *E. coli* (Anderson *et al., Biochemistry* 27:1604-1610 (1988)). EPSPS enzimas de *Mycobacterium tuberculosis* (Oliveira *et al., Protein Expr. Purif.* 22:430-435 (2001)), *Dunaliella salina* (Yi *et al., J. Microbiol.* 45:153-157 (2007)) y *Staphilococcus aureus* (Priestman *et al., FEBS Lett.* 579:728-732 (2005)) han sido clonadas y funcionalmente expresadas en *E. coli.*

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
aroA	AAC73994.1	1787137	*Escherichia coli*
aroA	AAA25356.1	149928	*Mycobacterium tuberculosis*
aroA	AAA71897.1	152956	*Staphilococcus aureus*
aroA	ABM68632.1	122937807	*Dunaliella salina*

G. Corismato sintasa (EC 4.2.3.5). Corismato sintasa es la séptima enzima en la trayectoria de shikimato, que cataliza la transformación de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato a corismato. La enzima requiere mononucleótido de flavina reducida (FMN) como un cofactor, aunque la reacción pura de la enzima no involucra un cambio rédox. Contrario a la enzima encontrada en plantas y bacterias, la corismato sintasa en hongos es también capaz de reducir FMN a la expensa de NADPH (Macheroux *et al., Planta* 207:325-334 (1999)). Enzimas monofuncionales representativas son codificadas por *aroC* de *E. coli* (White *et al., Biochem. J.* 251:313-322 (1988)) y *Streptococcus pneumoniae* (Maclean y Ali, *Structure* 11:1499-1511 (2003)(doi:S0969212603002648, pii). Enzimas fúngicas bifuncionales se encuentran en *Neurospora crassa* (Kitzing *et al., J. Biol. Chem.* 276:42658-42666 (2001)) y *Saccharomyces cerevisiae* (Jones *et al., Mol. Microbiol.* 5:2143-2152 (1991)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
aroC	NP_416832.1	16130264	*Escherichia coli*
aroC	ACH47980.1	197205483	*Streptococcus pneumoniae*
U25818.1:19..1317	AAC49056.1	976375	*Neurospora crassa*
ARO2	CAA42745.1	3387	*Saccharomyces cerevisiae*

H. Corismato liasa (EC 4.1.3.40). Corismato liasa cataliza la primera etapa comprometida en la biosíntesis de ubiquinona: la remoción de piruvato de corismato para formar 4-hidroxibenzoato. La reacción enzimática es limitada de la velocidad por la liberación lenta del producto de 4-hidroxibenzoato (Gallagher *et al., Proteins* 44:304-311 (2001)), el cual se piensa juega un papel en el suministro de 4-hidroxibenzoato a enzimas unidas a la membrana corriente abajo. La corismato liasa de *E. coli* se clonó y caracterizó y la enzima ha sido cristalizada (Gallagher *et al., supra* 2001; Siebert *et al., FEBS Lett.* 307:347-350 (1992)). Estudios estructurales implican al residuo G90 como contribuyente a la inhibición del producto (Smith *et al., Arch. Biochem. Biophys.* 445:72-80 (2006)). La modificación de dos residuos de cisteína activos de la superficie reduce la agregación de la proteína (Holden *et al., Biochim. Biophys. Acta* 1594:160-167 (2002)). Una forma recombinante de la corismato liasa de *Mycobacterium tuberculosis* se clonó y caracterizó en *E. coli* (Stadthagen *et al., J. Biol. Chem.* 280:40699-40706 2005)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
ubiC	AAC77009.2	87082361	*Escherichia coli*
Rv2949c	NP_217465.1	15610086	*Mycobacterium tuberculosis*

B-F. Proteína AROM Multifuncional. En la mayoría de las bacterias, las enzimas de la trayectoria de shikimato son codificadas por polipéptidos separados. En eucariotas microbianos, cinco funciones enzimáticas son catalizadas por una proteína polifuncional codificada por un supergen

pentafuncional (Campbell *et al., Int. J. Parasitol.* 34:5-13 (2004)). El complejo multifuncional AROM de proteína cataliza reacciones análogas a las reacciones B-F de la Figura 2. El complejo de proteína AROM ha sido caracterizada en hongos que incluyen *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae y Pneumocystis carinii* (Banerji *et al., J. Gen. Microbiol.* 139:2901-2914 (1993); Charles *et al., Nucleic* Acids *Res.* 14:2201-2213 (1986); Coggins *et al., Métodos Enzymol.* 142:325-341 (1987); Duncan, K., *Biochem. J.* 246:375-386 (1987)). Varios componentes de AROM se han mostrado por funcionar independientemente como polipéptidos individuales. Por ejemplo, la deshidroquinato sintasa (DHQS) forma el dominio amino-terminal de AROM, y puede funcionar independientemente cuando es clonada en *E. coli* (Moore *et al., Biochem. J.* 301 (Pt 1):297-304 (1994)). Varias estructuras cristalinas de componentes de AROM de *Aspergillus nidulans* proporcionan una visión en el mecanismo catalítico (Carpenter *et al., Nature* 394:299-302 (1998)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
AROM	P07547.3	238054389	*Aspergillus nidulans*
AROM	P08566.1	114166	*Saccharomyces cerevisiae*
AROM	P07547.3	238054389	*Aspergillus nidulans*
AROM	Q12659.1	2492977	*Pneumocystis carinii*

EJEMPLO V

Trayectoria Ejemplar para la Transformación Enzimática de *p*-toluato a Ácido Tereftálico

Este ejemplo describe trayectorias ejemplares para conversión de *p*-toluato a ácido tereftálico (PTA).

P-toluato puede ser además transformado a PTA por oxidación del grupo metilo a un ácido en tres etapas enzimáticas como se muestra en la Figura 3. La trayectoria está comprendida de una *p*-toluato metil-monooxigenasa reductasa, una deshidrogenasa de alcohol 4-carboxibencílico y una deshidrogenasa de 4-carboxibencil aldehído. En la primera etapa, *p*-toluato metil-monooxigenasa oxida *p*-toluato a alcohol 4-carboxibencílico en la presencia de O_2. La enzima *Comamonas testosteroni* (*tsaBM*), la cual también reacciona con 4-tolueno sulfonato como un sustrato, ha sido purificada y caracterizada (Locher *et al., J. Bacteriol.* 173:3741-3748 (1991)). Alcohol 4-carboxibencílico es

subsecuentemente convertido a un aldehído por deshidrogenasa de alcohol 4-carboxibencílico (*tsaC*). La transformación de aldehído a ácido es catalizada por 4-carboxibenzaldehído deshidrogenasa (*tsaD*). Las enzimas que catalizan estas reacciones se encuentran en *Comamonas testosteroni* T-2, un organismo capaz de utilizar *p*-toluato como la única fuente de carbono y energía (Junker *et al., J. Bacteriol.* 179:919-927 (1997)). Genes adicionales para transformar *p*-toluato a PTA pueden ser encontrados por homología de secuencia, en particular a proteobacteria en los géneros *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Shingomonas* y *Comamonas* (Patente Estadounidense No. 6,187,569 y Publicación Estadounidense 2003/0170836). Los ID de identificadores de GenBank asociados con las enzimas de *Comamonas testosteroni* se listan abajo.

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
tsaB	AAC44805.1	1790868	*Comamonas testosteroni*
tsaM	AAC44804.1	1790867	*Comamonas testosteroni*
tsaC	AAC44807.1	1790870	*Comamonas testosteroni*
tsaD	AAC44808.1	1790871	*Comamonas testosteroni*

EJEMPLO VI

Síntesis de benzoato de 2H4OP

Este ejemplo muestra la síntesis de benzoato de 2H4OP por las enzimas de la trayectoria de shikimato (Figura 9) y una trayectoria ejemplar para producir el 2H4OP precursor de la trayectoria de benzoato (Figura 8).

Como el *p*-toluato, la estructura química de benzoato se asemeja a p-hidroxibenzoato, un producto de la trayectoria de shikimato descrita anteriormente en el Ejemplo IV. En este ejemplo las enzimas de la trayectoria de shikimato son utilizadas para sintetizar benzoato del precursor de la trayectoria (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato (2H4OP) por la trayectoria mostrada en la Figura 9. La reactividad de las enzimas de la trayectoria de shikimato en 2H4OP y los sustratos alternos usados en la formación de benzoato son opcionalmente optimizados por evolución dirigida o adaptiva para mejorar la preferencia para 2H4OP y derivados corriente abajo como sustratos. Tales métodos son bien conocidos en la técnica y descritos en la presente.

Una trayectoria nueva y ejemplar para sintetizar la trayectoria de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato (2H4OP) precursor del benzoato se muestra en la

Figura 8. En esta trayectoria, 2H4OP se deriva del metabolito central eritrosa-4-fosfato en dos etapas enzimáticas. En la primera etapa, una diol deshidratasa transforma eritrosa-4-fosfato a (2,4-dioxobutoxi)fosfonato (24DBP). El grupo 2-ceto de 24DBP es subsecuentemente reducido al alcohol de 2H4OP por una oxidorreductasa con actividad de 24DBP reductasa. Enzimas ejemplares para las Etapas A y B de la Figura 8 se representan abajo.

A. Eritrosa-4-fosfato deshidratasa: Enzimas Diol deshidratasa en la clase EC 4.2.1 son usadas para convertir eritrosa-4-fosfato en 24DBP (Figura 4, la etapa A). Aunque las enzimas que catalizan esta transformación no se han indicado, varias enzimas catalizan transformaciones similares que incluyen dihidroxi-ácido deshidratasa (EC 4.2.1.9), propanodiol deshidratasa (EC 4.2.1.28), glicerol deshidratasa (EC 4.2.1.30) y myo-inositosa deshidratasa (EC 4.2.1.44). Enzimas diol deshidratasa ejemplares son descritas anteriormente en el Ejemplo III.

Enzimas diol deshidratasa o propanodiol deshidratasa (EC 4.2.1.28) capaces de convertir el diol 2,3-butanodiol secundario a 2-butanona pueden ser usadas para esta transformación. Diol deshidratasas dependientes de B-12 o adenosilcobalamina- contienen subunidades alfa, beta y gamma, todas las cuales son usadas para la función enzimática. Genes ejemplares se encuentran en *Klebsiella pneumoniae* (Tobimatsu *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62:1774-1777 (1998); Toraya *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69:475-480 (1976)), *Salmonella typhimurium* (Bobik *et al., J. Bacteriol.* 179:6633-6639 (1997)), *Klebsiella oxytoca* (Tobimatsu *et al., J. Biol. Chem.* 270:7142-7148 (1995)) y *Lactobacillus collinoides* (Sauvageot *et al., FEMS Microbiol. Lett.* 209:69-74 (2002)). Métodos para aislar genes de diol deshidratasa en otros organismos son bien conocidos en la técnica como se ejemplifica en la Patente Estadounidense No. 5,686,276, la cual se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
pddA	BAA08099.1	868006	*Klebsiella oxytoca*
pddB	BAA08100.1	868007	*Klebsiella oxytoca*
pddC	BAA08101.1	868008	*Klebsiella oxytoca*
pduC	AAB84102.1	2587029	*Salmonella typhimurium*
pduD	AAB84103.1	2587030	*Salmonella typhimurium*

pduE	AAB84104.1	2587031	*Salmonella typhimurium*
pduC	CAC82541.1	18857678	*Lactobacullus collinoides*
pduD	CAC82542.1	18857679	*Lactobacullus collinoides*
pduE	CAD01091.1	18857680	*Lactobacullus collinoides*
pddA	AAC98384.1	4063702	*Klebsiella pneumoniae*
pddB	AAC98385.1	4063703	*Klebsiella pneumoniae*
pddC	AAC98386.1	4063704	*Klebsiella pneumoniae*

Enzimas en la familia glicerol deshidratasa (EC 4.2.1.30) también pueden ser usadas para deshidratar eritrosa-4-fosfato. Genes ejemplares incluyen gldABC y dhaB123 en Klebsiella *pneumoniae* (WO 2008/137403) y (Toraya *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69:475-480 (1976)), *dhaBCE* en *Clostridium pasteuranum* (Macis *et al., FEMS Microbiol Lett.* 164:21-28 (1998)) y dhaBCE en *Citrobacter freundii* (Seyfried *et al., J. Bacteriol.* 178:5793-5796 (1996)). Variantes de la diol deshidratasa dependiente de B12 de *K. pneumoniae* con 80- a 336-veces la actividad mejorada fueron recientemente diseñadas por ingeniería para introducir mutaciones en dos residuos de la subunidad beta (Qi *et al., J. Biotechnol.* 144:43-50 (2009)). Enzimas diol deshidratasa con cinéticas de inactivación reducida fueron desarrolladas por DuPont usando PCR propensa a error (WO 2004/056963).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
gldA	AAB96343.1	1778022	*Klebsiella pneumoniae*
gldB	AAB96344.1	1778023	*Klebsiella pneumoniae*
gldC	AAB96345.1	1778024	*Klebsiella pneumoniae*
dhaB1	ABR78884.1	150956854	*Klebsiella pneumoniae*
dhaB2	ABR78883.1	150956853	*Klebsiella pneumoniae*
dhaB3	ABR78882.1	150956852	*Klebsiella pneumoniae*
dhaB	AAC27922.1	3360389	*Clostridium pasteuranum*
dhaC	AAC27923.1	3360390	*Clostridium pasteuranum*
dhaE	AAC27924.1	3360391	*Clostridium pasteuranum*
dhaB	P45514.1	1169287	*Citrobacter freundii*
dhaC	AAB48851.1	1229154	*Citrobacter freundii*
dhaE	AAB48852.1	1229155	*Citrobacter freundii*

Si una diol deshidratasa dependiente de B12 se utiliza, la expresión heteróloga del factor de reactivación correspondiente se emplea. Diol deshidratasas dependientes de B12 son sometidas a activación suicida a ase de mecanismos por sustratos y algunos productos corriente abajo. La inactivación, causada por una estrecha asociación con cobalamina inactiva, puede ser parcialmente superada por factores de reactivación de diol deshidratasa en un proceso dependiente de ATP. La regeneración del cofactor B12 es dependiente de ATP. Factores de regeneración de diol deshidratasa son proteínas de dos sub-unidades. Genes ejemplares se encuentran en *Klebsiella oxytoca* (Mori *et al., J. Biol. Chem.* 272:32034-32041 (1997)), *Salmonella typhimurium* (Bobik *et al., J. Bacteriol.* 179:6633-6639 (1997); Chen *et al., J. Bacteriol.* 176:5474-5482 (1994)), *Lactobacillus collinoides* (Sauvageot *et al., FEMS Microbiol. Lett.* 209:69-74 (2002)), y *Klebsiella pneumonia* (WO 2008/137403).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
ddrA	AAC15871.1	3115376	*Klebsiella oxytoca*
ddrB	AAC15872.1	3115377	*Klebsiella oxytoca*
pduG	AAL20947.1	16420573	*Salmonella typhimurium*
pduH	AAL20948.1	16420574	*Salmonella typhimurium*
pduG	YP_002236779	206579698	*Klebsiella pneumonia*
pduH	YP_002236778	206579863	*Klebsiella pneumonia*
pduG	CAD01092	29335724	*Lactobacillus collinoides*
pduH	CAD01093	29335725	*Lactobacillus collinoides*

Enzimas diol deshidratasas dependientes de B12 utilizan S-adenosilmetionina (SAM) como un cofactor, funcionan bajo condiciones estrictamente anaeróbicas, y requieren activación por una enzima de activación específica (Frey *et al., Chem. Rev.* 103:2129-2148 (2003)). La glicerol deshidrogenasa y factor de activación correspondiente de *Clostridium butyricum*, codificada por *dhaB1 y dhaB2*, han sido bien caracterizados (O'Brien *et al., Biochemistry* 43:4635-4645 (2004); Raynaud *et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA* 100:5010-5015 (2003)). Esta enzima fue recientemente empleada en una cepa de *E. coli* que sobre produce 1,3-propanodiol y fue capaz de lograr tituladores muy altos de producto (Tang *et al., Appl. Environ. Microbiol.* 75:1628-1634 (2009)). Una

enzima diol deshidratasa independiente de B12 adicional y factor de activación de *Roseburia inulinivorans* se mostró por catalizar la conversión de 2,3-butanodiol a 2-butanona (Publicación Estadounidense 2009/09155870).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
dhaB1	AAM54728.1	27461255	*Clostridium butyricum*
dhaB2	AAM54729.1	27461256	*Clostridium butyricum*
rdhtA	ABC25539.1	83596382	*Roseburia inulinivorans*
rdhtB	ABC25540.1	83596383	*Roseburia inulinivorans*

Dihidroxi-ácido deshidratasa (DHAD, EC 4.2.1.9) es una enzima independiente de B12 que participa en la biosíntesis de aminoácido de cadena ramificada. En su papel nativo, convierte 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato a 2-ceto-3-metil-valerato, un precursor de isoleucina. En la biosíntesis de valina, la enzima cataliza la deshidratación de 2,3-dihidroxi-isovalerato a 2-oxoisovalerato. La DHAD de *Sulfolobus solfataricus* tiene un amplio rango de sustrato, y la actividad de una enzima recombinante expresada en *E. coli* se demostró en una variedad de ácidos aldónicos (Kim y Lee, *J. Biochem.* 139:591-596 (2006)). La enzima de *S. solfataricus* es tolerante al oxígeno distinto de muchas enzimas diol deshidratasas. La enzima de *E. coli*, codificada por *ilvD,* es sensible al oxígeno, el cual inactiva su agrupamiento de hierro-azufre (Flint *et al., J. Biol. Chem.* 268:14732-14742 (1993)). Enzimas similares han sido caracterizadas en *Neurospora crassa* (Altmiller y Wagner, *Arch. Biochem. Biophys.* 138:160-170 (1970)) y *Salmonella typhimurium* (Armstrong *et al., Biochim. Biophys. Acta* 498:282-293 (1977)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
ilvD	NP_344419.1	15899814	*Sulfolobus solfataricus*
ilvD	AAT48208.1	48994964	*Escherichia coli*
ilvD	NP_462795.1	16767180	*Salmonella typhimurium*
ilvD	XP_958280.1	85090149	*Neurospora crassa*

La diol deshidratasa myo-inososa-2-deshidratasa (EC 4.2.1.44) es otra enzima ejemplar. Myo-inososa es un anillo de seis elementos que contiene

grupos de alcohol adyacentes. Una enzima purificada que codifica la funcionalidad de myo-inososa-2-deshidratasa ha sido estudiada en *Klebsiella aerogenes* en el contexto de la degradación de myo-inositol (Berman and Magasanik, *J. Biol. Chem.* 241:800-806 (1966)), pero no se ha asociado con a gene a la fecha. La myo-inososa-2-deshidratasa de *Sinorhizobium fredii* se clonó y funcionalmente expresó en *E. coli* (Yoshida *et al., Biosci.Biotechnol. Biochem.* 70:2957-2964 (2006)). Una enzima similar de *B. subtilis*, codificada por *iolE*, también ha sido estudiada (Yoshida *et al., Microbiology* 150:571-580 (2004)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
iolE	P42416.1	1176989	*Bacillus subtilis*
iolE	AAX24114.1	60549621	*Sinorhizobium fredii*

B. (2,4-Dioxobutoxi)fosfonato reductasa: Una enzima con actividad de (2,4-dioxobutoxi)fosfonato reductasa es usada para convertir 24DBP a 2H4OP. Aunque este compuesto no es un sustrato conocido de enzimas de alcohol deshidrogenasa, varias enzimas en la clase EC 1.1.1 catalizan reacciones similares. Enzimas ejemplares que reducen cetonas de sustratos fosforilados incluyen glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.8), 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (EC 1.1.1.95) y eritronato-4-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.290). Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa cataliza la reducción dependiente de NAD(P)H de dihidroxiacetona-fosfato a glicerol-3-fosfato. Esta enzima es codificada por *gpsA* de *E. coli* (Kito *et al., J Biol.Chem.* 244:3316-3323 (1969)). 3-Fosfoglicerato deshidrogenasa cataliza la primera etapa de la biosíntesis de serina en varios organismos que incluyen *E. coli*, donde es codificada por el gen *serA* (Tobey *et al., J Biol.Chem.* 261:12179-12183 (1986)). Eritronato-4-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.290) cataliza la reducción reversible de 2-oxo-3-hidroxi-4-fosfobutanoato a eritronato-4-fosfato. Esta enzima, codificada por *pdxB* de *E. coli*, normalmente opera en la dirección reversa en el contexto de la biosíntesis de 5'-fosfato piridoxal (Schoenlein *et al., J Bacteriol.* 171:6084-6092 (1989)). Una enzima similar codificada por *pdxB* en *Pseudomonas aeruginosa* ha sido caracterizada y heterólogamente expresada en *E. coli* (Ha *et al., Acta Crystallogr.Sect.F.Struct.Biol.Cryst.Commun.* 62:139-141 (2006)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
gpsA	AAC76632.1	1790037	*Escherichia coli*
serA	AAC75950.1	1789279	*Escherichia coli*
pdxB	AAC75380.1	1788660	*Escherichia coli*
pdxB	AAG04764.1	9947319	*Pseudomonas aeruginosa*

Una amplia variedad de enzimas de alcohol deshidrogenasa catalizan la reducción de un grupo funcional cetona a un alcohol. Dos de tales enzimas de *E. coli* son codificadas por malato deshidrogenasa (*mdh*) y lactato deshidrogenasa (*ldhA*). Lactato deshidrogenasa de *Ralstonia eutropha* ha sido mostrada por demostrar altas actividades en 2-cetoácidos de varias longitudes de cadena que incluyen lactato, 2-oxobutirato, 2-oxopentanoato y 2-oxoglutarato (Steinbuchel *et al., Eur.J.Biochem.* 130:329-334 (1983)). La conversión de alfa-cetoadipato en alfa-hidroxiadipato puede ser catalizada por 2-cetoadipato reductasa, una enzima reportada por ser encontrada en ratas y en placenta humana (Suda *et al., Arch.Biochem.Biophys.* 176:610-620 (1976); Suda *et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.* 77:586-591 (1977)). Una oxidorreductasa adicional es la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa (*bdh*) mitocondrial del corazón humano la cual ha sido clonada y caracterizada (Marks *et al., J.Biol.Chem.* 267:15459-15463 (1992)). Enzimas de alcohol deshidrogenasa de *C. beijerinckii* (Ismaiel *et al., J.Bacteriol.* 175:5097-5105 (1993)) y *T. brockii* (Lamed *et al., Biochem.J.* 195:183-190 (1981); Peretz *et al., Biochemistry.* 28:6549-6555 (1989)) convierten acetona a isopropanol. Metil etil cetona reductasa, o alternativamente, 2-butanol deshidrogenasa, catalizan la reducción de MEK para formar 2-butanol. Enzimas ejemplares pueden ser encontradas en *Rhodococcus ruber* (Kosjek *et al., Biotechnol Bioeng.* 86:55-62 (2004)) y *Pyrococcus furiosus* (van der *et al., Eur.J.Biochem.* 268:3062-3068 (2001)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
mdh	AAC76268.1	1789632	*Escherichia coli*
ldhA	NP_415898.1	16129341	*Escherichia coli*
ldh	YP_725182.1	113866693	*Ralstonia eutropha*
bdh	AAA58352.1	177198	*Homo sapiens*
adh	AAA23199.2	60592974	*Clostridium beijerinckii* NRRL

			B593
adh	P14941.1	113443	*Thermoanaerobacter brockii* HTD4
adhA	AAC25556	3288810	*Pyrococcus furiosus*
sadh	*CAD36475*	21615553	*Rhodococcus ruber*

Un número de organismos pueden catalizar la reducción de 4-hidroxi-2-butanona a 1,3-butanodiol, que incluyen aquellos que pertenecen al género *Bacillus, Brevibacterium, Candida, y Klebsiella* entre otros, como se describe por Matsuyama et al. ((1995)). Una *Rhodococcus* fenilacetaldehído reductasa (Sar268) mutada y una alcohol deshidrogenasa de *Leifonia* también se han mostrado por catalizar esta transformación a altos rendimientos (Itoh *et al., Appl.Microbiol Biotechnol.* 75:1249-1256 (2007)).

Homoserina deshidrogenasa (EC 1.1.1.13) cataliza la reducción dependiente de NAD(P)H de aspartato semialdehído a homoserina. En muchos organismos, que incluyen *E. coli*, la homoserina deshidrogenasa es una enzima bifuncional que también cataliza la conversión dependiente de AT*P* de aspartato a aspartil-4-fosfato (Starnes *et al., Biochemistry* 11:677-687 (1972)). Los dominios funcionales son catalíticamente independientes y conectados por una región enlazadora (Sibilli *et al., J Biol.Chem.* 256:10228-10230 (1981)) y ambos dominios son sometidos a inhibición alostérica por treonina. El dominio de homoserina deshidrogenasa en la enzima de *E. coli*, codificada por *thrA*, se separó del dominio de aspartato cinasa, caracterizó y encontró por presentar alta actividad catalítica e inhibición reducida por treonina (James *et al., Biochemistry* 41:3720-3725 (2002)). Esto puede ser aplicado a otras treoninas cinasas bifuncionales que incluyen, por ejemplo, *hom1* de *Lactobacillus plantarum* (Cahyanto *et al., Microbiology* 152:105-112 (2006)) y *Arabidopsis thaliana*. Las homoserinas deshidrogenasas monofuncionales codificadas por *hom6* en *S. cerevisiae* (Jacques *et al., Biochim.Biophys.Acta* 1544:28-41 (2001)) y *hom2* en *Lactobacillus plantarum* (Cahyanto *et al., Microbiology* 152:105-112 (2006)) han sido funcionalmente expresadas y caracterizada en *E. coli*.

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
thrA	AAC73113.1	1786183	*Escherichia coli K12*
akthr2	O81852	75100442	*Arabidopsis thaliana*

hom6	CAA89671	1015880	*Saccharomyces cerevisiae*
hom1	CAD64819	28271914	*Lactobacillus plantarum*
hom2	CAD63186	28270285	*Lactobacillus plantarum*

EJEMPLO VII

Trayectorias a benceno y Tolueno

Este ejemplo muestra trayectorias de benzoato y benzoil-CoA a benceno, y *p*-toluato y *p*-metilbenzoil-CoA a tolueno.

Trayectorias para la producción enzimática de benceno de benzoato o benzoil-CoA se muestran en la Figura 10. Benzoato y benzoil-CoA son intermediarios metabólicos que se originan naturalmente comunes a diversas trayectorias de degradación aromática. El benzoato también puede ser producido por la ruta de la trayectoria alterna de shikimato descrita en la presente. Varias rutas de benzoato y/o benzoil-CoA a benceno se muestran en la Figura 10. Primero, el benceno puede ser producido directamente de benzoato vía la descarboxilación (Figura 10, trayectoria E). Alternativamente, la porción de ácido puede ser reducida a un aldehído ya sea directamente por una reductasa del ácido benzoico (Figura 10, Trayectoria B) o indirectamente vía intermediarios de benzoil-CoA y/o (benzoiloxi)fosfonato (Figura 10, trayectorias A y D, Trayectoria B, Trayectoria H y G, o trayectorias A, F, y G). El benzaldehído puede ser subsecuentemente descarbonilado para formar benceno (Figura 10, Trayectoria C).

Trayectorias similares para la producción enzimática de tolueno de *p*-toluato y/o *p*-metilbenzoil-CoA se muestran en la Figura 11. *p*-Toluato puede ser producido por la vía de la trayectoria alterna de shikimato como se describe en la presente. Las rutas para convertir *p*-toluato (también conocido como *p*-metilbenzoato) y/o *p*-metilbenzoil-CoA a tolueno son análogas a la transformación de benzoato o benzoil-CoA a benceno, descrita anteriormente. Enzimas para catalizar las transformaciones mostradas en las Figuras 10 y 11 son categorizadas por el número EC y descritas además abajo.

Etiqueta	Función	Fig-Trayectoria
1.2.1.b	Oxidorreductasa (acil-CoA a aldehído)	6/7-D
1.2.1.d	Oxidorreductasa (fosforilación/desfosforilación)	6/7-G
1.2.1.e	Oxidorreductasa (ácido a aldehído)	6/7-B
2.3.1.a	Aciltransferasa (transferir grupo fosfato a CoA; fosfotransacilasa)	6/7-F
2.7.2.a	Fosfotransferasa, aceptor de grupo carboxilo (cinasa)	6/7-H
2.8.3.a	Coenzima-A transferasa	6/7-A
3.1.2.a	Tioléster hidrolasa (específico de CoA)	6/7-A
4.1.1.a	Carboxi-liasa	6/7-E
4.1.99.a	Descarbonilasa	6/7-C
6.2.1.a	Ácido-tiol ligasa	6/7-A

1.2.1.b Oxidorreductasa (acil-CoA a aldehído): Una enzima con actividad de benzoil-CoA reductasa es usada para convertir benzoil-CoA en benzaldehído (Trayectoria D de la Figura 10). De manera similar, La reducción de *p*-metilbenzoil-CoA a *p*-metilbenzaldehído (también llamada *p*-tolualdehído) es catalizada por una enzima con actividad de *p*-metilbenzoil-CoA reductasa (Trayectoria D de la Figura 11). Aunque las enzimas con estas actividades no han sido caracterizadas, una enzima que cataliza una reacción similar es cinamoil-CoA reductasa (EC 1.2.1.44). Esta enzima cataliza la reducción dependiente de NAD(P)H de cinamoil-CoA y derivados aromáticos sustituidos tales como cumaroil-CoA y feruloil-CoA. La enzima ha sido caracterizada en organismos que incluyen *Arabidopsis thaliana (Lauvergeat et al., Phytochemistry 57:1187-1195 (2001))*, *Triticum aestivum (Ma, J Exp.Bot. 58:2011-2021 (2007))* y *Panicum virgatum (Escamilla-Trevino et al., New Phytol. 185:143-155 (2010))*. Las enzimas de *A. thaliana* y *P. virgatum* fueron caracterizadas y heterólogamente expresadas en *E. coli*.

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
TaCCR1	ABE01883.1	90902167	*Triticum aestivum*
AtCCR1	AAU45042.1	52355804	*Arabidopsis thaliana*

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
AtCCR2	AAG53687.1	12407990	*Arabidopsis thaliana*
PvCCR1	ACZ74580.1	270315096	*Panicum virgatum*
PvCCR2	ACZ74585.1	270315106	*Panicum virgatum*

Varias otras acil-CoA reductasas bien caracterizadas reducen una acil-CoA a su aldehído correspondiente. Enzimas ejemplares incluye acil-CoA reductasa grasa (EC 1.2.1.50), succinil-CoA reductasa (EC 1.2.1.76), acetil-CoA reductasa (EC 1.2.1.10) y butiril-CoA reductasa. Enzimas acil-CoA reductasas grasas ejemplares son codificadas por *acr1* de *Acinetobacter calcoaceticus* (Reiser *et al.,* 179:2969-2975 (1997)) y *Acinetobacter sp. M-1* (Ishige *et al., Appl.Environ.Microbiol.* 68:1192-1195 (2002)). Enzimas con actividad de succinil-CoA reductasa son codificadas por *sucD* de *Clostridium kluyveri* (Sohling *et al., J Bacteriol.* 178:871-880 (1996a); Sohling *et al.,* 178:871-80 (1996)) y *sucD* de *P. gingivalis* (Takahashi *et al., J.Bacteriol.* 182:4704-4710 (2000)). Enzimas adicionales de succinil-CoA reductasa participan en el ciclo de 3-hidroxipropionato/4-hidroxibutirato de archaea termofílica tales como *Metallosphaera sedula* (Berg *et al., Science.* 318:1782-1786 (2007)) y *Thermoproteus neutrophilus* (Ramos-Vera *et al., J Bacteriol.* 191:4286-4297 (2009)). La CoA reductasa de *M. sedula*, codificada por *Msed_0709*, es dependiente de NADPH y también tiene actividad de malonil-CoA reductasa. La enzima *T. neutrophilus* es active con tanto NADPH como NADH. La acetaldehído deshidrogenasa acilante en *Pseudomonas sp*, codificada por *bphG*, ha sido demostrada por oxidar y acilar acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, isobutiraldehído y formaldehído a sus ésteres de CoA correspondientes (Powlowski *et al.,* 175:377-385 (1993)). Además de reducir acetil-CoA a etanol, la enzima codificada por *adhE* en *Leuconostoc mesenteroides* ha sido mostrada por oxidar el compuesto de cadena ramificada isobutiraldehído a isobutiril-CoA (Koo *et al., Biotechnol Lett.* 27:505-510 (2005)). La butiraldehído deshidrogenasa cataliza una reacción similar, conversión de butiril-CoA a butiraldehído, en organismos solventogénicos tales como *Clostridium saccharoperbutilacetonicum* (Kosaka *et al., Biosci.Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007)). La acil-CoA reductasa codificada por *ald* en *Clostridium beijerinckii* ha sido indicada por reducir acetil-CoA y butiril-CoA a sus aldehídos correspondientes (Toth *et al., Appl Environ.Microbiol* 65:4973-4980 (1999)). Esta enzima presenta alta homología de secuencia a las

enzimas acetaldehído deshidrogenasas dependientes de CoA de *Salmonella typhimurium* y *E. coli* codificada por *eutE* (Toth *et al., Appl Environ.Microbiol* 65:4973-4980 (1999)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
acr1	YP_047869.1	50086359	*Acinetobacter calcoaceticus*
acr1	AAC45217	1684886	*Acinetobacter bailyi*
acr1	BAB85476.1	18857901	*Acinetobacter sp. cepa M-1*
Msed_0709	YP_001190808.1	146303492	*Metallosphaera sedula*
Tneu_0421	ACB39369.1	170934108	*Thermoproteus neutrophilus*
sucD	P38947.1	172046062	*Clostridium kluyveri*
sucD	NP_904963.1	34540484	*Porphyromonas gingivalis*
bphG	BAA03892.1	425213	*Pseudomonas sp*
adhE	AAV66076.1	55818563	*Leuconostoc mesenteroides*
bld	AAP42563.1	31075383	*Clostridium saccharoperbutilacetonicum*
ald	AAT66436	9473535	*Clostridium beijerinckii*
eutE	AAA80209	687645	*Salmonella typhimurium*
eutE	P77445	2498347	*Escherichia coli*

Una enzima CoA reductasa adicional es malonil-CoA reductasa la cual transforma malonil-CoA a semialdehído malónico. La malonil-CoA reductasa es una enzima clave en la fijación de carbono autotrófico vía el ciclo de 3-hidroxipropionato en la bacteria archael termoacidofílica (Berg *et al.,* 318:1782-1786 (2007); Thauer, 318:1732-1733 (2007)). La enzima utiliza NADPH como un cofactor y ha sido caracterizada en *Metallosphaera* y *Sulfolobus spp* (Alber *et al.,* 188:8551-8559 (2006); Hugler *et al.,* 184:2404-2410 (2002)). La enzima es codificada por *Msed_0709* en *Metallosphaera sedula* (Alber *et al.,* 188:8551-8559 (2006); Berg *et al.,* 318:1782-1786 (2007)). Un gene que codifica una malonil-CoA reductasa de *Sulfolobus tokodaii* se clonó y heterólogamente expresó en *E. coli* (Alber *et al.,* 188:8551-8559 (2006)). Esta enzima también ha sido indicada por catalizar la conversión de metilmalonil-CoA a su aldehído correspondiente

(WO/2007/141208). Ambos candidatos de la enzima malonil-CoA reductasa tiene alta similitud de secuencia a la aspartato-semialdehído deshidrogenasa, una enzima que cataliza la reducción y desfosforilación concurrente de aspartil-4-fosfato a aspartato semialdehído. Genes adicionales pueden ser encontrados por homología de secuencia a proteínas en otros organismos que incluyen *Sulfolobus solfataricus y Sulfolobus acidocaldarius*.

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
Msed_0709	YP_001190808.1	146303492	*Metallosphaera sedula*
mcr	NP_378167.1	15922498	*Sulfolobus tokodaii*
asd-2	NP_343563.1	15898958	*Sulfolobus solfataricus*
Saci_2370	YP_256941.1	70608071	*Sulfolobus acidocaldarius*

1.2.1.d Oxidorreductasa (fosforilación/desfosforilación) (10/11 G): Las reducciones de (benzoiloxi)fosfonato a benzaldehído (Trayectoria G de la Figura 10) y (*p*-metilbenzoiloxi)fosfonato a *p*-metilbenzaldehído (Trayectoria G de la Figura 11) son catalizadas por enzimas con actividades de fosfonato reductasa. Aunque las enzimas que cataliza estas conversiones no han sido identificadas a la fecha, transformaciones similares catalizadas por gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (EC 1.2.1.12), aspartato-semialdehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.11) acetilglutamilfosfato reductasa (EC 1.2.1.38) y glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.) están bien documentadas. La aspartato semialdehído deshidrogenasa (ASD, EC 1.2.1.11) cataliza la reducción dependiente de NADPH de 4-aspartil fosfato a aspartato-4-semialdehído. ASD participa en la biosíntesis de aminoácido y recientemente ha sido estudiada como un objetivo antimicrobiano (Hadfield *et al., Biochemistry* 40:14475-14483 (2001)). La estructura de ASD de *E. coli* ha sido resuelta (Hadfield *et al., J Mol.Biol.* 289:991-1002 (1999)) y la enzima ha sido mostrada por aceptar el sustrato alterno beta-3-metilaspartil fosfato (Shames *et al., J Biol.Chem.* 259:15331-15339 (1984)). La enzima *Haemophilus influenzae* ha sido el sujeto de estudios de ingeniería enzimática para alterar las afinidades de enlace del sustrato en el sitio activo (Blanco *et al., Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 60:1388-1395 (2004)). Otros genes ASD /enzimas se encuentran en *Mycobacterium tuberculosis* (Shafiani *et al., J Appl Microbiol* 98:832-838 (2005)), *Methanococcus jannaschii* (Faehnle *et al., J Mol.Biol.* 353:1055-1068 (2005)), y los microorganismos infecciosos *Vibrio cholera y*

Helicobacter pilori (Moore *et al., Protein Expr.Purif.* 25:189-194 (2002)). Una enzima relacionada es acetilglutamilfosfato reductasa (EC 1.2.1.38), una enzima que naturalmente reduce acetilglutamilfosfato a acetilglutamato-5-semialdehído, encontrada en *S. cerevisiae* (Pauwels *et al., Eur.J Biochem.* 270:1014-1024 (2003)), *B. subtilis* (O'Reilly *et al., Microbiology* 140 (Pt 5):1023-1025 (1994)), *E. coli* (Parsot *et al., Gene.* 68:275-283 (1988)), y otros organismos. Enzimas adicionales de fosfato reductasa de *E. coli* incluyen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa codificada por *gapA* (Branlant *et al., Eur.J.Biochem.* 150:61-66 (1985)) y glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa codificada por *proA* (Smith *et al., J.Bacteriol.* 157:545-551 (1984b)). Genes que codifican glutamato-5-semienzimas aldehído deshidrogenasas de *Salmonella typhimurium* (Mahan *et al., J Bacteriol.* 156:1249-1262 (1983)) y *Campilobacter jejuni* (Louie *et al., Mol.Gen.Genet.* 240:29-35 (1993)) se clonaron y expresaron en *E. coli.*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
asd	NP_417891.1	16131307	*Escherichia coli*
asd	YP_248335.1	68249223	*Haemophilus influenzae*
asd	AAB49996	1899206	*Mycobacterium tuberculosis*
VC2036	NP_231670	15642038	*Vibrio cholera*
asd	YP_002301787.1	210135348	*Helicobacter pilori*
ARG5,6	NP_010992.1	6320913	*Saccharomyces cerevisiae*
argC	NP_389001.1	16078184	*Bacillus subtilis*
argC	NP_418393.1	16131796	*Escherichia coli*
gapA	P0A9B2.2	71159358	*Escherichia coli*
proA	NP_414778.1	16128229	*Escherichia coli*
proA	NP_459319.1	16763704	*Salmonella typhimurium*
proA	P53000.2	9087222	*Campilobacter jejuni*

1.2.1.e Oxidorreductasa (ácido a aldehído): La conversión directa de benzoato a benzaldehído o *p*-toluato a *p*-metilbenzaldehído (Trayectoria B de la Figuras 10 y 11) es catalizada por una reductasa de ácido carboxílico. Enzimas ejemplares incluyen reductasa de ácido carboxílico, alfa-aminoadipato reductasa y reductasa de ácido retinoico. La reductasa de ácido carboxílico (CAR) cataliza el

magnesio, ATP y reducción dependiente de NADPH de ácidos carboxílicos a sus aldehídos correspondientes (Venkitasubramanian *et al., J Biol.Chem.* 282:478-485 (2007)). El sustrato natural de esta enzima es benzoato y la enzima presenta amplia aceptación de sustratos aromáticos que incluyen *p*-toluato (Venkitasubramanian *et al., Biocatalysis in Pharmaceutical and Biotechnology Industries*. CRC press (2006)). La enzima de *Nocardia iowensis*, codificada por *car,* se clonó y funcionalmente expresó en *E. coli* (Venkitasubramanian *et al., J Biol.Chem.* 282:478-485 (2007)). CAR requiere activación post-traduccional por una fosfopanteteína transferasa (PPTase) que convierte la enzima apo inactiva a la enzima holo activa (Hansen *et al., Appl.Environ.Microbiol* 75:2765-2774 (2009)). La expresión del gen *npt,* que codifica una PPTase específica, mejoró la actividad de la enzima. Una enzima similar encontrada en *Streptomyces griseus* es codificada por los genes *griC* y *griD*. Esta enzima ha sido indicada para convertir 3-amino-4-hidroxiácido benzoico a 3-amino-4-hidroxibenzaldehído, como la supresión de ya sea *griC* o *griD* conduce a acumulación del ácido 3-acetilamino-4-hidroxibenzoico, un producto de derivación del metabolismo del ácido 3-acetilamino-4-hidroxibenzoico (Suzuki, *et al., J. Antibiot.* 60(6):380-387 (2007)). La PPTase de *S. griseus* es probablemente codificada por *SGR_665*, como se predice por homología de secuencia al gen npt de *Nocardia iowensis*.

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
car	AAR91681.1	40796035	*Nocardia iowensis*
npt	ABI83656.1	114848891	*Nocardia iowensis*
griC	YP_001825755.1	182438036	*Streptomyces griseus*
griD	YP_001825756.1	182438037	*Streptomyces griseus*
SGR_665	YP_001822177.1	182434458	*Streptomyces griseus*

Una enzima con características similares, alfa-aminoadipato reductasa (AAR, EC 1.2.1.31), participa en las trayectorias de la biosíntesis de lisina en algunas especies fúngicas. Esta enzima naturalmente reduce alfa-aminoadipato a alfa-aminoadipato semialdehído. El grupo carboxilo es primero activado a través de la formación dependiente de ATP de un adenilato que es entonces reducido por NAD(P)H para proporcionar el aldehído y AMP. Como CAR, esta enzima utiliza magnesio y es activada por una PPTase. Enzimas para AAR y

sus PPTase correspondientes se encuentran en *Saccharomyces cerevisiae* (Morris *et al., Gene* 98:141-145 (1991)), *Candida albicans* (Guo *et al., Mol.Genet.Genomics* 269:271-279 (2003)), *y Schizosaccharomyces pombe* (Ford *et al., Curr.Genet.* 28:131-137 (1995)). La AAR de *S. pombe* presenta actividad significante cuando es expresada en *E. coli* (Guo *et al., Yeast* 21:1279-1288 (2004)). La AAR de *Penicillium chrysogenum* acepta S-carboximetil-L-cisteína como un sustrato alterno, pero no reacciona con adipato, L-glutamato o diaminopimelato (Hijarrubia *et al., J Biol.Chem.* 278:8250-8256 (2003)). El gen que codifica la PPTase de *P. chrysogenum* no se ha identificado a la fecha y no se identificaron obstáculos de alta confianza por búsqueda de homología de comparación de secuencia.

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
LYS2	AAA34747.1	171867	*Saccharomyces cerevisiae*
LYS5	P50113.1	1708896	*Saccharomyces cerevisiae*
LYS2	AAC02241.1	2853226	*Candida albicans*
LYS5	AAO26020.1	28136195	*Candida albicans*
Lys1p	P40976.3	13124791	*Schizosaccharomyces pombe*
Lys7p	Q10474.1	1723561	*Schizosaccharomyces pombe*
Lys2	CAA74300.1	3282044	*Penicillium chrysogenum*

2.3.1.a Aciltransferasa (fosfotransacilasa): Una enzima con actividad de fosfotransbenzoilasa es usada para interconvertir benzoil-CoA y (benzoiloxi)fosfonato (Trayectoria F de la Figura 10). Una enzima similar con actividad fosfotrans-*p*-metilbenzoilasa interconvierte *p*-metilbenzoil-CoA y (*p*-metilbenzoiloxi) fosfonato (Trayectoria F de la Figura 11). Las aciltransferasas de transferencia de fosfato ejemplares incluyen fosfotransacetilasa (EC 2.3.1.8) y fosfotransbutirilasa (EC 2.3.1.19). El gen *pta* de *E. coli* codifica una fosfotransacetilasa que convierte reversiblemente acetil-CoA en acetil-fosfato (Suzuki, *Biochim.Biophys.Acta* 191:559-569 (1969)). Esta enzima puede también convertir propionil-CoA propionilfosfato (Hesslinger *et al., Mol.Microbiol* 27:477-492

(1998)). Otras fosfato acetiltransferasas que presentan actividad en propionil-CoA se encuentran en *Bacillus subtilis* (Rado *et al., Biochim.Biophys.Acta* 321:114-125 (1973)), *Clostridium kluyveri* (Stadtman, 1:596-599 (1955)), y *Thermotoga maritima* (Bock *et al., J Bacteriol.* 181:1861-1867 (1999)). De manera similar, el gen *ptb* de *C. acetobutilicum* codifica fosfotransbutirilasa, una enzima que convierte reversiblemente butiril-CoA en butiril-fosfato (Wiesenborn *et al., Appl Environ.Microbiol* 55:317-322 (1989); Walter *et al., Gene* 134:107-111 (1993)). Genes *ptb* adicionales se encuentran en bacterias que producen butirato L2-50 (Louis *et al., J.Bacteriol.* 186:2099-2106 (2004)) y *Bacillus megaterium* (Vazquez *et al., Curr.Microbiol* 42:345-349 (2001)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
pta	NP_416800.1	71152910	*Escherichia coli*
pta	P39646	730415	*Bacillus subtilis*
pta	A5N801	146346896	*Clostridium kluyveri*
pta	Q9X0L4	6685776	*Thermotoga maritima*
ptb	NP_349676	34540484	*Clostridium acetobutilicum*
ptb	AAR19757.1	38425288	bacterias que producen butirato L2-50
ptb	CAC07932.1	10046659	*Bacillus megaterium*

2.7.2.a Fosfotransferasa, aceptor de grupo carboxilo (cinasa): Cinasas o enzimas fosfotransferasas transforman ácidos carboxílicos a ácidos fosfónicos con hidrólisis concurrente de una ATP. Tal enzima es usada para convertir benzoato a (benzoiloxi)fosfonato (Figura 10, Trayectoria H) y *p*-toluato a (*p*-metilbenzoiloxi)fosfonato (Figura 11, Trayectoria H). Estas transformaciones exactas no han sido demostradas a la fecha. Enzimas ejemplares incluyen butirato cinasa (EC 2.7.2.7), isobutirato cinasa (EC 2.7.2.14), aspartocinasa (EC 2.7.2.4), acetato cinasa (EC 2.7.2.1) y gamma-glutamil cinasa (EC 2.7.2.11). Butirato cinasa cataliza la conversión reversible de butiril-fosfato a butirato durante la acidogénesis en especies *Clostridial* (Cary *et al., Appl.Environ.Microbiol* 56:1576-1583 (1990)). La enzima de *Clostridium acetobutilicum* es codificada por ya sea los dos productos del gen *buk* (Huang *et al., J Mol.Microbiol Biotechnol* 2:33-38 (2000)). Otras enzimas butirato cinasas se encuentran en *C. butyricum y C. tetanomorphum* (TWAROG *et al., J Bacteriol.* 86:112-117 (1963)). Una enzima

relacionada, isobutirato cinasa de *Thermotoga maritima,* fue expresada en *E. coli* y cristalizada (Diao *et al., J Bacteriol.* 191:2521-2529 (2009); Diao *et al., Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 59:1100-1102 (2003)). Aspartocinasa cataliza la fosforilación dependiente de ATP de aspartato y participa en la síntesis de varios aminoácidos. La enzima aspartocinasa III en *E. coli,* codificada por *lysC,* tiene un amplio rango de sustrato y los residuos catalíticos involucrados en la especificidad del sustrato han sido elucidados (Keng *et al., Arch.Biochem.Biophys.* 335:73-81 (1996)). Dos cinasas adicionales en *E. coli* son acetato cinasa y gamma-glutamil cinasa. La acetato cinasa de *E. coli*, codificada por *ackA* (Skarstedt *et al., J.Biol.Chem.* 251:6775-6783 (1976)), fosforila propionato además de acetato (Hesslinger *et al., Mol.Microbiol* 27:477-492 (1998)). La gamma-glutamil cinasa de *E. coli*, codificada por *proB* (Smith *et al., J.Bacteriol.* 157:545-551 (1984a)), fosforila el grupo de ácido carbónico gamma de glutamato.

Gen	ID de GenBank	Número GI	Organismo
buk1	NP_349675	15896326	*Clostridium acetobutilicum*
buk2	Q97II1	20137415	*Clostridium acetobutilicum*
buk2	Q9X278.1	6685256	*Thermotoga maritima*
lysC	NP_418448.1	16131850	*Escherichia coli*
ackA	NP_416799.1	16130231	*Escherichia coli*
proB	NP_414777.1	16128228	*Escherichia coli*

2.8.3.a CoA transferasa (10/11 A): CoA transferasas catalizan la transferencia reversible de una porción de CoA de una molécula a otra. La Trayectoria A de la Figura 10 es catalizada por una enzima con actividad de benzoil-CoA transferasa. En esta transformación, se forma benzoil-CoA de benzoato por la transferencia del grupo CoA de un donador de CoA tal como acetil-CoA, succinil-CoA u otros. *p*-Metilbenzoil-CoA transferasa cataliza una reacción similar de *p*-toluato en la Trayectoria A de la Figura 11. Enzimas de CoA transferasas ejemplares que reaccionan con sustratos similares incluyen cinamoil-CoA transferasa (EC 2.8.3.17) y bencilsuccinil-CoA transferasa. Cinamoil-CoA transferasa, codificada por *fldA* en *Clostridium sporogenes*, transfiere una porción de CoA de cinamoil-CoA a una variedad de sustratos de ácido aromático que

incluyen fenilacetato, 3-fenilpropionato y 4-fenilbutirato (Dickert *et al., Eur.J Biochem.* 267:3874-3884 (2000)). Bencilsuccinil-CoA transferasa utiliza succinil-CoA o maleil-CoA como el donador de CoA, formando bencilsuccinil-CoA de bencilsuccinato. Esta enzima se caracteriza en la desnitrificación de la bacteria *Thauera aromatica*, donde es codificada por *bbsEF* (Leutwein *et al., J Bacteriol.* 183:4288-4295 (2001)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
fldA	AAL18808.1	16417587	*Clostridium sporogenes*
bbsE	AAF89840.1	9622535	*Thauera aromatica*
bbsF	AAF89841.1	9622536	*Thauera aromatica*

Enzimas CoA transferasa adicionales con diversos rangos de sustratos incluyen succinil-CoA transferasa, 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, butiril-CoA transferasa, glutaconil-CoA transferasa y acetoacetil-CoA transferasa. Los productos del gen de *cat1*, *cat2*, y *cat3* de *Clostridium kluyveri* han sido mostrados por presentar actividad de succinil-CoA, 4-hidroxibutiril-CoA, y butiril-CoA transferasa, respectivamente (Seedorf *et al., Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 105:2128-2133 (2008); Sohling *et al., J Bacteriol.* 178:871-880 (1996b)). Actividades similares de CoA transferasa también están presentes en *Trichomonas vaginalis* (van Grinsven *et al., J.Biol.Chem.* 283:1411-1418 (2008)) y *Trypanosoma brucei* (Riviere *et al., J.Biol.Chem.* 279:45337-45346 (2004)). La enzima glutaconil-CoA-transferasa (EC 2.8.3.12) de la bacteria anaeróbica *Acidaminococcus fermentans* reacciona con glutaconil-CoA y 3-butenoil-CoA (Mack *et al., Eur.J.Biochem.* 226:41-51 (1994)). Los genes que codifican esta enzima son *gctA* y *gctB*. Esta enzima tiene actividad reducida pero detectable con otros derivados de CoA que incluyen glutaril-CoA, 2-hidroxiglutaril-CoA, adipil-CoA, crotonil-CoA y acrilil-CoA (Buckel *et al., Eur.J Biochem.* 118:315-321 (1981)). La enzima ha sido clonada y expresada en *E. coli* (Mack *et al., Eur.J.Biochem.* 226:41-51 (1994)). La actividad de glutaconato CoA-transferasa también se ha detectado en *Clostridium sporosphaeroides* y *Clostridium symbiosum*. Acetoacetil-CoA transferasa utiliza acetil-CoA como el donador de CoA. Esta enzima es codificada por los genes *atoA* (subunidad alfa) y *atoD* (subunidad beta) de *E. coli* (Korolev *et al., Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 58:2116-2121 (2002); Vanderwinkel *et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.* 33:902-908 (1968)). Esta enzima tiene un amplio rango de sustrato (Sramek *et al., Arch.Biochem.Biophys.* 171:14-26 (1975)) y se

ha mostrado por transferir la porción CoA de acetil-CoA a una variedad de sustratos, que incluyen isobutirato (Matthies *et al., Appl Environ.Microbiol* 58:1435-1439 (1992)), valerato (Vanderwinkel *et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.* 33:902-908 (1968)) y butanoato (Vanderwinkel *et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.* 33:902-908 (1968)). Existen enzimas similares en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Duncan *et al., Appl.Environ.Microbiol* 68:5186-5190 (2002)), *Clostridium acetobutilicum* (Cary *et al., Appl.Environ.Microbiol* 56:1576-1583 (1990); Wiesenborn *et al., Appl.Environ.Microbiol* 55:323-329 (1989)), y *Clostridium saccharoperbutilacetonicum* (Kosaka *et al., Biosci.Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
cat1	P38946.1	729048	*Clostridium kluyveri*
cat2	P38942.2	172046066	*Clostridium kluyveri*
cat3	EDK35586.1	146349050	*Clostridium kluyveri*
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	*Trichomonas vaginalis G3*
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	*Trypanosoma brucei*
gctA	CAA57199.1	559392	*Acidaminococcus fermentans*
gctB	CAA57200.1	559393	*Acidaminococcus fermentans*
gctA	ACJ24333.1	212292816	*Clostridium symbiosum*
gctB	ACJ24326.1	212292808	*Clostridium symbiosum*
atoA	P76459.1	2492994	*Escherichia coli K12*
atoD	P76458.1	2492990	*Escherichia coli K12*
actA	YP_226809.1	62391407	*Corynebacterium glutamicum*
cg0592	YP_224801.1	62389399	*Corynebacterium glutamicum*
ctfA	NP_149326.1	15004866	*Clostridium acetobutilicum*
ctfB	NP_149327.1	15004867	*Clostridium acetobutilicum*
ctfA	AAP42564.1	31075384	*Clostridium saccharoperbutilacetonicum*
ctfB	AAP42565.1	31075385	*Clostridium saccharoperbutilacetonicum*

3.1.2.a CoA hidrolasa (10/11 A): Benzoil-CoA y *p*-metilbenzoil-CoA

pueden ser hidrolizados a sus correspondientes ácidos por CoA hidrolasas o tioesterasas en la clase EC 3.1.2 (Trayectoria A de la Figuras 10 y 11). Tioésteres CoA ejemplares que hidrolizan benzoil-CoA y/o sustratos similares incluyen 4-hidroxibenzoil-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.23) y fenilglioxal-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.25). El gen *orf1* de *Azoarcus evansii* codifica una enzima con actividad de benzoil-CoA hidrolasa que participa en el metabolismo de benzoato (Ismailo, *Arch.Microbiol* 190:451-460 (2008)). Esta enzima, cuando es expresada heterólogamente en *E. coli*, demuestra actividad en un número de sustratos alternos. Enzimas adicionales de benzoil-CoA hidrolasa se identificaron en agrupamientos del gen de degradación de benzoato de *Magnetospirillum magnetotacticum*, *Jannaschia* sp. CCS1 y *Sagittula stellata* E-37 por similitud de secuencia (Ismailo, *Arch.Microbiol* 190:451-460 (2008)). La 4-hidroxibenzoil-CoA hidrolasa de *Pseudomonas* sp. CBS3 acepta benzoil-CoA y *p*-metilbenzoil-CoA como sustratos y ha sido expresada heterólogamente y caracterizada en *E. coli* (Song *et al., Bioorg.Chem.* 35:1-10 (2007)). Enzimas adicionales con actividad demostrada de benzoil-CoA hidrolasa incluyen la palmitoil-CoA hidrolasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Wang *et al., Chem.Biol.* 14:543-551 (2007)) y la acil-CoA hidrolasa de *E. coli* codificada por *entH* (Guo *et al., Biochemistry* 48:1712-1722 (2009)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
orf1	AAN39365.1	23664428	*Azoarcus evansii*
Magn03011230	ZP_00207794	46200680	*Magnetospirillum magnetotacticum*
Jann_0674	YP_508616	89053165	*Jannaschia* sp. CCS1
SSE37_24444	ZP_01745221	126729407	*Sagittula stellata*
EF569604.1:4745..5170	ABQ44580.1	146761194	*Pseudomonas* sp. CBS3
Rv0098	NP_214612.1	15607240	*Mycobacterium tuberculosis*
entH	AAC73698.1	1786813	*Escherichia coli*

Varias CoA hidrolasas con amplios rangos de sustratos son enzimas adecuadas para hidrolizar benzoil-CoA y/o *p*-metilbenzoil-CoA. Por ejemplo, la

enzima codificada por *acot12* de cerebro de *Rattus norvegicus* (Robinson *et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.* 71:959-965 (1976)) puede reaccionar con butiril-CoA, hexanoil-CoA y malonil-CoA. La tioesterasa de ácido dicarboxílico humana, codificada por *acot8,* presenta actividad en glutaril-CoA, adipil-CoA, suberil-CoA, sebacil-CoA, y dodecanodioil-CoA (Westin *et al., J.Biol.Chem.* 280:38125-38132 (2005)). El homólogo de *E. coli* más cercano a esta enzima, *tesB*, también puede hidrolizar un rango de CoA tiolésteres (Naggert *et al., J Biol Chem* 266:11044-11050 (1991)). Una enzima similar también ha sido caracterizada en el hígado de rata (Deana R., *Biochem Int* 26:767-773 (1992)).

Nombre del gen	GI#	Acceso a GenBank #	Organismo
acot12	18543355	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*
tesB	16128437	NP_414986	*Escherichia coli*
acot8	3191970	CAA15502	*Homo sapiens*
acot8	51036669	NP_570112	*Rattus norvegicus*
tesA	16128478	NP_415027	*Escherichia coli*
ybgC	16128711	NP_415264	*Escherichia coli*
paaI	16129357	NP_415914	*Escherichia coli*
ybdB	16128580	NP_415129	*Escherichia coli*

4.1.1a. Carboxi-liasa (6/7 E): Enzimas descarboxilasas en la clase EC 4.1.1 son usadas para convertir benzoato a benceno (Trayectoria E de la Figura 10) y *p*-toluato a tolueno (Trayectoria E de la Figura 11). Enzimas ejemplares que reaccionan con estos o sustratos similares incluyen benceno carboxilasa, vanillato descarboxilasa, cinamato descarboxilasa, aminobenzoato descarboxilasa y una variedad de hidroxibenzoato descarboxilasas. Enzimas descarboxilasas pueden ser oxidativas o no oxidativas, dependiendo de los cofactores utilizados (Lupa *et al., Genomics* 86:342-351 (2005a)). Una enzima predicha por tener actividad de benzoato carboxilasa se identificó en un BF de clon de cultivo enriquecido con bacteria de *Clostridia* (Abu *et al., Environ.Microbiol* (2010)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
abcA	ADJ94002.1	300245889	BF de clon de cultivo enriquecido con bacteria *Clostridia*
abcD	ADJ94001.1	300245887	BF de clon de cultivo enriquecido con bacteria *Clostridia*

Un número de descarboxilasas caracterizadas con actividad demostrada en aromáticos hidroxilados tales como 4-hidroxibenzoato, 2,3-dihidroxibenzoato, 3,4-dihidroxibenzoato, 2,6-dihidroxibenzoato y 4,5-dihidroxiftalato también pueden presentar actividad en sustratos alternos tales como *p*-toluato o benzoato. Enzimas ejemplares de hidroxibenzoato descarboxilasas incluyen la 4,5-dihidroxiftalato descarboxilasa de *Comamonas testosteroni* (Nakazawa *et al., Appl.Environ.Microbiol* 36:264-269 (1978)), la 2,3-dihidroxibenzoato descarboxilasa de *Aspergillus niger* (Kamath *et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.* 145:586-595 (1987)) y la 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato descarboxilasa de *E. coli* (Zhang *et al., J Bacteriol.* 182:6243-6246 (2000)). 4-hidroxibenzoato descarboxilasas ejemplares son codificadas por *shdBD* y *ubiD* de *Sedimentibacter hidroxibenzoicus* (anteriormente *Clostridium hidroxibenzoicum*) y *ubiD* de *Enterobacter cloacae P240* (Matsui *et al., Arch.Microbiol* 186:21-29 (2006a); He *et al., Eur.J Biochem.* 229:77-82 (1995)). La 4-hidroxibenzoato descarboxilasa de la anaerobia facultativa, *Enterobacter cloacae,* codificada por *ubiD,* ha sido probada para determinar la actividad en sustratos múltiples y se mostró por ser inducida por tanto ácido 4-hidroxibenzoico como ácido 4-aminobenzoico (Matsui *et al., Arch.Microbiol* 186:21-29 (2006b)). Los *bsdBCD* de *Bacillus subtilis* codifican una 4-hidroxibenzoato/vanillato descarboxilasa no oxidativa reversible (Lupa *et al., Can.J Microbiol* 54:75-81 (2008)). Esta enzima fue heterólogamente expresada en *E. coli.* Descarboxilasas similares han sido indicadas en varios otros organismos (Lupa *et al., Genomics* 86:342-351 (2005b)) y genes para algunos de estos están listados abajo.

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
phtD	Q59727.1	3914354	*Comamonas testosteroni*
dhbD	CAK48106.1	134075758	*Aspergillus niger*
ubiD	NP_418285.1	16131689	*Escherichia coli*
shdD	AAY67851.1	67462198	*Sedimentibacter hidroxibenzoicus*
shdB	AAY67850.1	67462197	*Sedimentibacter hidroxibenzoicus*
ubiD	AAD50377.1	5739200	*Sedimentibacter hidroxibenzoicus*
ubiD	BAE97712.1	110331749	*Enterobacter cloacae P240*
bsdB	CAB12157.1	2632649	*Bacillus subtilis*
bsdC	CAB12158.1	2632650	*Bacillus subtilis*
bsdD	CAB12159.1	2632651	*Bacillus subtilis*
STM292	NP_461842.1	16766227	*Salmonella typhimurium LT2*
STM2922	NP_461843.1	16766228	*Salmonella typhimurium LT2*
STM2923	NP_461844.1	16766229	*Salmonella typhimurium LT2*
kpdB	YP_002236894.1	206580833	*Klebsiella pneumoniae 342*
kpdC	YP_002236895.1	206576360	*Klebsiella pneumoniae 342*
kpdD	YP_002236896.1	206579343	*Klebsiella pneumoniae 342*
pad1	NP_311620.1	15832847	*Escherichia coli O157*
yclC	NP_311619.1	15832846	*Escherichia coli O157*
yclD	NP_311618.1	15832845	*Escherichia coli O157*

Una clase adicional de descarboxilasas ha sido caracterizada que cataliza la descarboxilación de cinamato (fenilacrilato) y derivados de cinamato sustituidos. Estas enzimas son comunes en una variedad de organismos y genes

específicos que codifican estas enzimas que se han clonado y expresado en *E. coli* incluyen *pad 1* de *Saccharomyces cerevisae* (Clausen *et al., Gene* 142:107-112 (1994)), *pdc* de *Lactobacillus plantarum* (Barthelmebs *et al.,* 67:1063-1069 (2001); Qi *et al., Metab Eng* 9:268-276 (2007); Rodriguez *et al., J.Agric.Food Chem.* 56:3068-3072 (2008)), *pofK* (*pad*) de *Klebsiella oxytoca* (Uchiyama *et al., Biosci.Biotechnol.Biochem.* 72:116-123 (2008); Hashidoko *et al., Biosci.Biotech.Biochem.* 58:217-218 (1994)), *Pedicoccus pentosaceus* (Barthelmebs *et al.,* 67:1063-1069 (2001)), y *padC* de *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* (Shingler *et al.,* 174:711-724 (1992)). Una descarboxilasa de ácido ferúlico de *Pseudomonas fluorescens* también ha sido purificada y caracterizada (Huang *et al., J.Bacteriol.* 176:5912-5918 (1994)). Enzimas en esta clase se han mostrado por ser estables y no requieren ya sea co-factores exógenos o internamente unidos, de este modo haciendo a estas enzimas adecuadas para biotransformaciones (Sariaslani, *Annu.Rev.Microbiol.* 61:51-69 (2007)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
pad1	AAB64980.1	1165293	*Saccharomyces cerevisae*
pdc	AAC45282.1	1762616	*Lactobacillus plantarum*
pad	BAF65031.1	149941608	*Klebsiella oxytoca*
padC	NP_391320.1	16080493	*Bacillus subtilis*
pad	YP_804027.1	116492292	*Pedicoccus pentosaceus*
pad	CAC18719.1	11691810	*Bacillus pumilus*

4.1.99.a Descarbonilasa: Una enzima de descarbonilasa es usada para convertir benzaldehído a benceno (Trayectoria C de la Figura 10) y *p*-metilbenzaldehído a tolueno (Trayectoria C de la Figura 11). Enzimas de descarbonilasa catalizan la etapa final de la biosíntesis de alcano en plantas, mamíferos, insectos y bacteria (Dennis *et al., Arch.Biochem.Biophys.* 287:268-275 (1991)). Descarbonilasas no oxidativas transforman aldehídos en alcanos con la liberación concurrente de CO. Enzimas ejemplares de descarbonilasa incluyen octadecanal descarbonilasa (EC 4.1.99.5), esterol desaturasa y aldehído descarbonilasa graso. El gen CER1 de *Arabidopsis thaliana* codifica una descarbonilasa de ácido graso involucrada en la formación de cera epicuticular (US 6,437,218). Las descarbonilasas de ácido graso adicionales se encuentran en *Medicago truncatula, Vitis vinifera y Oryza sativa* (Solicitud de Patente

Estadounidense 2009/0061493). Una descarbonilasa que contiene cobalto-porfirina se purificó y caracterizó en las algas *Botryococcus braunii;* sin embargo, ningún gen ha sido asociado con esta actividad a la fecha (Dennis *et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:5306-5310 (1992)). Una descarbonilasa que contiene cobre de *Pisum sativum* también se purificó y caracterizó, pero aún no está asociada con un gen (Schneider-Belhaddad *et al., Arch.Biochem.Biophys.* 377:341-349 (2000)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
CER1	NP_850932	145361948	*Arabidopsis thaliana*
MtrDRAFT_AC153128g2v2	ABN07985	124359969	*Medicago truncatula*
VITISV_029045	CAN60676	147781102	*Vitis vinifera*
OSJNBa0004N05.14	CAE03390.2	38345317	*Oryza sativa*

Alternativamente, una descarbonilasa oxidativa puede convertir un aldehído en un alcano. Las descarbonilasas oxidativas son enzimas del citocromo P450 que utilizan NADPH y O_2 como cofactores y liberan CO_2, agua y $NADP^+$. Esta actividad se demostró en los productos del gen *CYP4G2v1* y *CYP4G1* de *Musca domestica y Drosophila melanogaster* (Solicitud de Patente Estadounidense 2010/0136595). Enzimas adicionales con actividad oxidativa de descarbonilasa pueden ser identificadas por homología de secuencia en otros organismos tales como *Mamestra brassicae*, *Helicoverpa zea y Acyrthosiphon pisum.*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
CYP4G2v1	ABV48808.1	157382740	*Musca domestica*
CYP4G1	NP_525031.1	17933498	*Drosophila melanogaster*
CYP4G25	BAD81026.1	56710314	*Antheraea yamamai*
CYP4M6	AAM54722.1	21552585	*Helicoverpa zea*
LOC100164072	XP_001944205.1	193650239	*Acyrthosiphon pisum*

6.2.1.a Ácido-tiol ligasa (8A, 11B): La activación dependiente de ATP

de benzoato a benzoil-CoA o *p*-toluato a *p*-metilbenzoil-CoA (Trayectoria A de la Figuras 10 y 11) es catalizada por una CoA sintetasa o Ácido-tiol ligasa. CoA ligasas que forman AM*P* activan los ácidos aromáticos a sus derivados CoA correspondientes, mientras ligadas de CoA que forman AD*P* son en general reversible. Benzoil-CoA ligasas que forman AM*P* ejemplares de cepas CIB de *Thauera aromatica y Azoarcus* sp. han sido caracterizadas (Lopez Barragan *et al., J Bacteriol.* 186:5762-5774 (2004); Schuhle *et al., J.Bacteriol.* 185:4920-4929 (2003)). Alternativamente, CoA ligasas que forman AM*P* que reaccionan con sustratos estructuralmente similares pueden tener actividad en benzoato o *p*-toluato. La CoA-ligasa de ciclohexancarboxilato que forma AM*P* de *Rhodopseudomonas palustris*, codificada por *aliA*, está bien caracterizada, y la alteración del sitio activo ha sido mostrada para impactar la especificidad del sustrato de la enzima (Samanta *et al., Mol.Microbiol* 55:1151-1159 (2005)). Esta enzima también funciona como una ciclohex-1-eno-1-carboxilato CoA-ligasa durante la degradación del anillo de benceno aromático (Egland *et al., Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 94:6484-6489 (1997)). CoA ligasas ejemplares adicionales incluyen dos fenilacetato-CoA ligasas caracterizadas de *P. chrysogenum* (Lamas-Maceiras *et al., Biochem.J* 395:147-155 (2006); Wang *et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.* 360:453-458 (2007)); Wang *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360:453-458 (2007)), la fenilacetato-CoA ligasa de *Pseudomonas putida* (Martinez-Blanco *et al., J Biol.Chem.* 265:7084-7090 (1990)), y la 6-carboxihexanoate-CoA ligasa de *Bacillus subtilis* (Bower *et al., J Bacteriol.* 178:4122-4130 (1996)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
bclA	Q8GQN9.1	75526585	*Thauera aromatica*
bzdA	AAQ08820.1	45649073	*Azoarcus* sp. cepa CIB
aliA	AAC23919	2190573	*Rhodopseudomonas palustris*
phl	CAJ15517.1	77019264	*Penicillium chrysogenum*
phlB	ABS19624.1	152002983	*Penicillium chrysogenum*
paaF	AAC24333.2	22711873	*Pseudomonas putida*
bioW	NP_390902.2	50812281	*Bacillus subtilis*

Las CoA ligasas que forman ADP que catalizan estas transformaciones exactas no han sido caracterizadas a la fecha; sin embargo, varias enzimas con amplias especificidades de sustrato se han descrito en la literatura. La acetil-CoA sintetasa que forma ADP (ACD, EC 6.2.1.13) de *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por AF1211, se mostró por operar en una variedad de sustratos de cadena lineal y ramificada que incluyen isobutirato, isopentanoato, y fumarato (Musfeldt *et al., J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). Una segunda ACD reversible en *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por *AF1983*, también fue indicada por tener un amplio rango de sustrato con alta actividad en compuestos aromáticos fenilacetato e indolacetato (Musfeldt *et al., supra*). La enzima de *Haloarcula marismortui*, anotada como una succinil-CoA sintetasa, acepta propionato, butirato y ácidos de cadena ramificada (isovalerato e isobutirato) como sustratos, y se mostró por operar en las direcciones delantera y reversa (Brasen *et al., Arch.Microbiol* 182:277-287 (2004)). La ACD codificada por *PAE3250* de crenarchaeon hipertermofílico de *Pyrobaculum aerophilum* mostró el rango de sustrato más amplio de todas las ACD caracterizadas, que reaccionan con acetil-CoA, isobutiril-CoA (sustrato preferido) y fenilacetil-CoA (Brasen and Schonheit, *Arch.Microbiol* 182:277-287 (2004)). La ingeniería o evolución dirigida puede ser usada para modificar esta enzima para operar a la temperatura fisiológica el organismo hospedero. Las enzimas de *A. fulgidus*, *H. marismortui* y *P. aerophilum* todas han sido clonadas, funcionalmente expresadas, y caracterizada en *E. coli* (Brasen and Schonheit, *Arch.Microbiol* 182:277-287 (2004); Musfeldt and Schonheit, *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). Una enzima adicional es codificada por *sucCD* en *E. coli,* la cual naturalmente cataliza la formación de succinil-CoA de succinato con el consumo concomitante de una ATP, una reacción la cual es reversible *in vivo* (Buck *et al., Biochemistry* 24:6245-6252 (1985)). La acil CoA ligasa de *Pseudomonas putida* ha sido indicada funcionar en varios sustratos alifáticos que incluyen ácidos acético, propiónico, butírico, valérico, hexanoico, heptanoico y octanoico y en compuestos aromáticos tales como ácidos fenilacético y fenoxiacético (Fernandez-Valverde *et al., Appl.Environ.Microbiol.* 59:1149-1154 (1993)). Una enzima relacionada, malonil CoA sintetasa (6.3.4.9) de *Rhizobium leguminosarum* podría convertir varios diácidos, es decir, etil-, propil-, alil-, isopropil-, dimetil-, ciclopropil-, ciclopropilmetileno-, ciclobutil-, y bencil-malonato en sus monotioésteres correspondientes (Pohl *et al., J.Am.Chem.Soc.* 123:5822-5823 (2001)).

Gen	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
AF1211	NP_070039.1	11498810	*Archaeoglobus fulgidus*
AF1983	NP_070807.1	11499565	*Archaeoglobus fulgidus*
scs	YP_135572.1	55377722	*Haloarcula marismortui*
PAE3250	NP_560604.1	18313937	*Pyrobaculum aerophilum* str. IM2
sucC	NP_415256.1	16128703	*Escherichia coli*
sucD	AAC73823.1	1786949	*Escherichia coli*
paaF	AAC24333.2	22711873	*Pseudomonas putida*
matB	AAC83455.1	3982573	*Rhizobium leguminosarum*

EJEMPLO VIII

Trayectorias a 2,4-pentadienoato de piruvato, ornitina y alanina

Este ejemplo muestra trayectorias de piruvato, ornitina y alanina a 2,4-pentadienoato.

La Figura 12 muestra la conversión de piruvato a 2,4-pentadienoato. Esta conversión puede ser lograda en cuatro etapas enzimáticas. Piruvato y acetaldehído son primero condensados a 4-hidroxi-2-oxovalerato por 4-hidroxi-2-cetovalerato aldolasa (Etapa A de la Figura 12). El producto 4-hidroxi-2-oxovalerato es después deshidratado a 2-oxopentenoato (Etapa B de la Figura 12). La subsecuente reducción y deshidratación de 2-oxopentenoato proporciona 2,4-pentadienoato (Etapas C/D de la Figura 12).

La Figura 13 muestra trayectorias de alanina u ornitina a 2,4-pentadienoato. En la etapa A de la Figura 13, alanina y acetil-CoA se unen por AKP tiolasa para formar AKP. En una trayectoria, AKP es desaminada a acetilacrilato (Etapa B). El grupo 4-oxo de acetilacrilato es entonces reducido y deshidratado a 2,4-pentadienoato (Etapas C/D). En una trayectoria alterna, AKP es convertida a 2,4-dioxopentanoato por una aminotransferasa o deshidrogenasa (Etapa E). Reducción del grupo 2- o 4-oxo de 2,4-dioxopentanoato proporciona 2-hidroxi-4-oxopentanoato (Etapa H) o 4-hidroxi-2-oxovalerato (Etapa K), respectivamente. El 4-hidroxi-2-oxovalerato puede alternativamente ser formado por la reducción de AKP a 2-amino-4-hidroxipentanoato (Etapa J) seguido por transaminación o desaminación oxidativa (Etapa L). Una vez formado, el 4-hidroxi-

2-oxovalerato puede ser convertido a 2,4-pentadienoato en tres etapas enzimáticas como se muestra en la Figura 12 (Etapas B/C/D de la Figura 12). El intermediario 2-hidroxi-4-oxopentanoato puede sufrir deshidratación a acetilacrilato (Etapa F) seguido por reducción y deshidratación (Etapas C/D).

Un punto de entrada alterno en las trayectorias de AKP mostrado en la Figura 13 es ornitina. Una ornitina aminomutasa es primero requerida para convertir ornitina a 2,4-diaminopentanoato (Etapa M). El intermediario 2,4-diaminopentanoato es después convertido a AKP por transaminación o desaminación oxidativa (Etapa N).

Se entiende que cualquiera del estereoisómero D- o L- de alanina u ornitina puede servir como el precursor o intermediario a una trayectoria de 2,4-pentadienoato mostrada en la Figura 13. Los estereoisómeros D- y L- de alanina u ornitina son fácilmente interconvertidos por enzimas de alanina racemasa u ornitina racemasa.

Las enzimas para catalizar las transformaciones mostradas en la Figuras 5 y 6 son categorizadas por el número EC (Tabla 2) y descritas adicionalmente abajo.

Etiqueta	**Función**	**Etapa**
1.1.1.a	Oxidorreductasa (oxo a alcohol)	1C, 2C/H/K/J
1.4.1.a	Oxidorreductasa (aminación/desaminación)	2E/L/N
2.6.1.a	Aminotransferasa	2E/L/N
4.1.3.a	Liasa	1A
4.2.1.a	Hidro-liasa	1B/D, 2D/F
4.3.1.a	Amoníaco-liasa	2B
5.1.1.a	D/L Racemasa	2A/M
5.4.3.a	Aminomutasa	2M
Otro	AKP tiolasa	2A

1.1.1.a Oxidorreductasa (oxo a alcohol): un número de transformaciones en la Figuras 5 y 6 involucradas en la reducción de una cetona a un alcohol. En la Etapa C de la Figura 12, se reduce 2-oxopentenoato a 2-hiroxipentenoato. Una transformación similar es la reducción del ceto-ácido 2,4-dioxopentanoato a su correspondiente hidroxi-ácido, 2-hidroxi-4-oxopentanoato (Etapa H de la Figura 13). Las etapas C, J y K de la Figura 13 está implicadas en

la reducción del grupo 4-oxos de AKP, 2,4-dioxopentanoato y acetilacrilato a sus correspondientes alcoholes. Estas transformaciones son catalizadas por enzimas de oxidorreductasa en la clase 1.1.1. de EC.

Varias deshidrogenasas de alcohol ejemplares se convierten de una cetona a un grupo funcional alcohol. Dos de estas enzimas de *E. coli* son codificadas por malato deshidrogenasa (*mdh*) y lactato deshidrogenasa (*ldhA*). Además, el lactato deshidrogenasa de *Ralstonia eutropha* se ha mostrado por demostrar altas actividades en 2-cetoácidos de varias longitudes de cadena incluyendo lactato, 2-oxobutirato, 2-oxopentanoato y 2-oxoglutarato (Steinbuchel *et al., Eur.J.Biochem.* 130:329-334 (1983)). La conversión de alfa-cetoadipato en alfa-hidroxiadipato es catalizada por 2-cetoadipato reductasa, una enzima encontrada en placenta humana y de rata (Suda *et al., Arch.Biochem.Biophys.* 176:610-620 (1976); Suda *et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.* 77:586-591 (1977)). Una oxidorreductasa candidato adicional es la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa mitocondrial (*bdh*) del corazón humano el cual ha sido clonado y caracterizado (Marks *et al., J.Biol.Chem.* 267:15459-15463 (1992)). Las enzimas de alcohol deshidrogenasa de *C. beijerinckii* (Ismaiel *et al., J.Bacteriol.* 175:5097-5105 (1993)) y *T. brockii* (Lamed *et al., Biochem.J.* 195:183-190 (1981); Peretz *et al., Biochemistry.* 28:6549-6555 (1989)) se convierten de acetona a isopropanol. La metil etil cetona reductasa cataliza la reducción de MEK a 2-butanol. Las enzimas reductasa MEK ejemplares se pueden encontrar en *Rhodococcus ruber* (Kosjek *et al., Biotechnol Bioeng.* 86:55-62 (2004)) y *Pyrococcus furiosus* (van der *et al., Eur.J.Biochem.* 268:3062-3068 (2001)).

Gen	ID de GenBank	Número GI	Organismo
mdh	AAC76268.1	1789632	*Escherichia coli*
ldhA	NP_415898.1	16129341	*Escherichia coli*
ldh	YP_725182.1	113866693	*Ralstonia eutropha*
bdh	AAA58352.1	177198	*Homo sapiens*
adh	AAA23199.2	60592974	*Clostridium beijerinckii* NRRL B593
adh	P14941.1	113443	*Thermoanaerobacter brockii* HTD4
sadh	CAD36475	21615553	*Rhodococcus ruber*
adhA	AAC25556	3288810	*Pyrococcus furiosus*

1.4.1.a Oxidorreductasa (desaminación): Las enzimas en la clase 1.4.1 de EC cataliza la desaminación oxidativa de grupos amino con NAD+, NADP+ o FAD como aceptor. Esta enzima es requerida para catalizar la desaminación oxidativa de AKP a 2,4-dioxopentanoato (Figura 13, la etapa E), 2-amino-4-hidroxipentanoato a 4-hidroxi-2-oxovalerato (Figura 13, la etapa L) y 2,4-diaminopentanoato a AKP (Figura 13, la etapa N). La conversión de 2,4-diaminopentanoato a AKP (Etapa N de la Figura 13) es catalizada por 2,4-diaminopentanoato deshidrogenasa (EC 1.4.1.12). Las enzimas 2,4-diaminopentanoato deshidrogenasa se han caracterizado en organismos que sufren fermentación anaeróbica de ornitina, tal como el producto del gen *ord* de *Clostridium sticklandii* (Fonknechten, *J.Bacteriol.* In Press: (2009)). Los candidatos del gene 2,4-diaminopentanoato deshidrogenasa adicionales pueden ser inferidos en otros organismos por similitud de secuencia al producto del gen *ord*. Una enzima relacionada, 3,5-diaminohexanoato deshidrogenasa (EC 1.4.1.11), cataliza la desaminación oxidativa de 3,5-diaminohexanoato a 5-amino-3-oxohexanoato. El gen que codifican esta enzima, *kdd*, fue recientemente identificada en *Fusobacterium nucleatum* (Kreimeyer *et al., J Biol.Chem.* 282:7191-7197 (2007)). La enzima ha sido purificada y caracterizada en otros organismos que fermentan lisina pero los genes asociados con estas enzimas no han sido identificados hasta la fecha (Baker *et al., J Biol.Chem.* 247:7724-7734 (1972); Baker *et al., Biochemistry* 13:292-299 (1974)). Candidatos en *Myxococcus xanthus*, *Porphiromonas gingivalis W83* y otros organismos secuenciados pueden ser inferidos por homología de secuencia.

Gen	ID de GenBank	Número GI	Organismo
ord	CAQ42978.1	226885213	*Clostridium sticklandii*
Hore_21120	YP_002509852.1	220932944	*Halotromothrix orenii*
CD0442	YP_001086913.1	126698016	*Clostridium difficile*
kdd	AAL93966.1	19713113	*Fusobacterium nucleatum*
mxan_4391	ABF87267.1	108462082	*Myxococcus xanthus*
pg_1069	AAQ66183.1	34397119	*Porphiromonas gingivalis*

Los sustratos AKP y 2-amino-4-hidroxipentanoato (Etapas E y L de la Figura 13), son similares a alfa-aminoácidos y pueden servir como sustratos alternos para enzimas de aminoácido deshidrogenasa tal como glutamato

deshidrogenasa (EC 1.4.1.2), leucina deshidrogenasa (EC 1.4.1.9), y aspartato deshidrogenasa (EC 1.4.1.21). El glutamato deshidrogenasa cataliza el NAD(P)+ reversible dependiente de la conversión de glutamato a 2-oxoglutarato. Las enzimas ejemplares son codificadas por *gdhA* en *Escherichia coli* (McPherson *et al., Nucleic.Ácidos Res.* 11:5257-5266 (1983); Korber *et al., J.Mol.Biol.* 234:1270-1273 (1993)), *gdh* en *Thermotoga maritima* (Kort *et al., Extremophiles* 1:52-60 (1997); Lebbink *et al., J.Mol.Biol.* 280:287-296 (1998); Lebbink *et al., J.Mol.Biol.* 289:357-369 (1999)), y *gdhA1* en *Halobacterium salinarum* (Ingoldsby *et al., Gene.* 349:237-244 (2005)). Enzimas de glutamato deshidrogenasa adicionales se han caracterizado en *Bacillus subtilis* (Khan *et al., Biosci.Biotechnol Biochem.* 69:1861-1870 (2005)), *Nicotiana tabacum* (Purnell *et al., Planta* 222:167-180 (2005)), *Oryza sativa* (Abiko *et al., Plant Cell Physiol* 46:1724-1734 (2005)), *Haloferax mediterranei* (Diaz *et al., Extremophiles.* 10:105-115 (2006)) y *Halobactreium salinarum* (Hayden *et al., FEMS Microbiol Lett.* 211:37-41 (2002)). La enzima de *Nicotiana tabacum* está compuesta de subunidades alfa y beta codificadas por *gdh1* y *gdh2* (Purnell *et al., Planta* 222:167-180 (2005)). Una leucina deshidrogenasa ejemplar es codificada por *ldh* de *Bacillus cereus*. Esta enzima reacciona con un intervalo de sustratos que incluyen leucina, isoleucina, valina, y 2-aminobutanoato (Stoyan *et al., J.Biotechnol* 54:77-80 (1997); Ansorge *et al., Biotechnol Bioeng.* 68:557-562 (2000)). El aspartato deshidrogenasa de *Thermotoga maritime,* codificados por *nadX*, está involucrado en la biosíntesis de NAD (Yang *et al., J.Biol.Chem.* 278:8804-8808 (2003)).

Gen	ID de GenBank	Número GI	Organismo
gdhA	P00370	118547	Escherichia coli
gdh	P96110.4	6226595	*Thermotoga maritima*
gdhA1	NP_279651.1	15789827	*Halobacterium salinarum*
rocG	NP_391659.1	16080831	*Bacillus subtilis*
gdh1	AAR11534.1	38146335	*Nicotiana tabacum*
gdh2	AAR11535.1	38146337	*Nicotiana tabacum*
GDH	Q852M0	75243660	*Oryza sativa*
GDH	Q977U6	74499858	*Haloferax mediterranei*
GDH	P29051	118549	*Halobactreium salinarum*
GDH2	NP_010066.1	6319986	*Saccharomyces cerevisiae*

ldh	P0A393	61222614	*Bacillus cereus*
nadX	NP_229443.1	15644391	*Thermotoga maritima*

2.6.1.a Aminotransferasa: Varias transformaciones en la Figura 13 son catalizadas por enzimas aminotransferasa o transaminasa, que incluyen la conversión de AKP a 2,4-dioxopentanoato (Etapa E), 2-amino-4-hidroxipentanoato a 4-hidroxi-2-oxovalerato (Etapa L) y 2,4-diaminopentanoato a AKP (Etapa N). Varias aminotransferasas se convierten a aminoácidos y derivados de sus 2-oxoácidos correspondientes. Estas enzimas son particularmente bien adaptadas para catalizar las transformaciones descritas en las Etapas E y L de la Figura 13 (es decir, AKP aminotransferasa y 2-amino-4-hidroxipentanoato aminotransferasa). La selección de un aminoácido aminotransferasa apropiado para estas transformaciones puede depender de la estereoquímica del sustrato. Cuando el sustrato está en la configuración D, se puede utilizar un D-aminoácido aminotransferasa (EC 2.6.1.21), mientras que el L-estereoisómero es el sustrato preferido de un aminoácido aminotransferasa L tal como aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1). El aspartato aminotransferasa es naturalmente transferido a un grupo oxo de oxaloacetato a glutamato, formando alfa-cetoglutarato y aspartato. La actividad de aspartato aminotransferasa es catalizada por, por ejemplo, el productos del gen de *aspC* de *Escherichia coli* (Yagi *et al.,* 100:81-84 (1979); Yagi *et al.,* 113:83-89 (1985)), *AAT2* de *Saccharomyces cerevisiae* (Yagi *et al.,* 92:35-43 (1982)) y *ASP5* de *Arabidopsis thaliana* (Kwok *et al.,* 55:595-604 (2004); de la *et al.,* 46:414-425 (2006); Wilkie *et al., Protein Expr.Purif.* 12:381-389 (1998)). La enzima de *Rattus norvegicus* se ha mostrado por transaminar sustratos alternos tal como ácido 2-aminohexanedioico y ácido 2,4-diaminobutírico (Recasens *et al., Biochemistry* 19:4583-4589 (1980)). Las aminotransferasas que trabajan en otros sustratos L-aminoácido pueden también ser capaces para catalizar estas transformaciones. La valina aminotransferasa cataliza la conversión de valina y piruvato a 2-cetoisovalerato y alanina. El gen de *E. coli*, *avtA*, codifica una enzima similar (Whalen *et al., J.Bacteriol.* 150:739-746 (1982)), el cual cataliza la transaminación de α-cetobutirato para generar α-aminobutirato, a pesar que el donador amino en esta reacción no ha sido identificado (Whalen *et al., J.Bacteriol.* 158:571-574 (1984)). Otro candidato de enzima es alfa-aminoadipato aminotransferasa (EC 2.6.1.39), una enzima que participa en biosíntesis de lisina y degradación en algunos organismos. Esta

enzima se interconvierte a 2-aminoadipato y 2-oxoadipato, usando alfa-cetoglutarato como el aceptor amino. Los candidatos del gen son encontrados en *Homo sapiens* (Okuno *et al., Enzima Protein* 47:136-148 (1993)) y *Thermus thermophilus* (Miyazaki *et al., Microbiology* 150:2327-2334 (2004)). La enzima *Thermus thermophilus*, codificada por *lysN,* está activa con varios sustratos alternos que incluyen oxaloacetato, 2-oxoisocaproate, 2-oxoisovalerato, y 2-oxo-3-metilvalerato.

Gen	ID de GenBank	Número GI	Organismo
aspC	NP_415448.1	16128895	*Escherichia coli*
AAT2	P23542.3	1703040	*Saccharomyces cerevisiae*
ASP5	P46248.2	20532373	*Arabidopsis thaliana*
got2	P00507	112987	*Rattus norvegicus*
avtA	YP_026231.1	49176374	*Escherichia coli*
lysN	BAC76939.1	31096548	*Thermus thermophilus*
AadAT-II	Q8N5Z0.2	46395904	*Homo sapiens*

Si el sustrato está presente en el estereoisómero D, la transaminación puede ser catalizada por aminotransferasa D (EC 2.6.1.21), también conocido como D-aminoácido aminotransferasa y D-alanina aminotransferasa (DAAT). Esta clase de enzima se hace notar por su amplia especificidad de sustrato, lo cual es específico de las especies. La D-aminotransferasa de *Bacillus* especies YM-1, codificadas por *dat*, ha sido clonada, secuenciada (Tanizawa *et al., J Biol.Chem.* 264:2450-2454 (1989)) y la estructura cristalina ha sido resuelta (Peisach *et al., Biochemistry* 37:4958-4967 (1998)). Esta enzima también ha sido diseñada por ingeniería para alterar la especificidad del sustrato (Gutierrez *et al., Eur.J Biochem.* 267:7218-7223 (2000); Gutierrez *et al., Protein Eng* 11:53-58 (1998)). Los candidatos del gen adicionales son encontrados en *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 (Tailor *et al., Biochim.Biophys.Acta* 1350:38-40 (1997)), *Staphilococcus haemolyticus* (Pucci *et al., J Bacteriol.* 177:336-342 (1995)) y *Bacillus subtilis* (Martinez-Carrion *et al., J Biol.Chem.* 240:3538-3546 (1965)).

Gen	ID de GenBank	Número GI	Organismo
dat	P19938	118222	*Bacillus sp. YM-1*
dat	P54692	1706292	*Bacillus licheniformis* ATCC 10716
dat	P54694	1706294	*Staphilococcus haemolyticus*
dat	O07597.1	3121979	*Bacillus subtilis*

La conversión de 2,4-diaminopentanoato a AKP (Etapa N de la Figura 13) es catalizada por una enzima con actividad 2,4-diaminopentanoato aminotransferasa. A pesar que esta actividad no ha sido caracterizada en las enzimas hasta la fecha, varias enzimas catalizan una transformación similar, la conversión de 2,4-diaminobutanoato a aspartato-4-semialdehído. Los candidatos de la enzima ejemplares incluyen beta-alanina aminotransferasa (EC 2.6.1.18), diaminobutirato aminotransferasa (EC 2.6.1.46 y EC 2.6.1.76) y gama-aminobutirato (GABA) aminotransferasa (EC 2.6.1.19). Una enzima diaminobutirato aminotransferasa ejemplar es codificada por los productos del gen *dat* en *Acinetobacter baumanii* y *Haemophilus influenza* (Ikai *et al., J Bacteriol.* 179:5118-5125 (1997); Ikai *et al., Biol Pharm.Bull.* 21:170-173 (1998)). Además a su sustrato natural, 2,4-diaminobutirato, la DAT de *A. baumanii* transamina las aminas terminales de lisina, 4-aminobutirato y ornitina. Los candidatos del gen diaminobutirato aminotransferasa adicionales incluyen los productos del gen *ectB* de *Marinococcus halophilus* y *Halobacillus dabanensis (Zhao et al., Curr Microbiol 53:183-188 (2006); Louis et al., Microbiology 143 (Pt 4):1141-1149 (1997))* y el producto del gen *pvdH* de *Pseudomonas aeruginosa* (Vandenende *et al., J Bacteriol.* 186:5596-5602 (2004)). Las enzimas diaminobutirato aminotransferasa que utilizan alfa-cetoglutarato como un aceptor amino son incluidas en la clase 2.6.1.76 EC. Estas enzimas son encontradas en *Acinetobacter baumanii*,

La beta-alanina aminotransferasa de *Pseudomonas fluorescens* también acepta 2,4-diaminobutirato como un sustrato (Hayaishi *et al., J Biol Chem* 236:781-790 (1961)); sin embargo, esta actividad no ha sido asociada con un gen hasta la fecha. La gama-aminobutirato aminotransferasa naturalmente intercovierte semialdehído succínico y glutamato a 4-aminobutirato y alfa-cetoglutarato. Generalmente, aminotransferasas GABA reacciona con un amplio intervalo de sustratos alternos (Schulz *et al.,* 56:1-6 (1990); Liu *et al.,* 43:10896-10905 (2004)). Las dos Transaminasas GABA en *E. coli* son codificadas por *gabT*

(Bartsch *et al., J Bacteriol.* 172:7035-7042 (1990)) y *puuE* (Kurihara *et al., J.Biol.Chem.* 280:4602-4608 (2005)). El producto del gen *gabT* se ha mostrado por tener especificidad de sustrato amplia (Schulz *et al.,* 56:1-6 (1990); Liu *et al.,* 43:10896-10905 (2004)). Las aminotransferasas GABA en *Mus musculus* y *Sus scrofa* han sido mostradas por reaccionar con un intervalo de sustratos alternos (Cooper, *Methods Enzymol.* 113:80-82 (1985)).

Gen	ID de GenBank	Número GI	Organismo
dat	P56744.1	6685373	*Acinetobacter baumanii*
dat	P44951.1	1175339	*Haemophilus influenzae*
ectB	AAB57634.1	2098609	*Marinococcus halophilus*
ectB	AAZ57191.1	71979940	*Halobacillus dabanensis*
pvdH	AAG05801.1	9948457	*Pseudomonas aeruginosa*
gabT	NP_417148.1	16130576	*Escherichia coli*
puuE	NP_415818.1	16129263	*Escherichia coli*
Abat	NP_766549.2	37202121	*Mus musculus*
gabT	YP_257332.1	70733692	*Pseudomonas fluorescens*
Abat	NP_999428.1	47523600	*Sus scrofa*

4.1.3.a Liasa: La condensación de piruvato y acetaldehído a 4-hidroxi-2-oxovalerato (Etapa A de la Figura 12) es catalizada por 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa (EC 4.1.3.39). Esta enzima participa en trayectorias para la degradación de fenoles, cresoles y catecoles. La enzima *E. coli*, codificada por *mhpE*, es muy específica para acetaldehído como un aceptor pero acepta los sustratos alternos 2-cetobutirato o fenilpiruvato como donadores (Pollard *et al., Appl Environ Microbiol* 64:4093-4094 (1998)). Las enzimas similares son codificadas por los genes *cmtG* y *todH* de *Pseudomonas putida* (Lau *et al., Gene* 146:7-13 (1994); Eaton, *J Bacteriol.* 178:1351-1362 (1996)). En *Pseudomonas* CF600, esta enzima es parte de una aldolasa-deshidrogenasa heterodímera bifuncional codificada por *dmpFG (Manjasetty et al., Acta Crystallogr.D.Biol Crystallogr. 57:582-585 (2001))*. La funcionalidad de deshidrogenasa intercovierte acetaldehído y acetil-CoA, proporcionando la ventaja de reducir las concentraciones celulares de acetaldehído, tóxico para algunas células.

Gen	ID de GenBank	Número GI	Organismo
mhpE	AAC73455.1	1786548	*Escherichia coli*
cmtG	AAB62295.1	1263190	*Pseudomonas putida*
todH	AAA61944.1	485740	*Pseudomonas putida*
dmpG	CAA43227.1	45684	*Pseudomonas sp. CF600*
dmpF	CAA43226.1	45683	*Pseudomonas sp. CF600*

4.2.1.a Deshidratasa: Deshidratación de 4-hidroxi-2-oxovalerato a 2-oxopentenoato (Etapa B de la Figura 12) es catalizada por 4-hidroxi-2-oxovalerato hidratasa (EC 4.2.1.80). Una enzima similar es requerida para catalizar la deshidratación de 4-hidroxipent-2-enoato a 2,4-pentadienoato (Etapa D de la Figura 13). 4-Hidroxi-2-oxovalerato hidratasa participa en trayectorias de degradación aromáticas y es típicamente co-transcrita con un gen que codifica una enzima con actividad 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa. Productos ejemplares del gen son codificados por *mhpD* de *E. coli* (Ferrandez *et al., J Bacteriol.* 179:2573-2581 (1997); Pollard *et al., Eur J Biochem.* 251:98-106 (1998)), *todG* y *cmtF* de *Pseudomonas putida* (Lau *et al., Gene* 146:7-13 (1994); Eaton, *J Bacteriol.* 178:1351-1362 (1996)), *cnbE* de *Comamonas* sp. CNB-1 (Ma *et al., Appl Environ Microbiol* 73:4477-4483 (2007)) y *mhpD* de *Burkholderia xenovorans* (Wang *et al., FEBS J* 272:966-974 (2005)). Una enzima cercanamente relacionada, 2-oxohepta-4-eno-1,7-dioato hidratasa, participa en la degradación ácido 4-hidroxifenilacético, donde se convierte a 2-oxo-hept-4-eno-1,7-dioato (OHED) un 2-oxo-4-hidroxi-hepta-1,7-dioato usando magnesio como un cofactor (Burks *et al., J.Am.Chem.Soc.* 120: (1998)). Los candidatos de la enzima OHED hidratasa se han identificado y caracterizado en *E. coli C* (Roper *et al., Gene* 156:47-51 (1995); Izumi *et al., J Mol.Biol.* 370:899-911 (2007)) y *E. coli W* (Prieto *et al., J Bacteriol.* 178:111-120 (1996)). La comparación de secuencia recela homólogos en un amplio intervalo de bacterias, plantas y animales. Las enzimas con secuencias muy similares están contenidas en *Klebsiella pneumonia* (91% de identidad, valor e = 2e-138) y *Salmonella enterica* (91% de identidad, valor e = 4e-138), entre otros.

Gen	ID de GenBank	Número GI	*Organismo*
mhpD	AAC73453.2	87081722	*Escherichia coli*
cmtF	AAB62293.1	1263188	*Pseudomonas putida*

todG	AAA61942.1	485738	*Pseudomonas putida*
cnbE	YP_001967714.1	190572008	*Comamonas* sp. CNB-1
mhpD	Q13VU0	123358582	*Burkholderia xenovorans*
hpcG	CAA57202.1	556840	*Escherichia coli C*
hpaH	CAA86044.1	757830	*Escherichia coli W*
hpaH	ABR80130.1	150958100	*Klebsiella pneumoniae*
Sari_01896	ABX21779.1	160865156	*Salmonella enterica*

Candidatos de la enzima para catalizar la deshidratación de 2-hidroxipentenoato (Figura 12, la etapa D) o 2-hidroxi-4-oxopentanoato (Figura 13, la etapa F) incluye fumarasa (EC 4.2.1.2), citramalato hidratasa (EC 4.2.1.34) y dimetilmaleato hidratasa (EC 4.2.1.85). Las enzimas de fumarasa naturalmente catalizan la deshidratación reversible de malato a fumarato. A pesar que la capacidad de fumarasa para reaccionar con 2-hidroxipentenoato o 2-hidroxi-4-oxopentanoato como sustratos no ha sido descrita en la literatura, una riqueza de información estructural está disponible para esta enzima y otros investigadores han exitosamente diseñado por ingeniería la enzima para alterar la actividad, inhibición y localización (Weaver, 61:1395-1401 (2005)). *E. coli* tiene tres fumarasas: FumA, FumB, y FumC que son reguladas por condiciones de crecimiento. La FumB es sensible al oxígeno y solamente es activo bajo condiciones anaeróbicas. La FumA está activa bajo condiciones microanaeróbicas, y FumC es la enzima solamente activa en crecimiento aeróbico (Tseng *et al.,* 183:461-467 (2001); Woods *et al.,* 954:14-26 (1988); Guest *et al., J Gen Microbiol* 131:2971-2984 (1985)). Candidatos adicionales de la enzima son encontrados en *Campilobacter jejuni* (Smith *et al., Int.J Biochem.Cell Biol* 31:961-975 (1999)), *Thermus thermophilus* (Mizobata *et al., Arch.Biochem.Biophys.* 355:49-55 (1998)) *y Rattus norvegicus* (Kobayashi *et al.,* 89:1923-1931 (1981)). Enzimas similares con alta homología de secuencia incluyen *fum1* de *Arabidopsis thaliana* y *fumC* de *Corynebacterium glutamicum.* La fumarasa *mmcBC* de *Pelotomaculum thermopropionicum* es otra clase de fumarasa con dos subunidades (Shimoyama *et al.,* 270:207-213 (2007)). Citramalato hidroliasa naturalmente deshidrata 2-metilmalato a mesaconato. Esta enzima ha sido estudiada en *Methanocaldococcus jannaschii* en el contexto de la trayectoria a piruvato a 2-oxobutanoato, donde se ha demostrado que tiene una amplia

especificidad de sustrato (Drevland *et al., J Bacteriol.* 189:4391-4400 (2007)). Esta actividad de la enzima también se ha detectado en *Clostridium tetanomorphum*, *Morganella morganii, Citrobacter amalonaticus* donde se cree que participa en la degradación de glutamato (Kato *et al., Arch.Microbiol* 168:457-463 (1997)). La secuencia de proteína de *M. jannaschii* no lleva homología significante a los genes en estos organismos. La dimetilmaleato hidratasa es una enzima dependiente de Fe^{2+} y sensible al oxígeno reversible en la familia aconitasa que hidrata a dimetilmaeato para formar (2R,3S)-2,3-dimetilmalato. Esta enzima es codificada por *dmdAB* en *Eubacterium barkeri* (Alhapel *et al., supra*; Kollmann-Koch *et al., Hoppe Seilers.Z.Physiol Chem.* 365:847-857 (1984)).

Gen	ID de GenBank	Número GI	Organismo
fumA	NP_416129.1	16129570	*Escherichia coli*
fumB	NP_418546.1	16131948	*Escherichia coli*
fumC	NP_416128.1	16129569	*Escherichia coli*
fumC	O69294	9789756	*Campilobacter jejuni*
fumC	P84127	75427690	*Thermus thermophilus*
fumH	P14408	120605	*Rattus norvegicus*
fum1	P93033	39931311	*Arabidopsis thaliana*
fumC	Q8NRN8	39931596	*Corynebacterium glutamicum*
mmcB	YP_001211906	147677691	*Pelotomaculum thermopropionicum*
mmcC	YP_001211907	147677692	*Pelotomaculum thermopropionicum*
leuD	Q58673.1	3122345	*Methanocaldococcus jannaschii*
dmdA	ABC88408	86278276	*Eubacterium barkeri*
dmdB	ABC88409.1	86278277	*Eubacterium barkeri*

4.3.1.a Amoníaco-liasa: Una enzima de amoníaco liasa es requerida para catalizar la desaminación de 2-amino-4-oxopentanoato (AKP) a acetilacrilato en la Etapa B de la Figura 13. Una enzima que cataliza esta transformación exacta no ha sido identificada. Sin embargo la AKP es estructuralmente similar a aspartato, el sustrato nativo de aspartasa (EC 4.3.1.1.). La aspartasa es una

enzima común en microorganismos, y ha sido caracterizada ampliamente (Viola, 74:295-341 (2000)). La enzima *E. coli* se ha mostrado para reaccionar con una variedad de sustratos alternos que incluyen aspartatofenilmetiléster, aspargina, bencil-aspartato y malato (Ma *et al.,* 672:60-65 (1992)). Además, la evolución directa ha sido empleada en esta enzima para alterar la especificidad del sustrato (Asano *et al.,* 22:95-101 (2005)). La estructura cristalina de la aspartasa *E. coli*, codificada por *aspA*, ha sido resuelta (Shi *et al.,* 36:9136-9144 (1997)). Las enzimas con funcionalidad de aspartasa también se han caracterizado en *Haemophilus influenzae* (Sjostrom *et al., Biochim.Biophys.Acta* 1324:182-190 (1997)), *Pseudomonas fluorescens* (Takagi *et al., J.Biochem.* 96:545-552 (1984)), *Bacillus subtilis* (Sjostrom *et al.,* 1324:182-190 (1997)) y *Serratia marcescens* (Takagi *et al.,* 161:1-6 (1985)).

Gen	ID de GenBank	Número GI	Organismo
aspA	NP_418562	90111690	*Escherichia coli K12 subsp. MG1655*
aspA	P44324.1	1168534	*Haemophilus influenzae*
aspA	P07346.1	114273	*Pseudomonas fluorescens*
ansB	P26899.1	251757243	*Bacillus subtilis*
aspA	P33109.1	416661	*Serratia marcescens*

Otro candidato de la enzima para catalizar la desaminación de AKP es 3-metilaspartasa (EC 4.3.1.2). Esta enzima, también conocida como beta-metilaspartasa y 3-metilaspartato amoníaco-liasa, naturalmente cataliza la desaminación de treo-3-metilaspartato a mesaconato. La 3-metilaspartasa de *Clostridium tetanomorphum* ha sido clonada, funcionalmente expresada en *E. coli,* y cristalizada (Asuncion *et al.,* 57:731-733 (2001); Asuncion *et al., J Biol Chem.* 277:8306-8311 (2002); Botting *et al.,* 27:2953-2955 (1988); Goda *et al.,* 31:10747-10756 (1992)). En *Citrobacter amalonaticus*, esta enzima es codificada por *BAA28709* (Kato y Asano, *Arch.Microbiol* 168:457-463 (1997)). La 3-metilaspartasa también ha sido cristalizada de *YG1002 E. coli* (Asano *et al., FEMS Microbiol Lett.* 118:255-258 (1994)) a pesar que la secuencia de proteína no aparece en bases de datos públicas tal como GenBank. La homología de secuencia se puede usar para identificar genes candidatos adicionales, que incluyen *CTC_02563* in *C. tetani* y *ECs0761* en *Escherichia coli O157:H7*.

Gen	ID de GenBank	Número GI	*Organismo*
mal	AAB24070.1	259429	*Clostridium tetanomorphum*
BAA28709	BAA28709.1	3184397	*Citrobacter amalonaticus*
CTC_02563	NP_783085.1	28212141	*Clostridium tetani*
ECs0761	BAB34184.1	13360220	*Escherichia coli O157:H7*

5.1.1.a Racemasa: Las enzimas de racemasa en la clase 5.1.1 EC isomeriza aminoácidos D y L. Esta enzima puede ser requerida para incrementar la biodisponibilidad de D-alanina y/o D-ornitina y de este modo mejora la conversión de alanina a AKP (Etapa A de la Figura 13) u ornitina a 2,4-diaminopentanoato (Etapa M de la Figura 13). Las enzimas con actividad alanina racemasa (EC 5.1.1.1) y ornitina racemasa (EC 5.1.1.12) se han caracterizado. La alanina racemasa intercovierte los estereoisómeros L y D de alanina. Escherichia coli tiene dos enzimas de alanina aminomutasa, que codifica *alr* y *dadX* (Lilley *et al., Gene* 129:9-16 (1993); Wild *et al., Mol Gen Genet.* 198:315-322 (1985)). El gen *vanT* de *Enterococcus gallinarum* también exhibe actividad alanina racemasa cuando se expresa *E. coli* (Arias *et al., Microbiology* 146 (Pt 7):1727-1734 (2000)). Candidatos de la enzima alanina racemasa adicionales se han caracterizado en *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium tuberculosis* (Pierce *et al., FEMS Microbiol Lett.* 283:69-74 (2008); Strych *et al., FEMS Microbiol Lett.* 196:93-98 (2001)). La interconversión de D-ornitina y L-ornitina es catalizada por ornitina racemasa. La enzima codificada por el producto del gen *orr* de *C. sticklandii* es purificado y caracterizado (Fonknechten, *J.Bacteriol.* In Press: (2009)). Candidatos del gen ornitina racemasa adicionales pueden ser identificados por similitud de secuencia en organismos tal como *Clostridium difficile* y *Fusobacterium periodonticum.*

Gen	ID de GenBank	Número GI	Organismo
alr	NP_418477.1	16131879	*Escherichia coli*
dadX	AAC74274.1	1787439	*Escherichia coli*
vanT	Q9X3P3.1	20140922	*Enterococcus gallinarum*
yncD	NP_389646.1	16078827	*Bacillus subtilis*
alr	NP_338056.1	15843019	*Mycobacterium tuberculosis CDC1551*
alr	NP_217940.1	15610559	*Mycobacterium*

Gen	ID de GenBank	Número GI	Organismo
			tuberculosis H37Rv
orr	CAQ42981.1	226885219	*Clostridium sticklandii*
CdifA_020200002638	ZP_05349631.1	255305459	*Clostridium difficile*
FUSPEROL_00295	ZP_06025693.1	262066081	*Fusobacterium periodonticum*

5.4.3.a Aminomutasa: La ornitina aminomutasa (EC 5.4.3.5) cataliza la conversión de ornitina a 2,4-diaminopentanoato (Etapa M de la Figura 13). Una enzima dependiente de B12 con esta actividad, codificada por *oraSE de Clostridium sticklandii*, ha sido clonada, secuenciada y expresada en *E. coli* (Chen *et al., J.Biol.Chem.* 276:44744-44750 (2001)). Esta enzima preferencialmente reacciona con el estereoisómero D de ornitina (Fonknechten, *J.Bacteriol.* In Press: (2009)). Las enzimas de ornitina aminomutasa no han sido caracterizadas en otros organismos hasta la fecha. Enzima similares en organismos tal como *Alkaliphilus oremlandii* y *Clostridium difficile* pueden ser identificadas por similitud de secuencia. Lisina aminomutasa cataliza dos transformaciones similares: la interconversión de lisina con 2,5-diaminohexanoato (EC 5.4.3.4), y 3,6-diaminohexanoato con 3,5-diaminohexanoato (EC 5.4.3.3). Esta enzima participa en la fermentación de lisina a acetato y butirato y ha sido caracterizada en *Clostridium sticklandii* (Berkovitch *et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:15870-15875 (2004)) y *Porphiromonas gingivalis* (Tang *et al., Biochemistry* 41:8767-8776 (2002)).

Gen	ID de GenBank	Número GI	Organismo
oraE	AAK72502.1	17223685	*Clostridium sticklandii*
oraS	AAK72501.1	17223684	*Clostridium sticklandii*
oraE (Clos_1695)	YP_001513231.1	158320724	*Alkaliphilus oremlandii*
oraS (Clos_1696)	YP_001513232.1	158320725	*Alkaliphilus oremlandii*
oraE	ZP_05349629.1	255305457	*Clostridium difficile*
oraS	ZP_05349628.1	255305456	*Clostridium difficile*
kamD	AAC79717.1	3928904	*Clostridium sticklandii*
kamE	AAC79718.1	3928905	*Clostridium sticklandii*
kamD	NP_905288.1	34540809	*Porphiromonas*

			gingivalis W83
kamE	NP_905289.1	34540810	*Porphiromonas gingivalis W83*

Otro: El 2-Amino-4-oxopentanoato (AKP) es formado de alanina y acetil-CoA por AKP tiolasa (Etapa A en la Figura 13). La AKP tiolasa (AKPT, sin número EC) es una enzima dependiente de piridoxal fosfato que participa en degradación de ornitina en *Clostridium sticklandii* (Jeng *et al., Biochemistry* 13:2898-2903 (1974); Kenklies *et al., Microbiology* 145 (Pt 4):819-826 (1999)). Un agrupamiento de gen que codifican las subunidades alfa y beta de AKPT (*or-2 (ortA)* y *or-3 (ortB)*) fue recientemente descrito y las propiedades químicas de la enzima son caracterizadas (Fonknechten, *J.Bacteriol.* In Press: (2009)). La enzima es capaz de operar en ambas direcciones y reacciona con el isómero D de alanina. El diseño por ingeniería o la evolución directa de la enzima puede permitir a la enzima funcionar con L-alanina como un sustrato que proporciona versatilidad de trayectoria adicional con respecto al sustrato primario. Alternativamente, la co-expresión de una enzima alanina racemasa puede mejorar la disponibilidad de sustrato. Las enzimas con alta homología de secuencia son encontrados en *Clostridium difficile*, *Alkaliphilus metalliredigenes QYF*, *Thermoanaerobacter sp. X514, y Thermoanaerobacter tengcongenesis MB4* (Fonknechten, *J.Bacteriol.* In Press: (2009)).

Gen	ID de GenBank	Número GI	Organismo
ortA	CAQ42979.1	226885215	*Clostridium sticklandii*
ortB	CAQ42980.1 GI:	226885217	*Clostridium sticklandii*
ortA	YP_001086914.1	126698017	*Clostridium difficile 630*
ortB	YP_001086915.1	126698018	*Clostridium difficile 630*
Amet_2368	YP_001320181.1	150390132	*Alkaliphilus metalliredigenes QYF*
Amet_2369	YP_001320182.1	150390133	*Alkaliphilus metalliredigenes QYF*
Teth514_1478	YP_001663101.1	167040116	*Thermoanaerobacter sp. X514*
Teth514_1479)	YP_001663102.1	167040117	*Thermoanaerobacter sp. X514*

TTE1235	NP_622858.1	20807687	*Thermoanaerobacter tengcongenesis MB4*
thrC	NP_622859.1	20807688	*Thermoanaerobacter tengcongenesis MB4*

EJEMPLO IX

Enzimas de Hidrogenasa y Deshidrogenasa CO Ejemplares para Extraer Equivalentes de reducción de Syngas y Enzimas de Ciclo TCA Reductivo Ejemplares

Enzimas del ciclo TCA reductivo útiles en los organismos microbianos que no se originan naturalmente de la presente invención incluye uno o más de ATP-citrato liasa y tres enzimas que fijan CO_2: isocitrato deshidrogenasa, alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, piruvato:ferredoxina oxidorreductasa. La presencia de ATP-citrato liasa o citrato liasa y alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa indica la presencia de in ciclo TCA reductivo activo en un organismo. Las enzimas para cada etapa del ciclo TCA reductivo se muestran abajo.

ATP-citrato liasa (ACL, EC 2.3.3.8), también llamada ATP citrato sintasa, cataliza el desdoblamiento dependiente de ATP de citrato a oxaloacetato y acetil-CoA. ACL es una enzima del ciclo RTCA que ha sido estudiada en bacterias de azufre verdes *Chlorobium limicola* y *Chlorobium tepidum*. La enzima alfa(4)beta(4) heteromérica de *Chlorobium limicola* fue clonada y caracterizada en *E. coli* (Kanao *et al., Eur. J. Biochem.* 269:3409-3416 (2002). La enzima *C. limicola*, codificada por *aclAB*, es irreversible y la actividad de la enzima es regulada por la proporción de ADP/ATP. Un ACL recombinante de *Chlorobium tepidum* también es expresada en *E. coli* y la holoenzima es reconstituida *in vitro*, en un estudio que explica el papel de las subunidades alfa y beta en el mecanismo catalítico (Kim y Tabita, *J. Bacteriol.* 188:6544-6552 (2006). Las enzimas ACL también se han identificado en *Balnearium lithotrophicum*, *Sulfurihidrogenibium subterraneum* y otros miembros de las bacterias philum *Aquificae* (Hugler *et al., Environ. Microbiol.* 9:81-92 (2007)). Esta actividad ha sido reportada también en algunos hongos. Organismos ejemplares incluyen *Sordaria macrospora (Nowrousian et al., Curr. Genet. 37:189-93 (2000), Aspergillus nidulans, Yarrowia lipolytica (Hynes y Murray, Eukaryotic Cell, July: 1039-1048, (2010) y Aspergillus niger (Meijer et al. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36:1275-1280 (2009)*. Otros candidatos pueden ser encontrados en base a la homología de secuencia.

Información relacionada a estas enzimas es tabulada a continuación:

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
aclA	BAB21376.1	12407237	*Chlorobium limicola*
aclB	BAB21375.1	12407235	*Chlorobium limicola*
aclA	AAM72321.1	21647054	*Chlorobium tepidum*
aclB	AAM72322.1	21647055	*Chlorobium tepidum*
aclA	ABI50076.1	114054981	*Balnearium lithotrophicum*
aclB	*ABI*50075.1	114054980	*Balnearium lithotrophicum*
aclA	*ABI50085.1*	*114055*040	*Sulfurihidrogenibium subterraneum*
aclB	ABI50084.1	114055039	*Sulfurihidrogenibium subterraneum*
aclA	AAX76834.1	62199504	*Sulfurimonas denitrificans*
aclB	AAX76835.1	62199506	*Sulfurimonas denitrificans*
acl1	XP_504787.1	50554757	*Yarrowia lipolytica*
acl2	XP_503231.1	50551515	*Yarrowia lipolytica*
SPBC1703.07	NP_596202.1	19112994	*Schizosaccharomyces pombe*
SPAC22A12.16	NP_593246.1	19114158	*Schizosaccharomyces pombe*
acl1	CAB76165.1	7160185	*Sordaria macrospora*
acl2	CAB76164.1	7160184	*Sordaria macrospora*
aclA	CBF86850.1	259487849	*Aspergillus nidulans*
aclB	CBF86848	259487848	*Aspergillus nidulans*

En algunos organismos la conversión de citrato a oxaloacetato y acetil-CoA proviene a través de un intermediario citril-CoA y es catalizada por dos enzimas separadas, citril-CoA sintetasa (EC 6.2.1.18) y citril-CoA liasa (EC 4.1.3.34) (Aoshima, M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:249-255 (2007). La Citril-CoA sintetasa cataliza la activación de citrato a citril-CoA. La enzima *Hidrogenobacter thermophilus* está compuesta de subunidades grandes y pequeñas codificadas por *ccsA* y *ccsB*, respectivamente (Aoshima *et al., Mol. Micrbiol.* 52:751-761 (2004)). La citril-CoA sintetasa de *Aquifex aeolicus* está

compuesta de subunidades alfa y beta codificadas por *sucC1* y *sucD1* (Hugler *et al., Environ. Microbiol.* 9:81-92 (2007)). Citril-CoA liasa divide citril-CoA en oxaloacetato y acetil-CoA. Esta enzima es un homotrímero codificado por *ccl* en *Hidrogenobacter thermophilus* (Aoshima *et al., Mol. Microbiol.* 52:763-770 (2004)) y *aq_150* en *Aquifex aeolicus* (Hugler *et al., supra* (2007)). Los genes para este mecanismo de convertir citrato a oxaloacetato y citril-CoA también ha sido reportado recientemente en *Chlorobium tepidum* (Eisen *et al.,* PNAS 99(14): 9509-14 (2002).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
ccsA	BAD17844.1	46849514	*Hidrogenobacter thermophilus*
ccsB	BAD17846.1	46849517	*Hidrogenobacter thermophilus*
sucC1	AAC07285	2983723	*Aquifex aeolicus*
sucD1	AAC07686	2984152	*Aquifex aeolicus*
ccl	BAD17841.1	46849510	*Hidrogenobacter thermophilus*
aq_150	AAC06486	2982866	*Aquifex aeolicus*
CT0380	NP_661284	21673219	*Chlorobium tepidum*
CT0269	NP_661173.1	21673108	*Chlorobium tepidum*
CT1834	AAM73055.1	21647851	*Chlorobium tepidum*

El oxaloacetato es convertido en malato por malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37), una enzima la cual funciona en las direcciones tanto delantera y reversa. *S. cerevisiae* tiene tres copias de malato deshidrogenasa, *MDH1* (McAlister-Henn y Thompson, *J. Bacteriol.* 169:5157-5166 (1987), *MDH2* (Minard y McAlister-Henn, *Mol. Cell. Biol.* 11:370-380 (1991); Gibson y McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 278:25628-25636 (2003)), y *MDH3* (Steffan y McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 267:24708-24715 (1992)), la cual localiza al mitocondrión, citosol, y peroxisoma, respectivamente. *E. coli* se conoce por tener una malato deshidrogenasa activa codificada por *mdh*.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
MDH1	NP_012838	6322765	*Saccharomyces cerevisiae*
MDH2	NP_014515	116006499	*Saccharomyces cerevisiae*
MDH3	NP_010205	6320125	*Saccharomyces cerevisiae*
Mdh	NP_417703.1	16131126	*Escherichia coli*

Fumarato hidratasa (EC 4.2.1.2) cataliza la hidratación reversible de fumarato a malato. Las tres fumarasas de *E. coli,* codificadas por *fumA*, *fumB* y *fumC*, son reguladas bajo diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno. FumB es sensible al oxígeno y está activa bajo condiciones anaeróbicas. FumA está activa bajo condiciones microanaeróbicas, y FumC está activa bajo condiciones de crecimiento aeróbico (Tseng *et al., J. Bacteriol.* 183:461-467 (2001);Woods *et al., Biochim. Biophys. Acta* 954:14-26 (1988); Guest *et al., J. Gen. Microbiol.* 131:2971-2984 (1985)). *S. cerevisiae* contiene una copia de un gen que codifica fumarasa, *FUM1*,cuyo producto se localiza tanto en el crisol como en mitocondrión (Sass *et al., J. Biol. Chem.* 278:45109-45116 (2003)). Las enzimas de fumarasa adicionales son encontradas en *Campilobacter jejuni* (Smith *et al., Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31:961-975 (1999)), *Thermus thermophilus* (Mizobata *et al., Arch. Biochem. Biophys.* 355:49-55 (1998)) *y Rattus norvegicus* (Kobayashi *et al., J. Biochem.* 89:1923-1931 (1981)). Enzima similares con alta homología de secuencia incluyen *fum1* de *Arabidopsis thaliana* y *fumC* de *Corynebacterium glutamicum.* La fumarasa *MmcBC* de *Pelotomaculum thermopropionicum* es otra clase de fumarasa con dos subunidades (Shimoyama *et al., FEMS Microbiol. Lett.* 270:207-213 (2007)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
fumA	NP_416129.1	16129570	*Escherichia coli*
fumB	NP_418546.1	16131948	*Escherichia coli*
fumC	NP_416128.1	16129569	*Escherichia coli*
FUM1	NP_015061	6324993	*Saccharomyces cerevisiae*
fumC	Q8NRN8.1	39931596	*Corynebacterium glutamicum*
fumC	O69294.1	9789756	*Campilobacter jejuni*
fumC	P84127	75427690	*Thermus thermophilus*
fumH	P14408.1	120605	*Rattus norvegicus*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
MmcB	YP_001211906	147677691	*Pelotomaculum thermopropionicum*
MmcC	YP_001211907	147677692	*Pelotomaculum thermopropionicum*

La fumarato reductasa cataliza la reducción de fumarato a succinato. La fumarato reductasa de *E. coli*, se compone de cuatro subunidades codificadas por *frdABCD*, está unida a la membrana y es activa bajo condiciones anaeróbicas. El donador de electrón para esta reacción es menaquinona y los dos protones producidos en esta reacción no contribuyen al gradiente de protón (Iverson *et al., Science* 284:1961-1966 (1999)). El genoma de la levadura codifica dos isozimas de fumarato reductasa solubles codificadas por FRDS1 (Enomoto *et al., DNA Res.* 3:263-267 (1996)) y FRDS2 (Muratsubaki *et al., Arch. Biochem. Biophys.* 352:175-181 (1998)), las cuales localizan al crisol y promitocondrión, respectivamente, y son usadas durante el crecimiento anaeróbico en glucosa (Arikawa *et al., FEMS Microbiol. Lett.* 165:111-116 (1998)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
FRDS1	P32614	418423	*Saccharomyces cerevisiae*
FRDS2	NP_012585	6322511	*Saccharomyces cerevisiae*
frdA	NP_418578.1	16131979	*Escherichia coli*
frdB	NP_418577.1	16131978	*Escherichia coli*
frdC	NP_418576.1	16131977	*Escherichia coli*
frdD	NP_418475.1	16131877	*Escherichia coli*

La acilación dependiente de ATP de succinato a succinil-CoA es catalizada por succinil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.5). El producto de los genes *LSC1* y *LSC2* de *S. cerevisiae* y los genes *sucC* y *sucD* de *E. coli* naturalmente forman un complejo succinil-CoA sintetasa que cataliza la formación de succinil-CoA de succinato con el consumo concomitante de una ATP, una reacción la cual es reversible *in vivo* (Buck *et al., Biochemistry* 24:6245-6252 (1985)). Estas proteínas son identificadas a continuación:

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
LSC1	NP_014785	6324716	*Saccharomyces cerevisiae*
LSC2	NP_011760	6321683	*Saccharomyces cerevisiae*
sucC	NP_415256.1	16128703	*Escherichia coli*
sucD	AAC73823.1	1786949	*Escherichia coli*

La alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa (EC 1.2.7.3), también conocida como 2-oxoglutarato sintasa o 2-oxoglutarato:ferredoxin oxidorreductasa (OFOR), forma alfa-cetoglutarato de CO2 y succinil-CoA con consumo concurrente de dos equivalentes ferredoxina reducidos. Las OFOR y piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) son miembros de una familia diversa de 2-oxoácido:ferredoxina (flavodoxina) oxidorreductasas las cuales utilizan tiamina pirofosfato, CoA y agrupaciones de hierro-azufre como cofactores y ferredoxina, flavodoxina y FAD como portadores de electrón *(Adams et al., Archaea. Adv. Protein Chem. 48:101-180 (1996))*. Las enzimas en esta clase son reversibles y funcionan la dirección de carboxilación en organismos que fija carbono por el ciclo RTCA tal como especies *Hidrogenobacter thermophilus*, *Desulfobacter hidrogenophilus* y *Chlorobium* (Shiba et al. 1985; Evans *et al.,* Proc. Natl. Acad. Scl. U.S.A. 55:92934 (1966); Buchanan, 1971). La enzima de dos subunidades de *H. thermophilus*, codificadas por *korAB*, ha sido clonada y expresada en *E. coli* (Yun *et al.,* Biochem. Biophys. Res. Commun. 282:589-594 (2001)). Una OFOR de cinco unidades del mismo organismo con la especificidad del sustrato estricta para succinil-CoA, codificada por *forDABGE*, fue recientemente identificada y expresada en *E. coli* (Yun et al. 2002). Los cinéticos para fijar CO2 de ambas enzimas OFOR *H. thermophilus* se han caracterizado (Yamamoto *et al.,* Extremophiles 14:79-85 (2010)). Una OFOR que fija CO2 de *Chlorobium thiosulfatophilum* ha sido purificada y caracterizada pero los genes que codifican esta enzima no han sido identificadas hasta la fecha. Candidatos de la enzima en especies de *Chlorobium* pueden ser inferidos por similitud de secuencia a los genes de *H. thermophilus* Por ejemplo, el genoma *Chlorobium limicola* codifica dos proteínas similares. Bacterias Acetogénicas tal como *Moorella thermoacetica* son previstas para codificar dos enzimas OFOR. La enzima codificada por *Moth_0034* es prevista para funcionar en la dirección que asimila CO2. Los genes asociados con esta enzima, *Moth_0034* no ha sido experimentalmente validada hasta la fecha pero pueden ser inferidos por similitud de secuencia a enzimas OFOR conocidas.

Las enzimas OFOR que funcionan en la dirección de descarboxilación bajo condiciones físicas pueden también catalizar la reacción reversa. La OFOR del Archaeon *Sulfolobus* sp. termoacidofílica cepa 7, codificada por ST2300, ha sido ampliamente estudiada (Zhang et al. 1996. A plasmid-based expression system has been developed for efficiently expressing this protein in *E. coli* (Fukuda *et al.*, Eur. J. Biochem. 268:5639-5646 (2001)) y son determinados residuos involucrados en la especificidad del sustrato (Fukuda y Wakagi, Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002)). La OFOR codificada por *Ape1472/Ape1473* de *Aeropyrum pernix* str. El K1 fue recientemente clonado en *E. coli*, caracterizado, y se encuentra por reaccionar con 2-oxoglutarato y un amplio intervalo de 2-oxoácidos (Nishizawa *et al.*, FEBS Lett. 579:2319-2322 (2005)). Otra OFOR ejemplar es codificada por *oorDABC* en *Helicobacter pilori* (Hughes et al. 1998). Una enzima específica para alfa-cetoglutarato ha sido reportada en *Thauera aromatica* (Dorner y Boll, J, Bacteriol. 184 (14), 3975-83 (2002). Una enzima similar se pueden encontrar en *Rhodospirillum rubrum* por homología de secuencia. Una enzima de dos subunidades también ha sido identificada en *Chlorobium tepidum* (Eisen *et al.*, PNAS 99(14): 9509-14 (2002)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
korA	BAB21494	12583691	*Hidrogenobacter thermophilus*
korB	BAB21495	12583692	*Hidrogenobacter thermophilus*
forD	BAB62132.1	14970994	*Hidrogenobacter thermophilus*
forA	BAB62133.1	14970995	*Hidrogenobacter thermophilus*
forB	BAB62134.1	14970996	*Hidrogenobacter thermophilus*
forG	BAB62135.1	14970997	*Hidrogenobacter thermophilus*
forE	BAB62136.1	14970998	*Hidrogenobacter thermophilus*
Clim_0204	ACD89303.1	189339900	*Chlorobium limicola*

Clim_0205	ACD89302.1	189339899	*Chlorobium limicola*
Clim_1123	ACD90192.1	189340789	*Chlorobium limicola*
Clim_1124	ACD90193.1	189340790	*Chlorobium limicola*
Moth_1984	YP_430825.1	83590816	*Moorella thermoacetica*
Moth_1985	YP_430826.1	83590817	*Moorella thermoacetica*
Moth_0034	YP_428917.1	83588908	*Moorella thermoacetica*
ST2300	NP_378302.1	15922633	*Sulfolobus* sp. cepa 7
Ape1472	BAA80470.1	5105156	*Aeropyrum pernix*
Ape1473	BAA80471.2	116062794	*Aeropyrum pernix*
oorD	NP_207383.1	15645213	*Helicobacter pilori*
oorA	NP_207384.1	15645214	*Helicobacter pilori*
oorB	NP_207385.1	15645215	*Helicobacter pilori*
oorC	NP_207386.1	15645216	*Helicobacter pilori*
CT0163	NP_661069.1	21673004	*Chlorobium tepidum*
CT0162	NP_661068.1	21673003	*Chlorobium tepidum*
korA	CAA12243.2	19571179	*Thauera aromatica*
korB	CAD27440.1	19571178	*Thauera aromatica*
Rru_A2721	YP_427805.1	83594053	*Rhodospirillum rubrum*
Rru_A2722	YP_427806.1	83594054	*Rhodospirillum rubrum*

La isocitrato deshidrogenasa cataliza la descarboxilación reversible de isocitrato a 2-oxoglutarato acoplado a la reducción de $NAD(P)^+$. Las enzimas IDH en *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli* son codificadas por *IDP1* y *icd*, respectivamente (Haselbeck y McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 266:2339-2345 (1991); Nimmo, H.G., *Biochem. J.* 234:317-2332 (1986)). La reacción reversa en el ciclo TCA reductivo, la carboxilación reductiva de 2-oxoglutarato a isocitrato, es favorecida por la IDH que fija CO2 dependiente de NADPH de *Chlorobium limicola* y fue funcionalmente expresada en *E. coli* (Kanao *et al., Eur. J. Biochem.* 269:1926-1931 (2002)). Una enzima similar con 95% de identidad de secuencia es encontrada en el genoma *C. tepidum* en adición a algunos otros candidatos listados a continuación.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
Icd	ACI84720.1	209772816	*Escherichia coli*
IDP1	AAA34703.1	171749	*Saccharomyces cerevisiae*
Idh	BAC00856.1	21396513	*Chlorobium limicola*
Icd	AAM71597.1	21646271	*Chlorobium tepidum*
icd	NP_952516.1	39996565	*Geobacter sulfurreducens*
icd	YP_393560.	78777245	*Sulfurimonas denitrificans*

En *H. thermophilus* la carboxilación reductiva de 2-oxoglutarato a isocitrato es catalizada por dos enzimas: 2-oxoglutarato carboxilasa y oxalosuccinato reductasa. La 2-oxoglutarato carboxilasa (EC 6.4.1.7) cataliza la Carboxilación dependiente de ATP de alfa-cetoglutarato a oxalosuccinato (Aoshima y Igarashi, *Mol. Microbiol.* 62:748-759 (2006)). Esta enzima es un complejo amplio que se compone de dos subunidades. La biotinilación de la subunidad (A) amplia es requerida para función de la enzima (Aoshima *et al., Mol. Microbiol.* 51:791-798 (2004)). La oxalosuccinato reductasa (EC 1.1.1.-) cataliza la conversión dependiente de NAD de oxalosuccinato a D-*treo*-isocitrato. La enzima es un homodímero codificado por *icd* en *H. thermophilus*. Los parámetros cinéticos de esta enzima indica que la enzima solamente opera en la dirección reductiva de carboxilación *in vivo,* en contraste a las enzimas de isocitrato deshidrogenasa en otros organismos (Aoshima y Igarashi, *J. Bacteriol.* 190:2050-2055 (2008)). En base a la homología de secuencia, candidatos del gen también han sido encontrados en *Thiobacillus denitrificans* y *Thermocrinis albus.*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
cfiA	BAF34932.1	116234991	*Hidrogenobacter thermophilus*
cifB	BAF34931.1	116234990	*Hidrogenobacter thermophilus*
Icd	BAD02487.1	38602676	*Hidrogenobacter thermophilus*
Tbd_1556	YP_315314	74317574	*Thiobacillus denitrificans*
Tbd_1555	YP_315313	74317573	*Thiobacillus denitrificans*
Tbd_0854	YP_314612	74316872	*Thiobacillus denitrificans*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
Thal_0268	YP_003473030	289548042	*Thermocrinis albus*
Thal_0267	YP_003473029	289548041	*Thermocrinis albus*
Thal_0646	YP_003473406	289548418	*Thermocrinis albus*

La aconitasa (EC 4.2.1.3) es una proteína que contiene hierro-azufre que cataliza la isomerización reversible de citrato e iso-citrato vía el intermediario *cis*-aconitato. Dos enzimas aconitasa son codificadas en el genoma de *E. coli* por *acnA* y *acnB*. AcnB es la principal enzima catabólica, mientras AcnA es más estable y parece ser activa bajo condiciones de estrés oxidativo o acídico (Cunningham *et al., Microbiology* 143 (Pt 12):3795-3805 (1997)). Dos isozimas de aconitasa en *Salmonella typhimurium* son codificadas por *acnA* y *acnB* (Horswill y Escalante-Semerena, *Biochemistry* 40:4703-4713 (2001)). La aconitasa *S. cerevisiae*, codificada por *ACO1*, es localizada en la mitocondria en donde participa en el ciclo TCA (Gangloff *et al., Mol. Cell. Biol.* 10:3551-3561 (1990)) y el crisol en donde participa en la derivación de glioxilato (Regev-Rudzki *et al., Mol. Biol. Cell.* 16:4163-4171 (2005)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
acnA	AAC7438.1	1787531	*Escherichia coli*
acnB	AAC73229.1	2367097	*Escherichia coli*
acnA	NP_460671.1	16765056	*Salmonella typhimurium*
HP0779	NP_207572.1	15645398	*Helicobacter pilori 26695*
H16_B0568	CAJ95365.1	113529018	Ralstonia eutropha
DesfrDRAFT_3783	ZP_07335307.1	303249064	*Desulfovibrio fructosovorans JJ*
Suden_1040 (acnB)	ABB44318.1	78497778	Sulfurimonas denitrificans
Hydth_0755	ADO45152.1	308751669	*Hidrogenobacter thermophilus*
CT0543 (acn)	AAM71785.1	21646475	*Chlorobium tepidum*
Clim_2436	YP_001944436.1	189347907	Chlorobium limicola
Clim_0515	ACD89607.1	189340204	Chlorobium limicola
acnB	NP_459163.1	16763548	*Salmonella typhimurium*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
ACO1	AAA34389.1	170982	*Saccharomyces cerevisiae*

La piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) cataliza la oxidación reversible de piruvato para formar acetil-CoA. La PFOR de *Desulfovibrio africanus* ha sido clonada y expresada en *E. coli* resultando en una enzima recombinante activa que fue estable por varios días en la presencia de oxígeno (Pieulle *et al., J. Bacteriol.* 179:5684-5692 (1997)). La estabilidad de oxígeno es relativamente poco común en PFORs y se cree debe conferir una extensión de 60 residuos en la cadena de polipéptido de la enzima *D. africanus*. Dos residuos de cisteína es esta enzima forman un enlace de disulfuro que protege contra inactivación en la forma de oxígeno. Este enlace de disulfuro y la estabilidad en la presencia de oxígeno se ha encontrado también en otras especies de *Desulfovibrio* (Vita *et al.,* Biochemistry, 47: 957-64 (2008)). La PFOR de *M. thermoacetica* es también caracterizada (Menon and Ragsdale, *Biochemistry* 36:8484-8494 (1997)) y fue mostrada por tener gran actividad en la dirección de síntesis de piruvato durante crecimiento autotrófico (Furdui and Ragsdale, *J. Biol. Chem.* 275:28494-28499 (2000)). Además, *E. coli* tiene una estructura lectora abierta no caracterizada, *ydbK*, que codifican una proteína que es 51% idéntica a la PFOR de *M. thermoacetica*. Ha sido descrita evidencia para actividad de piruvato oxidorreductasa en *E. coli* (Blaschkowski *et al., Eur. J. Biochem.* 123:563-569 (1982)). También se han descrito PFORs en otros organismos, que incluyen *Rhodobacter capsulatas* (Yakunin y Hallenbeck, Biochimica et Biophysica Acta 1409 (1998) 39-49 (1998)) y *Choloboum tepidum* (Eisen *et al.,* PNAS 99(14): 9509-14 (2002)). La PFOR cinco subunidades de *H. thermophilus*, codificada por *porEDABG*, fue clonada en *E. coli* y se muestra por funcionar en direcciones tanto de descarboxilante como en asimilante de CO2 (Ikeda et al. 2006; Yamamoto *et al., Extremophiles* 14:79-85 (2010)). Los homólogos también existen en *C. carboxidivorans P7*. Varias enzimas PFOR adicionales se describen en la siguiente revisión (Ragsdale, S.W., *Chem. Rev.* 103:2333-2346 (2003)). Finalmente, flavodoxina reductasas (por ejemplo, *fqrB* de *Helicobacter pilori* o *Campilobacter jejuni*) (St Maurice *et al., J. Bacteriol.* 189:4764-4773 (2007)) o proteínas tipo Rnf (Seedorf *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:2128-2133 (2008); y Herrmann, *J. Bacteriol* 190:784-791 (2008)) proporciona medios para generar NADH o NADPH de la ferredoxina reducida generada por PFOR. Estas

proteínas son identificadas a continuación.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
DesfrDRAFT_0121	ZP_07331646.1	303245362	*Desulfovibrio fructosovorans JJ*
Por	CAA70873.1	1770208	*Desulfovibrio africanus*
por	YP_012236.1	46581428	*Desulfovibrio vulgaris str. Hildenborough*
Dde_3237	ABB40031.1	78220682	*DesulfoVibrio desulfuricans G20*
Ddes_0298	YP_002478891.1	220903579	*Desulfovibrio desulfuricans subsp. desulfuricans str. ATCC 27774*
Por	YP_428946.1	83588937	*Moorella thermoacetica*
YdbK	NP_415896.1	16129339	*Escherichia coli*
nifJ (CT1628)	NP_662511.1	21674446	*Chlorobium tepidum*
CJE1649	YP_179630.1	57238499	*Campilobacter jejuni*
nifJ	ADE85473.1	294476085	*Rhodobacter capsulatus*
porE	BAA95603.1	7768912	*Hidrogenobacter thermophilus*
porD	BAA95604.1	7768913	*Hidrogenobacter thermophilus*
porA	BAA95605.1	7768914	*Hidrogenobacter thermophilus*
porB	BAA95606.1	776891	*Hidrogenobacter thermophilus*
porG	BAA95607.1	7768916	*Hidrogenobacter thermophilus*
FqrB	YP_001482096.1	157414840	*Campilobacter jejuni*
HP1164	NP_207955.1	15645778	*Helicobacter pilori*
RnfC	EDK33306.1	146346770	*Clostridium kluyveri*
RnfD	EDK33307.1	146346771	*Clostridium kluyveri*

RnfG	EDK33308.1	146346772	*Clostridium kluyveri*
RnfE	EDK33309.1	146346773	*Clostridium kluyveri*
RnfA	EDK33310.1	146346774	*Clostridium kluyveri*
RnfB	EDK33311.1	146346775	*Clostridium kluyveri*

La conversión de piruvato en acetil-CoA puede ser catalizada por otras varias enzimas o sus combinaciones. Por ejemplo, piruvato deshidrogenasa puede transformar piruvato en acetil-CoA con la reducción concomitante de una molécula de NAD en NADH. Es un complejo de enzimas múltiples que cataliza una serie de reacciones parciales las cuales resultan en descarboxilación oxidativa acilante de piruvato. La enzima comprende tres subunidades: piruvato descarboxilasa (E1), dihidrolipoamida aciltransferasa (E2) y dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3). Esta enzima está naturalmente presente en varios organismos, que incluyen *E. coli* y *S. cerevisiae*. En la enzima *E. coli*, residuos específicos en el componente E1 son responsables para la especificidad del sustrato (Bisswanger, H., J. Biol. Chem. 256:815-82 (1981); Bremer, J., Eur. J. Biochem. 8:535-540 (1969); Gong *et al.,* J. Biol. Chem. 275:13645-13653 (2000)). La enzima diseñada por ingeniería hace esfuerzos por tener actividad enzima PDH de *E. coli* mejorada bajo condiciones anaeróbicas (Kim *et al.,* J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008); Kim *et al.,* Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771 (2007); Zhou *et al.,* Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008)). En contraste a PDH de *E. coli*, el complejo de *B. subtilis* está activo y es requerido para crecimiento bajo condiciones anaeróbicas (Nakano *et al.,* J. Bacteriol. 179:6749-6755 (1997)). La PDH de *Klebsiella pneumoniae*, caracterizada durante crecimiento en glicerol, es también activa bajo condiciones anaeróbicas (5). Las estructuras enzimáticas del complejo enzimático de riñón de bovino (18) y el dominio catalítico E2 de *Azotobacter vinelandii* están disponibles (4). Aún otra enzima que puede catalizar esta conversión es piruvato formiato liasa. Esta enzima cataliza la conversión de piruvato y CoA en acetil-CoA y formiato. Piruvato formiato liasa es una enzima común en organismos procarióticos que se usan para ayudar a modular balance rédox anaeróbico. Enzimas ejemplares se pueden encontrar en *Escherichia coli* codificadas por *pflB* (Knappe y Sawers, FEMS.Microbiol Rev. 6:383-398 (1990)), *Lactococcus lactis* (Melchiorsen *et al.,* Appl Microbiol Biotechnol 58:338-344 (2002)), y *Streptococcus mutans* (Takahashi-Abbe *et al.,* Oral.Microbiol Immunol. 18:293-297 (2003)). *E. coli* tiene una piruvato formiato liasa adicional, codificada por *tdcE*, que cataliza la conversión de piruvato o 2-oxobutanoato a acetil-CoA o

propionil-CoA, respectivamente (Hesslinger *et al.,* Mol. Microbiol 27:477-492 (1998)). Tanto *pflB* como *tdcE* de *E. coli* requieren la presencia de la enzima que activa piruvato formiato liasa, codificada por *pflA*. Además, una proteína corta codificada por *yfiD* en *E. coli* puede estar asociada con y restaurar la actividad a piruvato formiato liasa desdoblada por oxígeno (Vey *et al.,* Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:16137-16141 (2008). Nótese que *pflA* y *pflB* de *E. coli* son expresadas en *S. cerevisiae* como un medio para incrementar acetil-CoA cistosólico para producción de butanol como se describe en WO/2008/080124]. Piruvato formiato liasa adicional y candidatos de la enzima de activación, codificadas por *pfl* y *act*, respectivamente, son encontradas en *Clostridium pasteurianum* (Weidner *et al.,* J Bacteriol. 178:2440-2444 (1996)).

Además, diferentes enzimas pueden ser usadas en combinación para convertir piruvato en acetil-CoA. Por ejemplo, en *S. cerevisiae*, acetil-CoA es obtenida en el crisol primero descarboxilando piruvato para formar acetaldehído; lo último es oxidado a acetato por acetaldehído deshidrogenasa y subsecuentemente activado para formar acetil-CoA por acetil-CoA sintetasa. Acetil-CoA sintetasa es una enzima nativa en otros organismos variados que incluyen *E. coli* (Kumari *et al.,* J. Bacteriol. 177:2878-2886 (1995)), *Salmonella enterica* (Starai *et al.,* Microbiology 151:3793-3801 (2005); Starai *et al.,* J. Biol. Chem. 280:26200-26205 (2005)), y *Moorella thermoacetica* (ya descrita). Alternativamente, el acetato puede ser activado para formar acetil-CoA por acetato cinasa y fosfotransacetilasa. El acetato cinasa primero convierte acetato en acetil-fosfato con el uso acompañante de una molécula ATP. Acetil-fosfato y CoA son después convertidas en acetil-CoA con la liberación de un fosfato por fosfotransacetilasa. Tanto la acetato cinasa como la fosfotransacetliasa son enzimas bien estudiadas en varias *Clostridia* y *Methanosarcina thermophila.*

Aún otra forma de convertir piruvato a acetil-CoA es vía piruvato oxidasa. La piruvato oxidasa convierte piruvato en acetato, usando ubiquinona como el aceptor de electrón. En *E. coli*, esta actividad es codificada por *poxB*. *PoxB* tiene similitud a piruvato descarboxilasa de *S. cerevisiae y Zymomonas mobilis*. La enzima tiene un cofactor tiamina pirofosfato (Koland y Gennis, Biochemistry 21:4438-4442 (1982)); O'Brien *et al.,* Biochemistry 16:3105-3109 (1977); O'Brien y Gennis, J. Biol. Chem. 255:3302-3307 (1980)) y un cofactor de flavina adenina dinucleótido (FAD). El acetato puede entonces ser convertido en acetil-CoA por cualquiera de acetil-CoA sintetasa o por acetato cinasa y fosfotransacetilasa, como se describe anteriormente. Algunas de estas enzimas

pueden también catalizar la reacción reversa de acetil-CoA a piruvato.

Para enzimas que usan equivalentes de reducción en la forma de NADH o NADPH, estos portadores reducidos pueden ser generados transfiriendo electrones de ferredoxina reducida. Dos enzimas catalizan la transferencia reversible de electrones de ferredoxina reducida a $NAD(P)^+$, ferredoxina:NAD^+ oxidorreductasa (EC 1.18.1.3) y ferredoxina:$NADP^+$ oxidorreductasa (FNR, EC 1.18.1.2). Ferredoxina:$NADP^+$ oxidorreductasa (FNR, EC 1.18.1.2) tiene un cofactor FAD de enlace no covalentemente que facilita la transferencia reversible de electrones de NADPH a aceptores potenciales bajos tal como ferredoxinas o flavodoxinas (Blaschkowski *et al., Eur. J. Biochem.* 123:563-569 (1982); Fujii *et al.*, 1977). La FNR de *Helicobacter pilori*, codificada por *HP1164 (fqrB)*, es acoplada a la actividad de piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) resultando en la producción dependiente de piruvato de NADPH (St et al. 2007). Una enzima análoga es encontrada en *Campilobacter jejuni* (St et al. 2007). Una enzima ferredoxina:$NADP^+$ oxidorreductasa es codifica en el genoma de *E. coli* por *fpr* (Bianchi et al. 1993). La ferredoxina:NAD^+ oxidorreductasa utiliza ferredoxina reducida para generar NADH de NAD^+. En varios organismos, que incluyen *E. coli*, esta enzima es un componente de la enzima dioxigenasa multifuncional formada en complejos. La ferredoxina:NAD^+ oxidorreductasa de *E. coli*, codificada por *hcaD,* es un componente del sistema 3-fenilpropionato dioxigenasa involucrado en utilización de ácido aromático (Diaz et al. 1998). La actividad de NADH:ferredoxina reductasa fue detectada en extractos celulares de *Hidrogenobacter thermophilus* cepa TK-6, a pesar de que un gen con esta actividad aún no ha sido indicado (Yoon et al. 2006). Finalmente, las proteínas tipo Rnf asociadas a la membrana que conservan energía (Seedorf *et al.,* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:2128-2133 (2008); Herrmann *et al., J. Bacteriol.* 190:784-791 (2008)) proporcionan medios para generar NADH o NADPH de ferredoxina reducida. Las ferredoxina:NAD(P)+ oxidorreductasas adicionales se han anotado en *Clostridium carboxidivorans* P7.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
HP1164	NP_207955.1	15645778	*Helicobacter pilori*
RPA3954	CAE29395.1	39650872	*Rhodopseudomonas palustris*
fpr	BAH29712.1	225320633	*Hidrogenobacter*

			thermophilus
yumC	NP_391091.2	255767736	*Bacillus subtilis*
CJE0663	AAW35824.1	57167045	*Campilobacter jejuni*
fpr	P28861.4	399486	*Escherichia coli*
hcaD	AAC75595.1	1788892	*Escherichia coli*
LOC100282643	NP_001149023.1	226497434	*Zea mays*
RnfC	EDK33306.1	146346770	*Clostridium kluyveri*
RnfD	EDK33307.1	146346771	*Clostridium kluyveri*
RnfG	EDK33308.1	146346772	*Clostridium kluyveri*
RnfE	EDK33309.1	146346773	*Clostridium kluyveri*
RnfA	EDK33310.1	146346774	*Clostridium kluyveri*
RnfB	EDK33311.1	146346775	*Clostridium kluyveri*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
CcarbDRAFT_2639	ZP_05392639.1	255525707	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_2638	ZP_05392638.1	255525706	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_2636	ZP_05392636.1	255525704	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_5060	ZP_05395060.1	255528241	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_2450	ZP_05392450.1	255525514	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_1084	ZP_05391084.1	255524124	*Clostridium carboxidivorans P7*

Las ferredoxinas son proteínas acídicas pequeñas que contiene una o más agrupaciones de hierro-azufre que funcionan como portadores de electrón intracelular con un potencial de reducción bajo. Las ferredoxinas reducidas donan electrones a las enzimas dependientes de Fe tal como ferredoxina-$NADP^+$ oxidorreductasa, piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) y 2-oxoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa (OFOR). El gene *fdx1* de *H. thermophilus*

codifica una ferredoxina tipo [4Fe-4S] que es requerida para la carboxilación reversible de 2-oxoglutarato y piruvato por OFOR y PFOR, respectivamente (Yamamoto *et al., Extremophiles* 14:79-85 (2010)). La ferredoxina asociada con la 2-oxoácido:ferredoxina reductasa de *Sulfolobus solfataricus* es un diagrupamiento monomérico ferredoxina tipo [3Fe-4S][4Fe-4S] (Park et al. 2006). Mientras que el gen asociado con esta proteína no ha sido completamente secuenciado, el dominio N-terminal participa en 93% de homología con la ferredoxina *zfx* de *S. acidoocaldarius*. El genoma de *E. coli* codifica una ferredoxina soluble de función fisiológica desconocida, *fdx*. Alguna evidencia indica que esta proteína puede funcionar en montaje de agrupamiento hierro-azufre (Takahashi y Nakamura, 1999). Proteínas de ferredoxina adicionales se han caracterizado en *Helicobacter pilori* (Mukhopadhyay et al. 2003) y *Campilobacter jejuni* (van Vliet et al. 2001). Una ferredoxina 2Fe-2S de *Clostridium pasteurianum* ha sido clonada y expresada en *E. coli* (Fujinaga y Meyer, Biochemical y Biophysical Research Communications, 192(3): (1993)). Bacteria acetogénica tal como *Moorella thermoacetica*, *Clostridium carboxidivorans P7 y Rhodospirillum rubrum* son previstas para codificar varias ferredoxinas, listadas en la tabla posterior.

Proteína	**ID de GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
fdx1	BAE02673.1	68163284	*Hidrogenobacter thermophilus*
M11214.1	AAA83524.1	144806	*Clostridium pasteurianum*
Zfx	AAY79867.1	68566938	*Sulfolobus Acidicalarius*
Fdx	AAC75578.1	1788874	*Escherichia coli*
hp_0277	AAD07340.1	2313367	*Helicobacter pilori*
fdxA	CAL34484.1	112359698	*Campilobacter jejuni*
Moth_0061	ABC18400.1	83571848	*Moorella thermoacetica*

Proteína	**ID de GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
Moth_1200	ABC19514.1	83572962	*Moorella thermoacetica*
Moth_1888	ABC20188.1	83573636	*Moorella thermoacetica*
Moth_2112	ABC20404.1	83573852	*Moorella thermoacetica*
Moth_1037	ABC19351.1	83572799	Moorella thermoacetica
CcarbDRAFT_4383	ZP_05394383.1	255527515	*Clostridium*

			carboxidivorans P7
CcarbDRAFT_2958	ZP_05392958.1	255526034	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_2281	ZP_05392281.1	255525342	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_5296	ZP_05395295.1	255528511	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_1615	ZP_05391615.1	255524662	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_1304	ZP_05391304.1	255524347	*Clostridium carboxidivorans P7*
cooF	AAG29808.1	11095245	*Carboxidotromus hidrogenoformans*
fdxN	CAA35699.1	46143	*Rhodobacter capsulatus*
Rru_A2264	ABC23064.1	83576513	*Rhodospirillum rubrum*
Rru_A1916	ABC22716.1	83576165	*Rhodospirillum rubrum*
Rru_A2026	ABC22826.1	83576275	*Rhodospirillum rubrum*
cooF	AAC45122.1	1498747	*Rhodospirillum rubrum*
fdxN	AAA26460.1	152605	*Rhodospirillum rubrum*
Alvin_2884	ADC63789.1	288897953	*Allochromatium vinosum DSM 180*

Proteína	**ID de GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
fdx	YP_002801146.1	226946073	Azotobacter vinelandii DJ
CKL_3790	YP_001397146.1	153956381	Clostridium kluyveri DSM 555
fer1	NP_949965.1	39937689	Rhodopseudomonas palustris CGA009
fdx	CAA12251.1	3724172	Thauera aromatica
CHY_2405	YP_361202.1	78044690	Carboxidotromus hidrogenoformans
fer	YP_359966.1	78045103	Carboxidotromus hidrogenoformans

fer	AAC83945.1	1146198	Bacillus subtilis
fdx1	NP_249053.1	15595559	Pseudomonas aeruginosa PA01
yfhL	AP_003148.1	89109368	Escherichia coli K-12

La succinil-CoA transferasa cataliza la conversión de succinil-CoA a succinato mientras transfiere la porción CoA a una molécula aceptora CoA. Muchas transferasas tienen especificidad ampliada y pueden utilizar aceptores CoA tan diversos como acetato, succinato, propionato, butirato, 2-metilacetoacetato, 3-cetohexanoato, 3-cetopentanoato, valerato, cronato, 3-mercaptopropionato, propionato, vinilacetato, y butirato, entre otros.

La conversión de succinato a succinil-CoA puede ser llevada a cabo por una transferasa la cual no requiere el consumo directo de una ATP o GTP. Este tipo de reacción es común en un número de organismos. La conversión de succinato a succinil-CoA puede también ser catalizada por succinil-CoA:Acetil-CoA transferasa. El producto del gen de *cat1* de *Clostridium kluyveri* se ha mostrado por exhibir actividad succinil-CoA:acetil-CoA transferasa (Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996)). Además, la actividad está presente en *Trichomonas vaginalis* (van Grinsven et al. 2008) y *Trypanosoma brucei* (Riviere et al. 2004). La succinil-CoA:acetato de CoA-transferasa de *Acetobacter aceti*, codificada por *aarC*, reemplaza succinil-CoA sintetasa en un ciclo TCA variante (Mullins et al. 2008). Las actividades succinil-CoA transferasa similares están también presentes en *Trichomonas vaginalis* (van Grinsven et al. 2008), *Trypanosoma brucei* (Riviere et al. 2004) y *Clostridium kluyveri* (Sohling y Gottschalk, 1996c). La beta-cetoadipato:succinil-CoA transferasa codificada por *pcaI* y *pcaJ* en *Pseudomonas putida* es aún otro candidato (Kaschabek et al. 2002). Las proteínas antes mencionadas son identificadas a continuación.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
cat1	P38946.1	729048	*Clostridium kluyveri*
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	*Trichomonas vaginalis G3*
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	*Trypanosoma brucei*
pcaI	AAN69545.1	24985644	*Pseudomonas putida*
pcaJ	NP_746082.1	26990657	*Pseudomonas putida*
aarC	ACD85596.1	189233555	*Acetobacter aceti*

Una transferasa ejemplar adicional que convierte succinato a succinil-CoA mientras convierte una 3-cetoacil-CoA a un 3-cetoácido es succinil-CoA:3:cetoácido-CoA transferasa (EC 2.8.3.5). Succinil-CoA:3:cetoácido-CoA transferasas ejemplares están presentes en *Helicobacter pilori* (Corthesy-Theulaz et al. 1997), *Bacillus subtilis*, y *Homo sapiens* (Fukao et al. 2000; Tanaka et al. 2002). Las proteínas antes mencionadas son identificadas a continuación.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
HPAG1_0676	YP_627417	108563101	*Helicobacter pilori*
HPAG1_0677	YP_627418	108563102	*Helicobacter pilori*
ScoA	NP_391778	16080950	*Bacillus subtilis*
ScoB	NP_391777	16080949	*Bacillus subtilis*
OXCT1	NP_000427	4557817	*Homo sapiens*
OXCT2	NP_071403	11545841	*Homo sapiens*

La conversión de succinato a succinil-CoA por succinil-CoA:3:cetoácido-CoA transferasa requiere la conversión simultánea de una 3-cetoacil-CoA tal como acetoacetil-CoA a un 3-cetoácido tal como acetoacetato. La conversión de un 3-cetoácido nuevamente a un 3-cetoacil-CoA puede ser catalizada por una acetoacetil-CoA:acetato:CoA transferasa. Acetoacetil-CoA:acetato:CoA transferasa convierte acetoacetil-CoA y acetato a acetoacetato y acetil-CoA, o vice versa. Enzimas ejemplares incluyen los productos del gen de *atoAD* de *E. coli* (Hanai *et al.*, Appl Environ Microbiol 73:7814-7818 (2007), *ctfAB* de *C. acetobutilicum* (Jojima *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol 77:1219-1224 (2008), y *ctfAB* de *Clostridium saccharoperbutilacetonicum* (Kosaka *et al.*, *Biosci.Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007)) se muestran abajo.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
AtoA	NP_416726.1	2492994	*Escherichia coli*
AtoD	NP_416725.1	2492990	*Escherichia coli*
CtfA	NP_149326.1	15004866	*Clostridium acetobutilicum*
CtfB	NP_149327.1	15004867	*Clostridium acetobutilicum*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
CtfA	AAP42564.1	31075384	*Clostridium saccharoperbutilacetonicum*
CtfB	AAP42565.1	31075385	*Clostridium saccharoperbutilacetonicum*

Aún otro posible aceptor de CoA es bencilsuccinato. La succinil-CoA:(R)-Bencilsuccinato CoA-Transferasa funciona como parte de una trayectoria de degradación anaeróbica para tolueno en organismos tal como *Thauera aromatica* (Leutwein y Heider, *J. Bact.* 183(14) 4288-4295 (2001)). Se pueden encontrar homólogos en *Azoarcus* sp. T, *Aromatoleum aromaticum* EbN1, y *Geobacter metallireducens* GS-15. Las proteínas antes mencionadas son identificadas a continuación.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
bbsE	AAF89840	9622535	*Thauera aromatic*
Bbsf	AAF89841	9622536	*Thauera aromatic*
bbsE	AAU45405.1	52421824	*Azoarcus sp. T*
bbsF	AAU45406.1	52421825	*Azoarcus sp. T*
bbsE	YP_158075.1	56476486	*Aromatoleum aromaticum EbN1*
bbsF	YP_158074.1	56476485	*Aromatoleum aromaticum EbN1*
Gmet_1521	YP_384480.1	78222733	*Geobacter metallireducens GS-15*
Gmet_1522	YP_384481.1	78222734	*Geobacter metallireducens GS-15*

Adicionalmente, *ygfH* codifica una propionil CoA:succinato CoA transferasa en *E. coli* (Haller *et al., Biochemistry*, 39(16) 4622-4629). Se pueden encontrar homólogos cercanos en, por ejemplo, *Citrobacter youngae* ATCC 29220, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae serovar*, y *Yersinia intermedia* ATCC 29909. Las proteínas antes mencionadas son identificadas a continuación.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
ygfH	NP_417395.1	16130821	*Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
CIT292_04485	ZP_03838384.1	227334728	*Citrobacter youngae ATCC 29220*
SARI_04582	YP_001573497.1	161506385	*Salmonella enterica subsp. arizonae serovar*
yinte0001_14430	ZP_04635364.1	238791727	*Yersinia intermedia ATCC 29909*

Citrato liasa (EC 4.1.3.6) cataliza una serie de reacciones que resulta en el desdoblamiento de citrato a acetato y oxaloacetato. La enzima está activa bajo condiciones anaeróbicas y está compuesta de tres subunidades: una proteína que porta acilo (ACP, gama), una ACP transferasa (alfa), y una acil liasa (beta). La activación enzimática usa enlaces covalentes y acetilación de un grupo prostético inusual, 2'-(5"-fosforibosil)-3-'-defosfo-CoA, el cual es similar en estructura a acetil-CoA. La acilación es catalizada por CitC, una citrato liasa sintetasa. Dos proteínas adicionales, CitG y CitX, son usadas para convertir la enzima apo en la enzima holo activa (Schneider *et al., Biochemistry* 39:9438-9450 (2000)). La *E. coli* tipo nativo no tiene actividad citrato liasa; sin embargo, mutantes deficientes en síntesis del cofactor de molibdeno tienen una citrato liasa activa (Clark, *FEMS Microbiol. Lett.* 55:245-249 (1990)). La enzima de *E. coli* es codificada por *citEFD* y la citrato liasa sintetasa es codificada por *citC* (Nilekani y SivaRaman, *Biochemistry* 22:4657-4663 (1983)). La citrato liasa de *Leuconostoc mesenteroides* ha sido clonada, caracterizada y expresada en *E. coli* (Bekal *et al., J. Bacteriol.* 180:647-654 (1998)). Las enzimas de citrato liasa también se han identificado en enterobacterias que utilizan citrato como un carbono y fuente de energía, que incluyen *Salmonella typhimurium* y *Klebsiella pneumoniae* (Bott, *Arch. Microbiol.* 167: 78-88 (1997); Bott y Dimroth, *Mol. Microbiol.* 14:347-356 (1994)). Las proteínas antes mencionadas son tabuladas a continuación.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
citF	AAC73716.1	1786832	*Escherichia coli*
Cite	AAC73717.2	87081764	*Escherichia coli*
citD	AAC73718.1	1786834	*Escherichia coli*
citC	AAC73719.2	87081765	*Escherichia coli*
citG	AAC73714.1	1786830	*Escherichia coli*
citX	AAC73715.1	1786831	*Escherichia coli*
citF	CAA71633.1	2842397	*Leuconostoc mesenteroides*
Cite	CAA71632.1	2842396	*Leuconostoc mesenteroides*
citD	CAA71635.1	2842395	*Leuconostoc mesenteroides*
citC	CAA71636.1	3413797	*Leuconostoc mesenteroides*
citG	CAA71634.1	2842398	*Leuconostoc mesenteroides*
citX	CAA71634.1	2842398	*Leuconostoc mesenteroides*
citF	NP_459613.1	16763998	*Salmonella typhimurium*
cite	AAL19573.1	16419133	*Salmonella typhimurium*
citD	NP_459064.1	16763449	*Salmonella typhimurium*
citC	NP_459616.1	16764001	*Salmonella typhimurium*
citG	NP_459611.1	16763996	*Salmonella typhimurium*
citX	NP_459612.1	16763997	*Salmonella typhimurium*
citF	CAA56217.1	565619	*Klebsiella pneumoniae*
cite	CAA56216.1	565618	*Klebsiella pneumoniae*
citD	CAA56215.1	565617	*Klebsiella pneumoniae*
citC	BAH66541.1	238774045	*Klebsiella pneumoniae*
citG	CAA56218.1	565620	*Klebsiella pneumoniae*
citX	AAL60463.1	18140907	*Klebsiella pneumoniae*

Acetato cinasa (EC 2.7.2.1) cataliza la fosforilación dependiente de ATP reversible de acetato a acetilfosfato. Las enzimas acetato cinasa ejemplares se han caracterizado en muchos organismos que incluyen *E. coli*, *Clostridium*

acetobutilicum y *Methanosarcina thermophila* (Ingram-Smith *et al., J. Bacteriol.* 187:2386-2394 (2005); Fox y Roseman, *J. Biol. Chem.* 261:13487-13497 (1986); Winzer *et al., Microbioloy* 143 (Pt 10):3279-3286 (1997)). La actividad de acetato cinasa también ha sido demostrada en el producto del gen de *E. coli purT* (Marolewski *et al., Biochemistry* 33:2531-2537 (1994). Algunas enzimas de butirato cinasa (EC 2.7.2.7), por ejemplo *buk1* y *buk2* de *Clostridium acetobutilicum,* también aceptan acetato como un sustrato (Hartmanis, M.G., *J. Biol. Chem.* 262:617-621 (1987)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
ackA	NP_416799.1	16130231	*Escherichia coli*
Ack	AAB18301.1	1491790	*Clostridium acetobutilicum*
Ack	AAA72042.1	349834	*Methanosarcina thermophila*
purT	AAC74919.1	1788155	*Escherichia coli*
buk1	NP_349675	15896326	*Clostridium acetobutilicum*
buk2	Q97II1	20137415	*Clostridium acetobutilicum*

La formación de acetil-CoA de acetilfosfato es catalizada por fosfotransacetilasa (EC 2.3.1.8). El gen *ptun* de *E. coli* codifica una enzima que reversiblemente convierte acetil-CoA en acetil-fosfato (Suzuki, T., *Biochim. Biophys. Acta* 191:559-569 (969)). Las enzimas acetiltransferasa adicionales se han caracterizado en *Bacillus subtilis* (Rado y Hoch, *Biochim. Biophys. Acta* 321:114-125 (1973), *Clostridium kluyveri* (Stadtman, E., *Methods Enzymol.* 1:5896-599 (1955), y *Thermotoga maritima* (Bock *et al., J. Bacteriol.* 181:1861-1867 (1999)). Esta reacción es también catalizada por algunas enzimas fosfotranbutirilasa (EC 2.3.1.19) que incluyen los productos del gen *ptb* de *Clostridium acetobutilicum* (Wiesenborn *et al., App. Environ. Microbiol.* 55:317-322 (1989); Walter *et al., Gene* 134:107-111 (1993)). Los genes *ptb* adicionales son encontrados en bacterias que producen butirato L2-50 (Louis *et al., J. Bacteriol.* 186:2099-2106 (2004) y *Bacillus megaterium* (Vazquez *et al., Curr. Microbiol.* 42:345-349 (2001).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
Pta	NP_416800.1	71152910	*Escherichia coli*
Pta	P39646	730415	*Bacillus subtilis*
Pta	A5N801	146346896	*Clostridium kluyveri*
Pta	Q9X0L4	6685776	*Thermotoga maritima*
Ptb	NP_349676	34540484	*Clostridium acetobutilicum*
Ptb	AAR19757.1	38425288	bacterias que producen butirato L2-50
Ptb	CAC07932.1	10046659	*Bacillus megaterium*

La acilación de acetato a acetil-CoA es catalizada por enzimas con actividad acetil-CoA sintetasa. Dos enzimas que catalizan esta reacción son acetil-CoA sintetasa que forma AMP (EC 6.2.1.1) y acetil-CoA sintetasa que forma ADP (EC 6.2.1.13). La acetil-CoA sintetasa que forma AMP (ACS) es la enzima predominante para activación de acetato a acetil-CoA. Las enzimas ACS ejemplares son encontrados en *E. coli* (Brown *et al., J. Gen. Microbiol.* 102:327-336 (1977)), *Ralstonia eutropha* (Priefert y Steinbuchel, *J. Bacteriol.* 174:6590-6599 (1992)), *Methotromobacter thermautotrophicus* (Ingram-Smith y Smith, *Archaea* 2:95-107 (2007)), *Salmonella enterica* (Gulick *et al., Biochemistry* 42:2866-2873 (2003)) y *Saccharomyces cerevisiae* (Jogl y Tong, *Biochemistry* 43:1425-1431 (2004)). Las acetil-CoA sintetasas que forman ADP son enzimas reversibles con un intervalo de sustrato generalmente amplio (Musfeldt y Schonheit, *J. Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). Dos isozimas de acetil-CoA sintetasas que forman ADP son codificadas en el genoma de *Archaeoglobus fulgidus* son codificadas por AF1211 y AF1983 (Musfeldt y Schonheit, *supra* (2002)). La enzima de *Haloarcula marismortui* (anotada como una sintetasa succinil-CoA) también acepta acetato como un sustrato y la reversibilidad de la enzima fue demostrada (Brasen y Schonheit, *Arch. Microbiol.* 182:277-287 (2004)). La ACD codificada por *PAE3250* de crenarcheon hipertermofílico de *Pirobaculum aerophilum* muestra el intervalo de sustrato más amplio de todos las ACDs caracterizadas, que reaccionan con acetato, isobutiril-CoA (sustrato preferido) y fenilacetil-CoA (Brasen y Schonheit, *supra* (2004)). La evolución directa o diseñada por ingeniería se puede usar para modificar esta enzima para operar a la temperatura fisiológica del organismo hospedero. Las enzimas de *A. fulgidus*, *H. marismortui* y *P. aerophilum* todas se han clonado, funcionalmente

expresadas, y caracterizadas en *E. coli* (Brasen y Schonheit, *supra* (2004); Musfeldt y Schonheit, *supra* (2002)). Candidatos adicionales incluyen las succinil-CoA sintetasa codificadas por *sucCD* en *E. coli* (Buck *et al., Biochemistry* 24:6245-6252 (1985)) y la acil-CoA ligasa de *Pseudomonas putida* (Fernandez-Valverde *et al., Appl. Environ. Microbiol.* 59:1149-1154 (1993)). Las proteínas antes mencionadas son tabuladas a continuación.

Proteína	**ID de GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
acs	AAC77039.1	1790505	*Escherichia coli*
acoE	AAA21945.1	141890	*Ralstonia eutropha*
acs1	ABC87079.1	86169671	*Methotromobacter thermautotrophicus*
acs1	AAL23099.1	16422835	*Salmonella enterica*
ACS1	Q01574.2	257050994	*Saccharomyces cerevisiae*
AF1211	NP_070039.1	11498810	*Archaeoglobus fulgidus*
AF1983	NP_070807.1	11499565	*Archaeoglobus fulgidus*
scs	YP_135572.1	55377722	*Haloarcula marismortui*
PAE3250	NP_560604.1	18313937	*Pirobaculum aerophilum* str. IM2
sucC	NP_415256.1	16128703	*Escherichia coli*
sucD	AAC73823.1	1786949	*Escherichia coli*
paaF	AAC24333.2	22711873	*Pseudomonas putida*

La conversión de acetil-CoA a malonil-CoA puede ser llevada a cabo por una enzima acetil-CoA carboxilasa. Estas enzimas contienen subunidades múltiples. Tres de estas enzimas son proporcionadas a continuación.

Gen	Organismo	Número de acceso	Número GI
accA	Escherichia coli K-12	AAC73296.1	1786382
accB	Escherichia coli K-12	AAC76287.1	1789653
accC	Escherichia coli K-12	AAC76288.1	1789654
accD	Escherichia coli K-12	AAC75376.1	1788655
accA	Salmonella enterica	CAD08690.1	16501513

accB	Salmonella enterica	CAD07894.1	16504441
accC	Salmonella enterica	CAD07895.1	16504442
accD	Salmonella enterica	CAD07598.1	16503590

Gen	Organismo	Número de acceso	Número GI
YMR207C	Saccharomyces cerevisiae	NP_013934.1	6323863
YNR016C	Saccharomyces cerevisiae	NP_014413.1	6324343
YGR037C	Saccharomyces cerevisiae	NP_011551.1	6321474
YKL182W	Saccharomyces cerevisiae	NP_012739.1	6322666
YPL231W	Saccharomyces cerevisiae	NP_015093.1	6325025

Los rendimientos del producto por C-mol del sustrato de células microbianas que sintetizan los productos de fermentación reducida tal como 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno, son limitados por equivalentes de reducción insuficientes en la materia prima de carbohidrato. Los equivalentes de reducción, o electrones, pueden ser extraídos de la síntesis de componentes de gas tal como CO y H_2 usando enzimas monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH) e hidrogenase, respectivamente. Los equivalentes de reducción entonces se pasan a aceptores tal como ferredoxinas oxidadas, quinonas oxidadas, citocromos oxidados, NAD(P)+, agua, o peróxido de hidrógeno para formar ferredoxina reducida, quinonas reducidas, citocromos reducidos, NAD(P)H, H_2, o agua, respectivamente. La ferredoxina reducida y NAD(P)H son particularmente útiles de forma que pueden servir como portadores rédox para varias trayectorias Wood-Ljungdahl y enzimas de ciclo TCA reductivas.

En la presente a continuación, se describen las enzimas y los genes correspondientes usados para extracción rédox de componentes syngas. La CODH es una enzima reversible que intercovierte CO y CO_2 al gasto o ganancia de electrones. El papel fisiológico natural de la CODH en ACS/CODH formada en complejos es convertir CO_2 a CO para incorporación en acetil-CoA por acetil-CoA

sintasa. No obstante, estas enzimas CODH son adecuadas para la extracción de equivalentes de reducción de CO debido a la naturaleza reversible de estas enzimas. La expresión de estas enzimas CODH en la ausencia de ACS les permite operar en la dirección opuesta a su papel fisiológico natural (es decir, oxidación de CO).

En *M. thermoacetica*, *C. hidrogenoformans*, *C. carboxidivorans P7*, y otros organismos variados, genes que codifican CODH adicionales están localizados fuera de los operones ACS/CODH. Estas enzimas proporcionan medios para extraer electrones (o equivalentes de reducción) de la conversión de monóxido de carbono a dióxido de carbono. El gen *M. thermoaceticun* (Genbank Número de acceso: YP_430813) es expresado por sí mismo en un operón y se cree que transfiere electrones de CO a un mediador externo similar a ferredoxina en una reacción "Ping-pong" (de desplazamiento doble). El mediador reducido entonces se acopla a otros portadores nicolinamida adenina dinucleótido fosfato (NAD(P)H) reducidos o procesos celulares dependientes de ferredoxina (Ragsdale, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125: 129–136 (2008)). Los genes que codifican las CODH-II y CooF de *C. hidrogenoformans*, una proteína cercana, son clonados y secuenciados (Gonzalez y Robb, *FEMS Microbiol Lett.* 191:243-247 (2000)). El complejo resultante está unido a la membrana, a pesar que las fracciones citoplásmicas de CODH-II se muestran para catalizar la formación de NADPH sugiriendo un papel anabólico (Svetlitchnyi *et al., J Bacteriol.* 183:5134-5144 (2001)). La estructura cristalina de la CODH-II está también disponible (Dobbek *et al., Science* 293:1281-1285 (2001)). Las enzimas CODH similares libres de ACS se pueden encontrar en un arreglo diverso de organismos que incluyen *Geobacter metallireducens* GS-15, *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266, *Clostridium cellulolyticum* H10, *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* str. ATCC 27774, *Pelobacter carbinolicus* DSM 2380, y *Campilobacter curvus* 525.92.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
CODH (putativa)	YP_430813	83590804	*Moorella thermoacetica*
CODH-II (CooS-II)	YP_358957	78044574	*Carboxidotromus hidrogenoformans*
CooF	YP_358958	78045112	*Carboxidotromus*

			hidrogenoformans
CODH (putativa)	ZP_05390164.1	255523193	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_0341	ZP_05390341.1	255523371	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_1756	ZP_05391756.1	255524806	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_2944	ZP_05392944.1	255526020	*Clostridium carboxidivorans P7*
CODH	YP_384856.1	78223109	*Geobacter metallireducens GS-15*
Cpha266_0148 (cytochrome c)	YP_910642.1	119355998	*Chlorobium phaeobacteroides DSM 266*
Cpha266_0149 (CODH)	YP_910643.1	119355999	*Chlorobium phaeobacteroides DSM 266*
Ccel_0438	YP_002504800.1	220927891	*Clostridium cellulolyticum H10*
Ddes_0382 (CODH)	YP_002478973.1	220903661	*Desulfovibrio desulfuricans subsp. desulfuricans str. ATCC 27774*
Ddes_0381 (CooC)	YP_002478972.1	220903660	*Desulfovibrio desulfuricans subsp. desulfuricans str. ATCC 27774*
Pcar_0057 (CODH)	*YP_355490.1*	*7791767*	*Pelobacter carbinolicus DSM 2380*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
Pcar_0058 (CooC)	*YP_355491.1*	*7791766*	*Pelobacter carbinolicus DSM*

			2380
Pcar_0058 (HypA)	*YP_355492.1*	*7791765*	*Pelobacter carbinolicus DSM 2380*
CooS (CODH)	*YP_001407343.1*	*154175407*	*Campilobacter curvus 525.92*

En algunos casos, genes que codifican hidrogenasa están localizados adyacentes a una CODH. En *Rhodospirillum rubrum*, las proteínas CODH/hidrogenasa codificadas forman un complejo de enzima unida a la membrana que ha sido indicado por ser un sitio en donde la energía, en la forma de un gradiente de protón es generada a partir de la conversión de CO y H_2O a CO_2 y H_2 (Fox *et al., J Bacteriol.* 178:6200-6208 (1996)). La CODH-I de *C. hidrogenoformans* y sus genes adyacentes ha sido propuesta para catalizar un papel funcional similar en base a su similitud al agrupamiento del gen CODH/hidrogenasa de *R. rubrum* (Wu *et al., PLoS Genet.* 1:e65 (2005)). La CODH-I de *C. hidrogenoformans* también es mostrada por exhibir actividades oxidación de CO y reducción de CO_2 intensas cuando se une a un electrodo (Parkin *et al., J Am.Chem.Soc.* 129:10328-10329 (2007)). La secuencia de proteínas de genes CODH e hidrogenasa ejemplares puede ser identificada por los siguientes números de acceso de GenBank.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
CODH-I (CooS-I)	YP_360644	78043418	*Carboxidotromus hidrogenoformans*
CooF	YP_360645	78044791	*Carboxidotromus hidrogenoformans*
HypA	YP_360646	78044340	*Carboxidotromus hidrogenoformans*
CooH	YP_360647	78043871	*Carboxidotromus hidrogenoformans*
CooU	YP_360648	78044023	*Carboxidotromus hidrogenoformans*
CooX	YP_360649	78043124	*Carboxidotromus*

			hidrogenoformans
CooL	YP_360650	78043938	*Carboxidotromus hidrogenoformans*
CooK	YP_360651	78044700	*Carboxidotromus hidrogenoformans*
CooM	YP_360652	78043942	*Carboxidotromus hidrogenoformans*
CooC	*YP_360654.1*	78043296	*Carboxidotromus hidrogenoformans*
CooA-1	YP_360655.1	78044021	*Carboxidotromus hidrogenoformans*
CooL	AAC45118	1515468	*Rhodospirillum rubrum*
CooX	AAC45119	1515469	*Rhodospirillum rubrum*
CooU	AAC45120	1515470	*Rhodospirillum rubrum*
CooH	AAC45121	1498746	*Rhodospirillum rubrum*
CooF	AAC45122	1498747	*Rhodospirillum rubrum*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
CODH (CooS)	AAC45123	1498748	*Rhodospirillum rubrum*
CooC	AAC45124	1498749	*Rhodospirillum rubrum*
CooT	AAC45125	1498750	*Rhodospirillum rubrum*
CooJ	AAC45126	1498751	*Rhodospirillum rubrum*

Nativos de *E. coli* y otras bacterias entéricas son genes múltiples que codifican hasta cuatro hidrogenasas (Sawers, G., *Antonie Van Leeuwenhoek* 66:57-88 (1994); Sawers *et al., J Bacteriol.* 164:1324-1331 (1985); Sawers y Boxer, *Eur.J Biochem.* 156:265-275 (1986); Sawers *et al., J Bacteriol.* 168:398-404 (1986)). Dada la multiplicidad de actividades enzimáticas, *E. coli* o otro organismo hospedero puede proporcionar suficiente actividad de hidrogenasa para dividir hidrógeno molecular entrante y reducir el aceptor correspondiente. *E. coli* tiene dos hidrogenasas de absorción, Hyd-1 y Hyd-2, codificadas por los agrupamientos del gen *hyaABCDEF* y *hybOABCDEFG*, respectivamente (Lukey *et al.,* How E. coli is equipped to oxidize hydrogen under different redox conditions, *J Biol Chem* published online Nov 16, 2009). Hyd-1 es tolerante al oxígeno, irreversible, y está

acoplada a reducción de quinona vía el citocromo *hyaC*. Hyd-2 es sensible a O_2, reversible, y transfiere electrones a la ferredoxina periplásmica *hybA* la cual, a su vez, reduce una quinona vía la proteína de membrana integral *hybB*. Las quinonas reducidas pueden servir como la fuente de electrones para fumarato reductasa la ramificación reductiva del ciclo TCA. Las ferredoxina reducidas pueden ser usadas por enzimas tal como NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasas para generar NADPH o NADH. Pueden alternativamente ser usadas como el donador de electrón para reacciones, tal como piruvato ferredoxina oxidorreductasa, AKG ferredoxina oxidorreductasa, y 5,10-metilen-H4folato reductasa.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
HyaA	AAC74057.1	1787206	*Escherichia coli*
HyaB	AAC74058.1	1787207	*Escherichia coli*
HyaC	AAC74059.1	1787208	*Escherichia coli*
HyaD	AAC74060.1	1787209	*Escherichia coli*
HyaE	AAC74061.1	1787210	*Escherichia coli*
HyaF	AAC74062.1	1787211	*Escherichia coli*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
HybO	AAC76033.1	1789371	*Escherichia coli*
HybA	AAC76032.1	1789370	*Escherichia coli*
HybB	AAC76031.1	2367183	*Escherichia coli*
HybC	AAC76030.1	1789368	*Escherichia coli*
HybD	AAC76029.1	1789367	*Escherichia coli*
HybE	AAC76028.1	1789366	*Escherichia coli*
HybF	AAC76027.1	1789365	*Escherichia coli*
HybG	AAC76026.1	1789364	*Escherichia coli*

Los sistemas hidrógeno-liasa de *E. coli* incluyen hidrogenasa 3, un complejo de enzima unido a la membrana usando ferredoxina como un aceptor, e hidrogenasa 4 que también usa un aceptor de ferredoxina. Las hidrogenasa 3 y 4 son codificadas por los agrupamientos del gen *hyc* y *hyf*, respectivamente. La hidrogenasa 3 se ha mostrado por ser una enzima reversible (Maeda *et al., Appl*

Microbiol Biotechnol 76(5):1035-42 (2007)). La actividad de hidrogenasa en *E. coli* es también dependiente de la expresión de los genes *hyp* cuyas proteínas correspondientes son involucradas en el montaje de la hidrogenasa formada en complejos (Jacobi *et al., Arch.Microbiol* 158:444-451 (1992); Rangarajan *et al., J. Bacteriol.* 190:1447-1458 (2008)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
HycA	NP_417205	16130632	*Escherichia coli*
HycB	NP_417204	16130631	*Escherichia coli*
HycC	NP_417203	16130630	*Escherichia coli*
HycD	NP_417202	16130629	*Escherichia coli*
HycE	NP_417201	16130628	*Escherichia coli*
HycF	NP_417200	16130627	*Escherichia coli*
HycG	NP_417199	16130626	*Escherichia coli*
HycH	NP_417198	16130625	*Escherichia coli*
HycI	NP_417197	16130624	*Escherichia coli*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
HyfA	NP_416976	90111444	*Escherichia coli*
HyfB	NP_416977	16130407	*Escherichia coli*
HyfC	NP_416978	90111445	*Escherichia coli*
HyfD	NP_416979	16130409	*Escherichia coli*
HyfE	NP_416980	16130410	*Escherichia coli*
HyfF	NP_416981	16130411	*Escherichia coli*
HyfG	NP_416982	16130412	*Escherichia coli*
HyfH	NP_416983	16130413	*Escherichia coli*
HyfI	NP_416984	16130414	*Escherichia coli*
HyfJ	NP_416985	90111446	*Escherichia coli*
HyfR	NP_416986	90111447	*Escherichia coli*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
HypA	NP_417206	16130633	*Escherichia coli*

HypB	NP_417207	16130634	*Escherichia coli*
HypC	NP_417208	16130635	*Escherichia coli*
HypD	NP_417209	16130636	*Escherichia coli*
HypE	NP_417210	226524740	*Escherichia coli*
HypF	NP_417192	16130619	*Escherichia coli*

Las hidrogenasas de *M. thermoacetica* son adecuadas para un hospedero que carece de suficiente actividad endógena de hidrogenasa. *M. thermoacetica* puede crecer con CO_2 como la fuente de carbono exclusiva indicando que los equivalentes de reducción son extraídos de H_2 para permitir la síntesis de acetil-CoA vía la trayectoria Wood-Ljungdahl (Drake, H. L., *J. Bacteriol.* 150:702-709 (1982); Drake y Daniel, *Res. Microbiol.* 155:869-883 (2004); Kellum y Drake, *J. Bacteriol.* 160:466-469 (1984)) (véase Figura 22). *M. thermoacetica* tiene homólogos para varios genes *hyp*, *hyc*, y *hyf* de *E. coli*. Las secuencias de proteínas codificas por estos genes son identificada por los siguientes números de acceso de GenBank.

Las proteínas en *M. thermoacetica* cuyos genes son homólogos a los genes *hyp* de *E. coli* se muestran abajo.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
Moth_2175	YP_431007	83590998	*Moorella thermoacetica*
Moth_2176	YP_431008	83590999	*Moorella thermoacetica*
Moth_2177	YP_431009	83591000	*Moorella thermoacetica*
Moth_2178	YP_431010	83591001	*Moorella thermoacetica*
Moth_2179	YP_431011	83591002	*Moorella thermoacetica*
Moth_2180	YP_431012	83591003	*Moorella thermoacetica*
Moth_2181	YP_431013	83591004	*Moorella thermoacetica*

Las proteínas en *M. thermoacetica* que son homólogas a las proteínas de hidrogenasa 3 y/o 4 de *E. coli* son listadas en la siguiente tabla.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
Moth_2182	YP_431014	83591005	*Moorella thermoacetica*
Moth_2183	YP_431015	83591006	*Moorella thermoacetica*
Moth_2184	YP_431016	83591007	*Moorella thermoacetica*
Moth_2185	YP_431017	83591008	*Moorella thermoacetica*
Moth_2186	YP_431018	83591009	*Moorella thermoacetica*
Moth_2187	YP_431019	83591010	*Moorella thermoacetica*
Moth_2188	YP_431020	83591011	*Moorella thermoacetica*
Moth_2189	YP_431021	83591012	*Moorella thermoacetica*
Moth_2190	YP_431022	83591013	*Moorella thermoacetica*
Moth_2191	YP_431023	83591014	*Moorella thermoacetica*
Moth_2192	YP_431024	83591015	*Moorella thermoacetica*

Además, varios agrupamientos del gen que codifica la funcionalidad de hidrogenasa están presentes en *M. thermoacetica* y sus correspondientes secuencias de proteína se proporcionan a continuación.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
Moth_0439	YP_429313	83589304	*Moorella thermoacetica*
Moth_0440	YP_429314	83589305	*Moorella*

			thermoacetica
Moth_0441	YP_429315	83589306	*Moorella thermoacetica*
Moth_0442	YP_429316	83589307	*Moorella thermoacetica*
Moth_0809	YP_429670	83589661	*Moorella thermoacetica*
Moth_0810	YP_429671	83589662	*Moorella thermoacetica*
Moth_0811	YP_429672	83589663	*Moorella thermoacetica*
Moth_0812	YP_429673	83589664	*Moorella thermoacetica*
Moth_0814	YP_429674	83589665	*Moorella thermoacetica*
Moth_0815	YP_429675	83589666	*Moorella thermoacetica*
Moth_0816	YP_429676	83589667	*Moorella thermoacetica*
Moth_1193	YP_430050	83590041	*Moorella thermoacetica*
Moth_1194	YP_430051	83590042	*Moorella thermoacetica*
Moth_1195	YP_430052	83590043	*Moorella thermoacetica*
Moth_1196	YP_430053	83590044	*Moorella thermoacetica*
Moth_1717	YP_430562	83590553	*Moorella thermoacetica*
Moth_1718	YP_430563	83590554	*Moorella thermoacetica*
Moth_1719	YP_430564	83590555	*Moorella thermoacetica*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo

Moth_1883	YP_430726	83590717	*Moorella thermoacetica*
Moth_1884	YP_430727	83590718	*Moorella thermoacetica*
Moth_1885	YP_430728	83590719	*Moorella thermoacetica*
Moth_1886	YP_430729	83590720	*Moorella thermoacetica*
Moth_1887	YP_430730	83590721	*Moorella thermoacetica*
Moth_1888	YP_430731	83590722	*Moorella thermoacetica*
Moth_1452	YP_430305	83590296	*Moorella thermoacetica*
Moth_1453	YP_430306	83590297	*Moorella thermoacetica*
Moth_1454	YP_430307	83590298	*Moorella thermoacetica*

La H16 de *Ralstonia eutropha* usa hidrógeno como una fuente de energía con oxígeno como un aceptor de electrón terminal. Está unida a la absorción de membrana [NiFe]-hidrogenasa es una hidrogenasa "tolerante O2" (Cracknell, et al. Proc Nat Acad Sci, 106(49) 20681-20686 (2009)) que está orientada periplásmicamente y conectada a la cadena respiratoria vía un citocromo tipo b (Schink y Schlegel, *Biochim. Biophys. Acta*, 567, 315-324 (1979); Bernhard *et al., Eur. J. Biochem.* 248, 179–186 (1997)). *R. eutropha* también contiene una hidrogenasa soluble tolerante a O_2 codificada por el operón *Hox*, el cual es NAD+ citoplásmica y directamente reducida en el consumo de hidrógeno (Schneider y Schlegel, *Biochim. Biophys. Acta* 452, 66–80 (1976); Burgdorf, *J. Bact.* 187(9) 3122-3132(2005)). Las enzimas de hidrogenasa solubles están adicionalmente presentes en otros organismos variados que incluyen *Geobacter sulfurreducirns* (Coppi, *Microbiology* 151, 1239–1254 (2005)), *Synechocystis* str. PCC 6803 (Germer, *J. Biol. Chem.*, 284(52), 36462–36472 (2009)), y *Thiocapsa roseopersicina* (Rakhely, *Appl. Environ. Microbiol.* 70(2) 722–728 (2004)). La enzima de *Synechocystis* es capaz de generar NADPH a partir de hidrógeno. La

sobreexpresión de tanto el operón *Hox* de *Synechocystis* str. PCC 6803 como los genes accesorios codificados por el operón *Hyp* de *Nostoc* sp. PCC 7120 lleva a actividad de hidrogenasa incrementada comparada a la expresión de los genes *Hox* solos (Germer, *J. Biol. Chem.* 284(52), 36462–36472 (2009)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
HoxF	NP_942727.1	38637753	*Ralstonia eutropha H16*
HoxU	NP_942728.1	38637754	*Ralstonia eutropha H16*
Hoxi	NP_942729.1	38637755	*Ralstonia eutropha H16*
HoxH	NP_942730.1	38637756	*Ralstonia eutropha H16*
HoxW	NP_942731.1	38637757	*Ralstonia eutropha H16*
HoxI	NP_942732.1	38637758	*Ralstonia eutropha H16*
HoxE	NP_953767.1	*39997816*	*Geobacter sulfurreducirns*
HoxF	NP_953766.1	*39997815*	*Geobacter sulfurreducirns*
HoxU	NP_953765.1	*39997814*	*Geobacter sulfurreducirns*
Hoxi	NP_953764.1	*39997813*	*Geobacter sulfurreducirns*
HoxH	NP_953763.1	*39997812*	*Geobacter sulfurreducirns*
GSU2717	NP_953762.1	*39997811*	*Geobacter sulfurreducirns*
HoxE	NP_441418.1	16330690	*Synechocystis* str. PCC 6803
HoxF	NP_441417.1	16330689	*Synechocystis* str. PCC

			6803
Función desconocida	NP_441416.1	16330688	*Synechocystis* str. PCC 6803
HoxU	NP_441415.1	16330687	*Synechocystis* str. PCC 6803
Hoxi	NP_441414.1	16330686	*Synechocystis* str. PCC 6803
Función desconocida	NP_441413.1	16330685	*Synechocystis* str. PCC 6803
Función desconocida	NP_441412.1	16330684	*Synechocystis* str. PCC 6803
HoxH	NP_441411.1	16330683	*Synechocystis* str. PCC 6803
HypF	NP_484737.1	17228189	*Nostoc* sp. PCC 7120
HypC	NP_484738.1	17228190	*Nostoc* sp. PCC 7120
HypD	NP_484739.1	17228191	*Nostoc* sp. PCC 7120
Función desconocida	NP_484740.1	17228192	*Nostoc* sp. PCC 7120
HypE	NP_484741.1	17228193	*Nostoc* sp. PCC 7120
HypA	NP_484742.1	17228194	*Nostoc* sp. PCC 7120
HypB	NP_484743.1	17228195	*Nostoc* sp. PCC 7120

Hox1E	AAP50519.1	37787351	*Thiocapsa roseopersicina*
Hox1F	AAP50520.1	37787352	*Thiocapsa roseopersicina*
Hox1U	AAP50521.1	37787353	*Thiocapsa roseopersicina*
Hox1Y	AAP50522.1	37787354	*Thiocapsa roseopersicina*
Hox1H	AAP50523.1	37787355	*Thiocapsa roseopersicina*

Las enzimas variadas y los genes correspondientes usados para fijar dióxido de carbono a cualquiera de piruvato o fosfoenolpiruvato para formar el

ciclo TCA intermediario, oxaloacetato o malato se describen a continuación.

La carboxilación de fosfoenolpiruvato a oxaloacetato es catalizada por fosfoenolpiruvato carboxilasa. Las enzimas PEP carboxilasa ejemplares son codificadas por *ppc* en *E. coli* (Kai *et al., Arch. Biochem. Biophys.* 414:170-179 (2003), *ppcA* en *Metilobacterium extorquens AM1* (Arps *et al., J. Bacteriol.* 175:3776-3783 (1993), y *ppc* en *Corynebacterium glutamicum* (Eikmanns *et al., Mol. Gen. Genet.* 218:330-339 (1989).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
Ppc	NP_418391	16131794	*Escherichia coli*
ppcA	AAB58883	28572162	*Metilobacterium extorquens*
Ppc	ABB53270	80973080	*Corynebacterium glutamicum*

Una enzima alterna para convertir fosfoenolpiruvato a oxaloacetato es PEP carboxicinasa, la cual simultáneamente forma un ATP mientras carboxila PEP. En la mayoría de los organismos, la PEP carboxicinasa sirve como una función gluconeogénica y convierte oxaloacetato a PEP en el consumo de un ATP. *S. cerevisiae* es uno de estos organismos cuyas carboxicinasa PEP nativa, *PCK1*, sirve como un papel gluconeogénico (Valdes-Hevia *et al., FEBS Lett.* 258:313-316 (1989). *E. coli* es otro de estos organismos, con el papel de PEP carboxicinasa en la producción de xaloacetato se cree que es menor cuando se compara a la PEP carboxilasa, la cual no forma ATP, posiblemente debido al mayor K_m para bicarbonato de PEP carboxicinasa (Kim *et al., Appl. Environ. Microbiol.* 70:1238-1241 (2004)). No obstante, la actividad de la PEP carboxicinasa nativa *E. coli* de PEP hacia el oxaloacetato ha sido recientemente demostrada en mutantes *ppc* de *E. coli* K-12 (Kwon *et al., J. Microbiol. Biotechnol.* 16:1448-1452 (2006)). Estas cepas no exhiben defectos de crecimiento y tienen producción incrementada de succinato en concentraciones altas de $NaHCO_3$. Las cepas mutantes de *E. coli* pueden adoptar Pck como la enzima que fija CO2 dominante después de evolución adaptativa (Zhang et al. 2009). En algunos organismos, particularmente bacterias de la panza, PEP carboxicinasa es bastante eficiente en la producción de oxaloacetato de PEP y generar ATP. Ejemplos de genes PEP carbocinasa que han sido clonados en *E. coli* incluyen aquellos de *Mannheimia succiniciproducens* (Lee *et al., Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7:95-99 (2002)), *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (Laivenieks *et al., Appl. Environ. Microbiol.* 63:2273-2280 (1997), y *Actinobacillus succinogenes* (Kim et al. *supra*).

La enzima codificada PEP carboxicinasa por *Haemophilus influenza* es efectiva en la formación de oxaloacetato de PEP.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
PCK1	NP_013023	6322950	*Saccharomyces cerevisiae*
pck	NP_417862.1	16131280	*Escherichia coli*
pckA	YP_089485.1	52426348	*Mannheimia* succiniciproducens
pckA	O09460.1	3122621	*Anaerobiospirillum* succiniciproducens
pckA	Q6W6X5	75440571	*Actinobacillus succinogenes*
pckA	P43923.1	1172573	*Haemophilus influenza*

La piruvato carboxilasa (EC 6.4.1.1) directamente convierte piruvato a oxaloacetato al precio de una ATP. Las enzimas de piruvato carboxilasa son codificadas por *PYC1* (Walker *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176:1210-1217 (1991) y *PYC2* (Walker *et al., supra*) en *Saccharomyces cerevisiae*, y *pyc* en *Mycobacterium smegmatis* (Mukhopadhyay y Purwantini, *Biochim. Biophys. Acta* 1475:191-206 (2000)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
PYC1	NP_011453	6321376	*Saccharomyces cerevisiae*
PYC2	NP_009777	6319695	*Saccharomyces cerevisiae*
Pyc	YP_890857.1	118470447	*Mycobacterium smegmatis*

La enzima málica puede ser aplicada para convertir CO_2 y piruvato a malato en el consumo de un equivalente de reducción. Las enzimas málicas para este propósito pueden incluir, sin limitación, enzima málica (dependiente de NAD) y enzima málica (dependiente de NADP). Por ejemplo, una de las enzima málicas *E. coli* (Takeo, *J. Biochem.* 66:379-387 (1969)) o una enzima similar con mayor actividad puede ser expresada para permitir la conversión de piruvato y CO_2 a malato. Fijando carbono a piruvato opuesto a PEP, la enzima málica permite la unión de fosfato de alta energía de PEP para ser conservado por piruvato cinasa con ello ATP es generada en la formación de piruvato o por el sistema fosfotransferasa para transporte de glucosa. A pesar que enzima málica es

típicamente considerada para operar en la dirección de formación piruvato a partir de malato, la sobreexpresión de la Enzima dependiente de NAD, codificada por maeA, ha sido demostrada por el incremento de producción de succinato en *E. coli* mientras se restaura el fenotipo Δpfl-ΔldhA letal bajo condiciones anaeróbicas operando en la dirección que fija carbono (Stols y Donnelly, *Appl. Environ. Microbiol.* 63(7) 2695-2701 (1997)). Una observación similar se hace en la sobreexpresión de la enzima málica de *Ascaris suum* in *E. coli* (Stols *et al., Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65(1), 153-158 (1997)). La segunda enzima málica *E. coli*, codificada por *maeB*, es Dependiente de NADP y también decarboxila oxaloacetato y otro alfa-ceto ácidos (Iwakura *et al., J. Biochem.* 85(5):1355-65 (1979)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
maeA	NP_415996	90111281	*Escherichia coli*
maeB	NP_416958	16130388	*Escherichia coli*
NAD-ME	P27443	126732	*Ascaris suum*

Las enzimas usadas para convertir oxaloacetato (formado de, por ejemplo, PEP carboxilasa, PEP carboxicinasa, o piruvato carboxilasa) o malato (formado de, por ejemplo, enzima málica o malato deshidrogenasa) a succinil-CoA vía la ramificación reductiva del ciclo TCA son malato deshidrogenasa, fumarato deshidratasa (fumarasa), fumarato reductasa, y succinil-CoA transferasa. Los genes para cada una de las enzimas se describen en la presente a continuación.

Enzimas, genes y métodos para trayectorias diseñadas por ingeniería de succinil-CoA para varios productos en un microorganismo son ahora conocidos en la técnica. Los equivalentes de reducción adicionales obtenidos de CO y/o H_2, como se describe en la presente, mejora los rendimientos de 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno cuando se utiliza materia prima a base de carbohidrato. Por ejemplo, 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno puede ser producido de succinil-CoA vía trayectorias ejemplificadas en la Figura 20. Enzimas ejemplares para la conversión de succinil-CoA a 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol, o 1,3-butadieno incluyen succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa, 3-oxoadipil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, 3-oxoadipato deshidrogenasa, 2-fumarilacetato descarboxilasa, 3-oxopent-4-enoato reductasa, 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa, 3-oxoadipil-CoA reductasa, 3-hidroxiadipil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, 3-hidroxiadipato deshidrogenasa, 3-

hidroxihex-4-enedioato descarboxilasa, 3-oxoadipato reductasa, 2-fumarilacetato reductasa, 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa, 2,4-pentadienoato descarboxilasa.

Enzimas, genes y métodos para trayectorias diseñadas por ingeniería de intermediarios de glicólisis para varios productos en un microorganismo se conocen en la técnica. Los equivalentes de reducción adicionales obtenidos de CO y H_2, como se describe, mejora los rendimientos de todos estos productos en carbohidratos.

EJEMPLO X

Métodos para Manipulación de CO y Cultivos anaeróbicos

Este ejemplo describe métodos usados en la manipulación de CO y cultivos anaeróbicos.

A. Manipulación de CO cantidades pequeñas para ensayos y cultivos pequeños. CO es un gas inodoro, incoloro y no tiene sabor que es un veneno. Por lo tanto, cultivos y ensayos que utilizan CO requieren manipulación especial. Varios ensayos, que incluyen oxidación de CO, síntesis de acetil-CoA, concentración de CO usan mioglobina, y tolerancia/utilización de CO en cultivos de lote pequeños, pedidos para cantidades pequeñas del gas CO que son dispersadas y manipuladas dentro de una campana extractora de gases. Los ensayos bioquímicos pedidos para saturación de cantidades muy pequeñas (<2 mL) del medio de ensayo bioquímico o amortiguador con CO y entonces se realiza el ensayo. Todas las etapas de manipulación de CO se realizan en una campana extractora de gases con la banda fijada en la longitud apropiada y el extractor activado; el CO se dispersa de un cilindro de gas comprimido y el regulador se conecta a una línea Schlenk. Lo último asegura que concentraciones iguales de CO se dispersen en cada uno de las cubetas o viales posibles. La línea Schlenk se establece que contiene un depurador de oxígeno en el lado de entrada y un burbujeador de liberación de presión de aceite y una ventilación del otro lado. Las cubetas de ensayo ambas son anaeróbicas y contienen CO. Por lo tanto, las cubetas de ensayo son herméticamente selladas con un tapón de caucho y se agregan los reactivos o se remueven usando agujas y jeringas herméticas a los gases. En segundo lugar, se hacen crecer pequeños cultivos (~ 50 ml) con saturación de CO en botellas de suero herméticamente tapadas. Como con los ensayos bioquímicos, los cultivos microbianos saturados con CO son equilibrados en la campana extractora de gases usando el sistema de línea Schlenk. Ambos

ensayos bioquímicos y los cultivos microbianos están en contenedores sellados, portátiles y en volúmenes pequeños elaborados para manipulación segura fuera de la campana extractora de gases. El tanque de CO comprimido está adyacente a la campana extractora de gases.

Típicamente, se usa una línea Schlenk para dispersar CO a las cubetas, en cada ventilación. Los tapones de caucho en las cubetas son perforados con agujas para jeringa desechables calibre 19 ó 20 y son ventilados con las mismas. Un burbujeador de aceite se usa con un tanque de CO y depurador de oxígeno. Las cubetas del espectrofotómetro de vidrio o cuarzo tienen un agujero circular en la parte superior en el cual se fija una manga de tapón Kontes, Sz7 774250-0007. La unidad detectora de CO se coloca cerca a la campana extractora de gases.

B. Manipulación de CO en grandes cantidades alimentado a cultivos de gran escala. Cultivos de fermentación son alimentados con cualquiera de CO o una mezcla de CO y H_2 para estimular syngas como una materia prima en producción de fermentación. Por lo tanto, cantidades de células que varían de 1 litro a varios litros pueden incluir la adición de gas CO para incrementar la concentración disuelta de CO en el medio. En estas circunstancias, cantidades administradas bastante grandes y continuas de CO son agregadas a los cultivos. A puntos diferentes, los cultivos son recolectados o las muestras removidas. Alternativamente, las células son recolectadas con un centrifugador de flujo continuo integrado que es parte del fermentador.

El proceso de fermentación se lleva a cabo bajo condiciones anaeróbicas. El algunos casos, es antieconómico para bombear oxígeno o aire en los fermentadores para asegurar adecuada saturación de oxígeno para proporcionar un ambiente respirable. Además, la energía de reducción generada durante la fermentación anaeróbica puede ser necesaria en la formación del producto que en la respiración. Además, muchas de las enzimas para varias trayectorias son sensibles al oxígeno variando de grado. Los acetógenos clásicos tales como *M. thermoacetica* son anaeróbicos obligados y las enzimas en la trayectoria Wood-Ljungdahl son bastantes sensibles a la inactivación irreversible por oxígeno molecular. Mientras estos son octógenos tolerantes al oxígeno, el repertorio de enzimas en la trayectoria Wood-Ljungdhal puede ser compatible en la presencia de oxígeno porque muchos son metalo-enzimas, componentes clave son ferrodoxina, y la regulación puede desviar el metabolismo lejos de la

trayectoria Wood-Ljundahl para maximisar la adquisición de energía. Al mismo tiempo, las células en el cultivo actúan como depuradores de oxígeno que moderan la necesidad de medidas extremas en la presencia de crecimiento celular extenso.

C. Cámara y condiciones anaeróbicas. Cámaras anaeróbicas ejemplares están comercialmente disponibles (véase por ejemplo, Vacuum Atmospheres Company, Hawthorne CA; MBraun, Newburyport MA). Las condiciones incluyen una concentración de O_2 de 1 ppm o menos y 1 atm pura de N_2. En un ejemplo, se usan 3 depuradores de oxígeno/regeneradores de catalizador, y la cámara incluye un electrodo O_2 (tal como Teledyne; City of Industry CA). Casi todos los puntos y reactivos son ciclados cuatro veces en la burbuja de aire de la cámara antes de abrir la puerta de la cámara interior. Los reactivos con un volumen de >5 ml son rociados con N_2 puro antes de ser introducidos en la cámara. Se cambian guantes dos veces/año y los contenedores del catalizador son regenerados periódicamente cuando la cámara exhibe respuesta cada vez más lenta para cambiar los niveles de oxígeno. La presión de la cámara es controlada a través de válvulas de unidireccionales activadas por solenoides. Esta característica permite ajustar la presión de la cámara a un nivel mayor que el que la rodea para permitir la transferencia de tubos muy pequeños a través de la válvula de purga.

Los niveles de O_2 logrados en las cámaras anaeróbicas que son consistentemente muy bajas y son necesarias para condiciones anaeróbicas muy sensibles al oxígeno. Sin embargo, el crecimiento y manipulación de las células usualmente no requiere esta precaución. En una configuración de cámara anaeróbica alternativa, se pueden usar platino o paladio como un catalizador que requiere algo de gas hidrógeno en la mezcla. En lugar de usar válvulas de solenoide, la liberación de presión se puede controlar por un burbujeador. En lugar de usar el monitoreo de O_2 a base de un instrumento, en su lugar se pueden usar tiras de prueba.

D. Microbiología anaeróbica. Se manipulan cultivos pequeños como se describe anteriormente para manipulación de Co. En particular, se fijan botellas de suero o del medio con tapones de caucho gruesos y se emplean engarces de aluminio para sellar la botella. El medio, tal como Caldo Terrefic, se elabora de una manera convencional y se dispersa en una botella de suero de tamaño

apropiado. Las botellas son rociadas con nitrógeno por ~30 min para burbujeo moderado. Esto remueve la mayoría del oxígeno del medio y, después de esta etapa, cada botella es tapada con un tapón de caucho (tal como tapones de septo Bellco 200 mm; Bellco, Vineland, NJ) y selladas con engarce (Bellco 20 mm). Después las botellas con el medio se someten a autoclave usando un ciclo de escape lento (líquido). Al menos algunas veces una aguja puede ser empujada a través del tapón para proporcionar escape durante el proceso de autoclave; la aguja necesita ser removida inmediatamente en la remoción de la autoclave. El medio estéril tiene los restos de los componentes del medio, por ejemplo, amortiguador o antibióticos, agregados vía jeringa y aguja. Antes de la adición de agentes de reducción, las botellas son equilibradas por 30 - 60 minutos con nitrógeno (o CO dependiendo del uso). Se agrega un agente de reducción tal como sulfuro de sodio 100 x 150 mM, cisteína-HCl 200 mM. Esto se hace pesando el sulfuro de sodio en un vaso seco y la cisteína en una botella de suero, llevando ambos a la cámara anaeróbica, disolviendo el sulfuro de sodio en agua anaeróbica, entonces agregar esto a la cisteína en la botella de suero. La botella se tapa inmediatamente ya que la solución de sulfuro de sodio genera gas hidrógeno en contacto con la cisteína. Cuando se inyecta en el cultivo, se usa un filtro de jeringa para esterilizar la solución. Se agregan otros componentes a través de las ajugas de jeringa, tal como B12 (cianocobalamina 10 μM), cloruro de níquel ($NiCl_2$, concentración final 20 microM de una solución base 40 mM hecha en agua anaeróbica en la cámara y esterilizada por autoclave o usando un filtro de jeringa en la inyección en el cultivo), y sulfato de amonio ferroso (concentración final necesaria es 100 μM - hecha como una solución base 100-1000x en agua anaeróbica en la cámara y esterilizada por autoclave o usando un filtro de jeringa en inyección en el cultivo). Para facilitar el crecimiento más rápido bajo condiciones anaeróbicas, las botellas de 1 litro se inoculan con 50 ml de un precultivo de crecimiento anaeróbicamente. Se lleva a cabo la inducción del promotor pA1-lacO1 en los vectores se realiza por adición de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) a una concentración final de 0.2 mM por aproximadamente 3 horas.

Se pueden hacer crecer medios de cultivo extensos en botellas grandes usando adición de gas continua mientras se burbujea. Se coloca un tapón de caucho con un burbujeador de metal después de la adición del medio y se rocía con nitrógeno por 30 minutos o mucho antes de la formación del resto de la botellas. Cada botella se coloca junto de forma que un filtro estéril pueda

esterilizar el gas burbujeado en y las mangueras en las botellas se compriman con abrazaderas C pequeñas. El medio y las células se agitan con barras agitadoras magnéticas. Una vez que todos los componentes del medio se agregan, las botellas son incubadas en una incubadora en un cuarto ventilado, pero con esparcimiento de nitrógeno continuo en las botellas.

EJEMPLO XI

Ensayo de oxidación de CO (CODH)

Este ejemplo describes métodos de ensayo para la medición de la oxidación de CO (Deshidrogenasa CO; CODH).

Se clona el operón CODH/ACS de 7 genes de *Moorella thermoacetica* en vectores de expresión de *E. coli*. Se clona el fragmento de ADN ~10 kbp intacto, y si son similares al de algunos de los genes en esta región se expresan a partir de sus propios promotores endógenos y todos contienen sitios de enlace ribosomal endógeno. Estos clones son sometidos a ensayo por oxidación de CO, usando un ensayo que cuantitativamente mide la actividad de CODH. Se usa antisuero para los productos del gen de *M. thermoacetica* por manchados Western para estimar la actividad específica. *M. thermoacetica* es Gram positiva, y los elementos del sitio de enlace ribosoma se espera que trabajen bien en *E. coli*. Esta actividad, descrita posteriormente en mayor detalle, se estima sea - ~1/50avo de la actividad específica de *M. thermoacetica*. Es posible que actividad CODH de células de *E. coli* recombinantes pueda ser limitada por el hecho que las enzimas de *M. thermoacetica* tiene temperatura óptima de aproximadamente 55°C. Por lo tanto, una trayectoria CODH/ACS mesofílica puede ser ventajosa tal como la cercana en relación de *Moorella* que es mesofílica y tiene un operón CODH/ACS aparentemente intacto y una trayectoria Wood-Ljungdahl, *Desulfitobacterium hafniense*. Acetógenos como potenciales organismo hospederos incluyen, pero no se limitan a, *Rhodospirillum rubrum, Moorella thermoacetica y Desulfitobacterium hafniense.*

La oxidación de CO es tanto el más sensible como robusto de los ensayos CODH/ACS. Es probable que un sistema usando syngas a base de *E. coli* puede al final necesitar ser aproximadamente sistemas anaeróbicos como *Clostridial* (es decir, *Moorella*), especialmente para actividad máxima. El mejoramiento en CODH puede ser posible pero puede al final ser limitada por la solubilidad de gas CO en agua.

Inicialmente, cada uno de los genes se clona individualmente en

vectores de expresión. Las unidades de expresión combinadas para complejos de subunidades/1 múltiples. Se determina la expresión en *E. coli* en el nivel de proteína. Se elaboran tanto los operones CODH/ACS de *M. thermoacetica* combinados como los clones de expresión individuales.

El ensayo de oxidación CO. Este ensayo es uno de los ensayos simples, seguros y más versátiles de actividades enzimáticas dentro de la trayectoria Wood-Ljungdahl y pruebas CODH (Seravalli *et al., Biochemistry* 43:3944-3955 (2004)). Una actividad típica de CODH *M. thermoacetica* de actividad específica es 500 U a 55°C o ~60U a 25°C. Este ensayo emplea reducción de metil viológeno en la presencia de CO. Esto es medido a 578 nm en cubetas de vidrio, anaeróbicas, tapadas.

En mayor detalle, las cubetas de vidrio tapadas con caucho son preparadas después de lavar primero la cubeta cuatro veces en agua desionizada y una vez con acetona. Una cantidad pequeña de grasa a vacío se unta en la parte superior del empaque de caucho. La cubeta se gasifica con CO, se seca por 10 min con una aguja de 22 Ga. más una aguja de escape. Un volumen de 0.98 ml/L de amortiguador de reacción (Hepes 50 mM, pH 8.5, ditiotreitol (DTT) 2 mM se agrega usando una aguja 22Ga., con aguja de escape, y CO al 100%. La solución base de metil viológeno (CH_3 viológeno) fue 1M en agua. Cada ensayo usa 20 microlitros para una concentración final de 20 mM. Cuando se agrega metil viológeno, se usa una aguja de 18 Ga (parcial) como una chaqueta para facilitar el uso de una jeringa Hamilton para retirar el CH_3 viológeno. Se retiraron y desecharon 4-5 alícuotas por lavado y la jeringa equilibra el gas. Se agrega una cantidad pequeña de ditionito de sodio (base 0.1 M) cuando se constituye el CH_3 viológeno base para ligeramente reducir el CH_3 viológeno. La temperatura es equilibrada a 55°C en un espectrómetro Olis calentado (Bogart GA). Una reacción blanco (CH_3 viológeno + amortiguador) primero se corre para medir la proporción base de reducción CH_3 viológeno. Extractos celulares crudos de *E. coli* de ACS90 y ACS91 (operón CODH-ACS de *M. thermoacetica* con y sin, respectivamente, el primer *cooC*). 10 microlitros de extracto se agregaron de una vez, mezclaron y ensayaron. El CH_3 viológeno reducido cambió a púrpura. Los resultaos d un ensayo se muestran en la Tala I.

Tabla I. Extracto Crudo de Actividades de Oxidación de CO

ACS90	7.7 mg/ml	ACS91	11.8 mg/ml
Mta98	9.8 mg/ml	Mta99	11.2 mg/ml

Extracto	Vol	OD/	U/ml	U/mg
ACS90	10 microlitros	0.073	0.376	0.049
ACS91	10 microlitros	0.096	0.494	0.042
Mta99	10 microlitros	0.0031	0.016	0.0014
ACS90	10 microlitros	0.099	0.51	0.066
Mta99	25 microlitros	0.012	0.025	0.0022
ACS91	25 microlitros	0.215	0.443	0.037
Mta98	25 microlitros	0.019	0.039	0.004
ACS91	10 microlitros	0.129	0.66	0.053

Promedios	0.057 U/mg
ACS90	0.042 U/mg
ACS91	0.0018 U/mg
Mta99	

Mta98/Mta99 son cepas de *E. coli* MG1655 que expresan genes de metiltransferasa de metanol de *M. thermoacetia* y, por lo tanto, son controles negativos para las cepas ACS90 ACS91 de *E. coli* que contienen operones CDOH de *M. thermoacetica* CODH.

Si ~ 1% de la proteína celular es CODH, entonces estas figuras podrían ser aproximadamente 100X menos que la actividad de 500 U/mg de CODH de *M. thermoacetica* pura. Los estimados actuales asados en manchados Western son 0.5% de la proteína celular, de manera que la actividad es aproximadamente 50X menor que para CODH de *M. thermoacetica*. No obstante, este experimento demuestra la actividad de oxidación de CO en *E. coli* recombinante con una cantidad mucho menor en los controles negativos. La cantidad mínima de oxidación de CO (reducción de CH_3 viológeno) vista en los controles negativos indica que *E. coli* podría tener una capacidad limitada para reducir CH_3 viológeno.

Para estimar las concentraciones finales de proteínas de CODH y Mtr, se realizaron análisis de SDS-PAGE seguido por manchado Western en los mismos extractos celulares usados en la oxidación de CO, ACS, metiltransferasa, y ensayos de Fe-S corrinoides. Los antisueros usados fueron policlonales a proteínas CODH-ACS y Mtr de *M. thermoacetica* purificada y se visualizaron usando un anticuerpo secundario de cabra-anti-conejo ligado a fosfatasa alcalina.

Se realizaron manchados Western y los resultados se muestran en la Figura 24. Las cantidades de CODH en ACS90 y ACS91 se estimaron a 50 ng por comparación en las líneas de control. Las expresiones de los genes del operón de CODH-ACS que incluyen 2 subunidades de CODH y la metiltransferasa se confirmaron vía análisis de manchado Western. Por lo tanto, las células de *E. coli* recombinante expresan componentes múltiples de un operón del gen 7. Además, tanto la metiltransferasa como la proteína de azufre e hierro corrinoide fueron activas en las mismas células recombinantes de *E. coli*. Estas proteínas son parte del mismo operón clonado en las mismas células.

Los ensayos de oxidación CO se repitieron usando extractos de células de *Moorella thermoacetica* para los controles positivos. Aunque la actividad de CODH en ACS90 y ACS91 de *E. coli* fue medible, fue aproximadamente 130 – 150 X inferior que el control de *M. thermoacetica*. Los resultados del ensayo se muestran en la Figura 25. Brevemente, las células (*M. thermoacetica* o *E. coli* con el operón CODH/ACS; ACS90 o ACS91 o vector vacío: pZA33S) se hicieron crecer y los extractos se prepararon como se describe anteriormente. Los ensayos se realizaron como se describe anteriormente a 55°C a varios tiempos en el día que se prepararon los extractos. La reducción de metilviológeno se siguió a 578 nm durante un curso de tiempo de 120 segundos.

Estos resultados describen los ensayos y resultados de la oxidación de CO (CODH). Las células recombinantes de *E. coli* expresan actividad de oxidación de CO como se mide por el ensayo de reducción de metil viológeno.

EJEMPLO XII

Experimento de Tolerancia a CO de *E. coli* y Ensayo de Concentración de CO (ensayo de mioglobina)

Este ejemplo describe la tolerancia de *E. coli* para altas concentraciones de CO.

Para probar si o no *E. coli* puede crecer anaeróbicamente en la presencia de cantidades de saturación de CO, los cultivos se establecieron en botellas de suero de 120 ml con 50 ml de medio de Caldo Terrific (más solución de reducción, $NiCl_2$, $Fe(II)NH_4SO_4$, cianocobalamina, IPTG, y cloranfenicol) como se describe anteriormente para microbiología anaeróbica en volúmenes pequeños. Una mitad de estas botellas se equilibraron con gas de nitrógeno por 30 minutos y una mitad se equilibró con gas de CO por 30 minutos. Se usó un vector vacío (pZA33) como un control, y cultivos que contiene el vector vacío pZA33 así como

también tanto ACS90 como ACS91 se probaron con tanto N_2 como CO. Todas se inocularon y se hicieron crecer por 36 hrs con sacudimiento (250 rpm) a 37°C. Al final del periodo de 36 horas, la examinación de los matraces mostró altas cantidades de crecimiento en todos. El volumen del crecimiento observado ocurrió durante la noche con un retardo largo.

Dado que todos los cultivos parecen crecer bien en la presencia de CO, se confirmaron las concentraciones finales de CO. Esto se realizó usando un ensayo del cambio espectral de mioglobina después de la exposición a CO. La mioglobina reducida con ditionita de sodio tiene una absorbancia pico a 435 nm; este pico se cambió a 423 nm con CO. Debido a la baja longitud de onda y necesidad de registrar un espectro completo de 300 nm hacia arriba, deben ser usados con cubetas de cuarzo. La concentración de CO es medida contra una curva estándar y depende de las constantes de Ley de Henry para CO de máxima solubilidad en agua = 970 micromolares a 20°C y 1 atm.

Para la prueba de mioglobina de concentración de CO, se lavaron cubetas 10X con agua, 1X con acetona, y después se taparon como con el ensayo CODH. Se sopló N_2 en las cubetas por ~10 min. Se agregó un volumen de 1 ml de amortiguador anaeróbico (HEPES, pH 8.0, 2mM de DTT) al blanco (no equilibrado con CO) con una jeringa Hamilton. Se agregaron un volumen de 10 microlitros de mioglobina (~1 mM—puede ser variado, solo necesita una cantidad bastante grande) y 1 microlitro de ditionita (20 mM de solución base). Se hace una curva estándar de CO usando amortiguador saturado de CO agregado a incrementos de 1 microlitro. Se registró el cambio y peso máximos para cada incremento. Los cultivos probados fueron pZA33/CO, ACS90/CO, y ACS91/CO. Cada uno de estos se agregó en incrementos de 1 microlitro a la misma cubeta. A la mitad del experimento una segunda cubeta se ajustó y usó. Los resultados se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Concentraciones de Monóxido de Carbono 36 hrs.

Cepa y Condiciones de Crecimiento	**Concentración Final de CO (micromolar)**
pZA33-CO	930
ACS90-CO	638
	494

	734
	883
prom.	687
SD	164
ACS91-CO	728
	812
	760
	611
prom.	728
SD	85

Los resultados mostrados en la Tabla II indican que los cultivos crecen si se cultiva o no la cepa en la presencia o no de CO. Estos resultados indican que *E. coli* puede tolerar la exposición a CO bajo condiciones anaeróbicas y que células de *E. coli* que expresan el operón CODH-ACS pueden metabolizar algo del CO.

Estos resultados demuestran que células de *E. coli*, si expresan o no CODH/ACS, fueron capaces de crecer en la presencia de cantidades de saturación de CO. Además, estas crecen igual también como los controles en nitrógeno en lugar de CO. Este experimento demostró que las cepas de laboratorio de *E. coli* son insensibles a CO a los niveles que se logran en un proyecto de syngas realizado a presión atmosférica normal. Además, experimentos preliminares indican que células de *E. coli* recombinantes que expresan CODH/ACS actualmente consumen algo de CO, probablemente por oxidación a dióxido de carbono.

Ejemplo XIII

Enzimas de 3-Hidroxiácido descarboxilasa para la formación de 1,3-butadieno y 3-buteno-1-ol

Enzimas de 3-hidroxiácido descarboxilasa catalizan la descarboxilación conducida por ATP de 3-hidroxiácidos a derivados alqueno. Las enzimas 3-hidroxiácido descarboxilasa han sido recientemente descritas que catalizan la formación de isobutileno, propileno y etileno (WO 2010/001078 y Gogerty and Bobik, Appl. Environ. Microbiol., p. 8004-8010, Vol. 76, No. 24 (2010)). Se propone aquí la aplicación de enzimas similares para catalizar la

conversión de 3-hidroxipent-4-enoato (3HP4) a 1,3-butadieno, mostrado en la Figura 16 y 3,5-dihidroxipentanoato a 3-buteno-1-ol, mostrado en la Figura 17. El producto de 3-buteno-1-ol puede entonces ser convertido a butadieno vía deshidratación química o deshidratación biológica vía una enzima de 3-buteno-1-ol deshidratasa.

La conversión de 3-hidroxipent-4-enoato a butadieno se lleva a cabo por una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa. De manera similar, la conversión de 3,5-dihidroxipentanoato a 3-buteno-1-ol se lleva a cabo por una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa. Tales enzimas pueden portar similitud a enzimas de mevalonato pirofosfato descarboxilasa o difosfomevalonato descarboxilasa. Una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa potencial es la mevalonato difosfato descarboxilasa de *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*MDD o ERG19) la cual fue mostrada para convertir 3-hidroxi-3-metilbutirato (3-HMB) a isobuteno (Gogerty and Bobik, 2010, Appl. Environ. Microbiol., p. 8004-8010, Vol. 76, No. 24). Dos variantes mejoradas de la enzima, *Sc*MDD1 (I145F) y *Sc*MDD2 (R74H), se demostraron para lograr incrementos de 19 veces y 38 veces comparado con la enzima His-etiquetada de tipo nativo. Candidatos de enzimas adicionales y ERG19 se proporcionan a continuación.

Enzima	GI	Número de acceso	Organismo
ERG19	6324371	NP_014441.1	*Saccharomyces cerevisiae S288C*
CAWG_01359	238879484	EEQ43122.1	*Candida albicans WO-1*
ANI_1_332184	145256805	XP_001401521.1	*Aspergillus niger CBS 513.88*
MVD	4505289	NP_002452.1	*Homo sapiens*
Ahos_1490	332797171	YP_004458671.1	*Acidianus hospitalis W1*
SSO2989	15899699	NP_344304.1	*Sulfolobus solfataricus P2*
UNLARM2_0386	255513677	EET89942.1	*Candidatus Micrarchaeum* acidiphilum *ARMAN-2*

mvaD	146329706	YP_001209416.1	*Dichelobacter nodosus VCS1703A*
MPTP_0700	332686202	YP_004455976.1	*Melissococcus plutonius ATCC 35311*
RKLH11_3963	254513287	ZP_05125352.1	*Rhodobacteraceae bacterium KLH11*

Ejemplo XIV

Deshidratación Química de 3-buteno-1-ol a butadieno

Alcoholes pueden ser convertidos a olefinas por reacción con un catalizador de deshidratación adecuado bajo condiciones apropiadas. Catalizadores de deshidratación típicos que se convierten a alcoholes tales como butanoles y pentanoles en olefinas incluyen varias alúminas no tratadas y tratadas con ácido (por ejemplo, γ-alúmina) y catalizadores de sílice y arcillas que incluyen zeolitas (por ejemplo, zeolitas tipo-β, ZSM-5 o zeolitas tipo Y, catalizadores de zeolita-β tratados con fluoruro, catalizadores de arcilla tratados con fluoruro, etc.), resinas de ácido sulfónico (por ejemplo, resinas estirénicas sulfonadas tales como Amberlyst® 15), ácidos fuertes tales como ácido fosfórico y sulfúrico, ácidos Lewis tales como trifluoruro de boro y tricloruro de aluminio, y muchos tipos diferentes de sales de metal que incluyen óxidos de metal (por ejemplo, óxido de circonio u óxido de titanio) y cloruros de metal (por ejemplo, Latshaw B E, Dehydration of Isobutanol to Isobutylene in a Slurry Reactor, Department of Energy Topical Report, Febrero 1994).

Las reacciones de deshidratación pueden llevarse a cabo en fases tanto líquidas como gaseosas con sistemas catalizadores tanto heterogéneos como homogéneos en muchas configuraciones diferentes del reactor. Típicamente, los catalizadores usados son estables al agua que es generada por la reacción. El agua es usualmente removida de la zona de reacción con el producto. Los alqueno(s) resultante(s) ya sea que salen al reactor en la fase gaseosa o líquida (por ejemplo, dependiendo de las condiciones del reactor) y son capturados por un proceso de purificación corriente abajo o son además convertidos en el reactor a otros compuestos (tales como butadieno o isopreno) como se describe. El agua generada por la reacción de deshidratación sale al reactor con producto(s) de alqueno y alcohol sin reaccionar y se separa por

destilación o fase de separación. Debido a que el agua es generada en grades cantidades en la etapa de deshidratación, los catalizadores de deshidratación usados son en general tolerantes al agua y un proceso para remover el agua del sustrato y producto puede ser parte de cualquier proceso que contiene una etapa de deshidratación. Por esta razón, es posible usar alcohol húmedo (es decir, hasta aproximadamente 95% o 98% de agua en peso) como un sustrato para una reacción de deshidratación y remover esta agua con el agua generada por la reacción de deshidratación (por ejemplo, usando un catalizador de zeolita como se describe en las Patentes Estadounidenses Nos. 4,698,452 y 4,873,392). Adicionalmente, zeolita y alúmina neutrales deshidratarán alcoholes a alquenos pero en general a temperaturas y presiones superiores que las versiones acídicas de estos catalizadores.

La deshidratación de 3-buten-1-ol a butadieno es bien conocida en la técnica (Gustav. Egloff and George. Hulla, Chem. Rev., 1945, 36 (1), pp 63–141). Por ejemplo, 3-buten-1-ol es formado como un intermediario en la deshidratación de 1,4-butanodiol a 1,3-butadieno (Sato, et al, Catalysis Communications, 5 (8), 2004, p. 397-400).

Ejemplo XV

Trayectorias a 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol y 1,3-butadieno

Este ejemplo describe trayectorias a 2,4-pentadienoato, 3-buteno-1-ol y 1,3-butadieno. Nuevas trayectorias a los intermediarios 3HP4, 3,5-dihidroxipentanoato y 3-buteno-1-ol se muestran en la Figuras 18-21. Trayectorias a 3HP4 se muestran en la Figuras 18, 19 y 20 (new). Trayectorias a 3,5-dihidroxipentanoato y 3-buteno-1-ol se muestran en la Figuras 19 y 21 (nueva). Trayectorias adicionales al 2,4-pentadienoato precursor de butadieno se muestran en la Figuras 19, 20 y 21 (nueva).

Varios trayectorias a 2,4-pentadienoato se describen en los ejemplos anteriores (véase por ejemplo, Figuras 4, 12, 13 14 y 15. La hidratación de 2,4-pentadienoato proporciona 3-hidroxipent-4-enoato como se muestra en la Figura 18 (nueva). 3-Hidroxipent-4-enoato puede ser subsecuentemente descarboxilado a butadieno por una 3-hidroxiácido descarboxilasa, también descrita anteriormente.

Trayectorias adicionales de acrilil-CoA y 3-HP-CoA a 2,4-pentadienoato se muestran en la Figura 19. También se muestran aquí trayectorias a 3HP4, 3-buteno-1-ol y butadieno.

Trayectorias a 3HP4 de acrilil-CoA incluyen: etapas M/O/P, etapas M/N/T

Trayectorias a 3HP4 de 3-HP-CoA incluyen: etapas A/L/O/P, etapas A/L/N/T

Trayectorias a 3HP4 y 24PD de succinil-CoA se muestran en la Figura 20. Succinil-CoA y acetil-CoA son primero unidos por 3-oxoadipil-CoA tiolasa para formar 3-oxoadipil-CoA (Etapa A). En una trayectoria el grupo 3-oxo de 3-oxoadipil-CoA se reduce para formar 3-hidroxiadipil-CoA (Etapa G). La porción CoA es después convertida a un grupo ácido por una CoA hidrolasa, sintetasa o transferasa. 3-Hidroxiadipato es entonces oxidado para formar 3-hidroxihex-4-enedioato (Etapa I). Este producto es entonces descarboxilado para formar 3HP4. En una ruta alterna, 3-oxoadipil-CoA es convertido a 3-oxoadipato por una CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa en la Etapa B. 3-Oxoadipato es entonces reducido a 3-hidroxiadipato (Etapa K), el cual es convertido a 3HP4 como se describe previamente. Alternativamente, 3-oxoadipato es convertido a 2-fumarilacetato en la Etapa C. El grupo 3-oxo de 2-fumarilacetato es entonces reducido a 3-hidroxihex-4-enedioato, el cual es descarboxilado a 3HP4. En aún otra modalidad, el 2-fumarilacetato es descarboxilado para formar 3-oxopent-4-enoato (Etapa D), el cual es subsecuentemente reducido a 3HP4 (Etapa E). 3HP4 puede entonces ser convertido a butadieno en una etapa por descarboxilación por una 3HP4 descarboxilasa (Etapa M), o en dos etapas por deshidratación a 2,4-pentadieno seguido por descarboxilación (Etapas F, N).

Trayectorias a 3-buteno-1-ol, butadieno y 2,4-pentadienoato de malonil-CoA y acetil-CoA se muestran en la Figura 21. En estas trayectorias, malonil-CoA y acetil-CoA se unen por una tiolasa para formar 3-oxoglutaril-CoA. Este intermediario puede entonces ser convertido a 3,5-dihidroxipentanoato por varias rutas alternas (Etapas B/C/D, Etapas B/G, Etapas H/I/J, Etapas H/L/D, K/J). Una vez formado, 3,5-dihidroxipentanoato puede ser descarboxilado por una 3-hidroxiácido descarboxilasa para formar 3-buteno-1-ol (Etapa M). La deshidratación subsecuente por una 3-buteno-1-ol deshidrogenasa o un catalizador químico proporciona butadieno (Etapa O). Alternativamente, 3,5-dihidroxipentanoato puede ser deshidratado a 5-hidroxipent-2-enoato como se muestra en la etapa E. Este intermediario puede entonces ser descarboxilado a 3-buteno-1-ol (Etapa N) o además deshidratado a 2,4-pentadienoato (Etapa F).

Enzimas para catalizar las transformaciones mostradas en la Figuras 18-21 son categorizadas por número EC (Tabla 1) y descritas adicionalmente

abajo.

Etiqueta	Función	Etapa
1.1.1.a	Oxidorreductasa (oxo a alcohol)	19 I,B,N,P 20 G,K,L,E 21 B, D, J, I,L
1.1.1.c	Oxidorreductasa (2 etapa, acil-CoA a alcohol)	21 G,K
1.2.1.b	Oxidorreductasa (acil-CoA a aldehído)	21 C,H
1.3.1.a	Oxidorreductasa (alqueno a alcano)	20 I,C
2.3.1.b	Beta-cetotiolasa	19A,M 20A,21A
2.8.3.a	Coenzima-A transferasa	19F,O,G,T,E, H 20 B,H
3.1.2.a	Tioléster hidrolasa (específico de CoA)	19F,O,G,T,E, H 20 B,H
4.1.1.a	Carboxi-liasa	19 U,Y,V,X 20 D,J,M,N 21 M,N,P
4.2.1.a	Hidro-liasa	19 S,K,L,R,D,C,J,Q,W 20 F 21 E,F,O
6.2.1.a	Ácido-tiol ligasa	19F,O,G,T,E, H 20 B,H

Varias reacciones mostradas en las Figuras 19-21 son catalizadas por enzimas de alcohol deshidrogenasas. Estas reacciones incluyen Etapas B, I, N y P de la Figura 19, Etapas E, G, K y L de la Figura 20 y Etapas B, D, I, J y L de la Figura 21.

Genes ejemplares que codifican enzimas que catalizan la reducción de un aldehído a alcohol (es decir,, alcohol deshidrogenasa o equivalentemente aldehído reductasa) incluyen *alrA* que codifica una alcohol deshidrogenasa de cadena media para C2-C14 (Tani *et al., Appl.Environ.Microbiol.* 66:5231-5235 (2000)), *yqhD* y *fucO* de *E. coli* (Sulzenbacher *et al.,* 342:489-502 (2004)), y *bdh* I

y *bdh* II de *C. acetobutilicum* la cual convierte butiraldehído en butanol (Walter *et al.,* 174:7149-7158 (1992)). YqhD cataliza la reducción de un amplio rango de aldehídos usando NADPH como el cofactor, con un preferencia para cadenas de longitudes más largas de C(3) (Sulzenbacher *et al.,* 342:489-502 (2004); Perez *et al., J Biol.Chem.* 283:7346-7353 (2008)). El producto del gen *adhA* de *Zymomonas mobilisE* ha sido demostrado por tener actividad en un número de aldehídos que incluyen formaldehído, acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, y acroleína (Kinoshita *et al., Appl Microbiol Biotechnol* 22:249-254 (1985)). Candidatos de aldehído reductasas adicionales son codificados por *bdh* en *C. saccharoperbutilacetonicum* y *Cbei_1722, Cbei_2181 y Cbei_2421* en *C. Beijerinckii.* Candidatos de aldehído reductasas adicionales del gen en *Saccharomyces cerevisiae* incluyen las aldehído reductasas GRE3, ALD2-6 y HFD1, glioxilato reductasas GOR1 y YPL113C y glicerol deshidrogenasa GCY1 (WO 2011/022651A1; Atsumi *et al., Nature* 451:86-89 (2008)). Los candidatos de la enzima descritos previamente para catalizar la reducción de metilglioxal a acetol o lactaldehído son también candidatos de la enzima lactaldehído reductasa adecuados.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
alrA	BAB12273.1	9967138	*Acinetobacter* sp. cepa M-1
ADH2	NP_014032.1	6323961	*Saccharomyces cerevisiae*
yqhD	NP_417484.1	16130909	*Escherichia coli*
fucO	NP_417279.1	16130706	*Escherichia coli*
bdh I	NP_349892.1	15896543	*Clostridium acetobutilicum*
bdh II	NP_349891.1	15896542	*Clostridium acetobutilicum*
adhA	YP_162971.1	56552132	*Zymomonas mobilis*
bdh	BAF45463.1	124221917	*Clostridium saccharoperbutilacetonicum*
Cbei_1722	YP_001308850	150016596	*Clostridium beijerinckii*
Cbei_2181	YP_001309304	150017050	*Clostridium beijerinckii*
Cbei_2421	YP_001309535	150017281	*Clostridium beijerinckii*
GRE3	P38715.1	731691	*Saccharomyces cerevisiae*
ALD2	CAA89806.1	825575	*Saccharomyces cerevisiae*
ALD3	NP_013892.1	6323821	*Saccharomyces cerevisiae*
ALD4	NP_015019.1	6324950	*Saccharomyces cerevisiae*

ALD5	NP_010996.2	330443526	*Saccharomyces cerevisiae*
ALD6	ABX39192.1	160415767	*Saccharomyces cerevisiae*
HFD1	Q04458.1	2494079	*Saccharomyces cerevisiae*
GOR1	NP_014125.1	6324055	*Saccharomyces cerevisiae*
YPL113C	AAB68248.1	1163100	*Saccharomyces cerevisiae*
GCY1	CAA99318.1	1420317	*Saccharomyces cerevisiae*

Enzimas que presentan actividad de 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (EC 1.1.1.61) también caen en esta categoría. Tales enzimas se han caracterizado en *Ralstonia eutropha* (Bravo *et al., J Forens Sci*, 49:379-387 (2004)), *Clostridium kluyveri* (Wolff *et al., Protein Expr.Purif.* 6:206-212 (1995)) y *Arabidopsis thaliana* (Breitkreuz *et al., J Biol Chem*, 278:41552-41556 (2003)). La enzima *A. thaliana* fue clonada y caracterizada en levadura (Breitkreuz *et al., J.Biol.Chem.* 278:41552-41556 (2003)). Aún otro gene es la alcohol deshidrogenasa *adhI* de *Geobacillus thermoglucosidasius* (Jeon *et al., J Biotechnol* 135:127-133 (2008)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
4hbd	YP_726053.1	113867564	*Ralstonia eutropha* H16
4hbd	L21902.1	146348486	*Clostridium kluyveri* DSM 555
4hbd	Q94B07	75249805	*Arabidopsis thaliana*
adhI	AAR91477.1	40795502	*Geobacillus thermoglucosidasius*

Otra aldehído reductasa ejemplar es metilmalonato semialdehído reductasa, también conocido como 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa (EC 1.1.1.31). Esta enzima participa en la degradación de valina, leucina e isoleucina y ha sido identificada en bacterias, eucariotas, y mamíferos. Las enzimas codificadas por *P84067* de *Thermus thermophilus* HB8 has sido estructuralmente caracterizados (Lokanath *et al., J Mol Biol*, 352:905-17 (2005)). La reversibilidad de la 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa humana fue demostrada usando sustrato isotópicamente etiquetado (Manning *et al., Biochem J*, 231:481-4 (1985)). Genes adicionales que codifican esta enzima incluyen *3hidh* en *Homo sapiens* (Hawes *et al., Métodos Enzymol*, 324:218-228 (2000)) *y Oryctolagus cuniculus* (Hawes *et al., supra*; Chowdhury *et al., Biosci.Biotechnol Biochem.* 60:2043-2047 (1996)), *mmsB* en *Pseudomonas aeruginosa y Pseudomonas putida*, y *dhat* en *Pseudomonas*

putida (Aberhart *et al., J Chem.Soc.[Perkin 1]* 6:1404-1406 (1979); Chowdhury *et al., Biosci.Biotechnol Biochem.* 60:2043-2047 (1996); Chowdhury *et al., Biosci.Biotechnol Biochem.* 67:438-441 (2003)). Varias enzimas de 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa se han caracterizado en la dirección reductiva, que incluyen *mmsB* de *Pseudomonas aeruginosa* (Gokarn *et al.,* Patente Estadounidense 739676, (2008)) y *mmsB* de *Pseudomonas putida.*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
P84067	P84067	75345323	*Thermus thermophilus*
3hidh	P31937.2	12643395	*Homo sapiens*
3hidh	P32185.1	416872	*Oryctolagus cuniculus*
mmsB	NP_746775.1	26991350	*Pseudomonas putida*
mmsB	P28811.1	127211	*Pseudomonas aeruginosa*
dhat	Q59477.1	2842618	*Pseudomonas putida*

Existen varias alcohol deshidrogenasas ejemplares que reducen una cetona a un grupo funcional hidroxilo. Dos de tales enzimas de *E. coli* son codificadas por malato deshidrogenasa (*mdh*) y lactato deshidrogenasa (*ldhA*). Además, lactato deshidrogenasa de *Ralstonia eutropha* se ha mostrado por demostrar altas actividades en 2-cetoácidos de varias longitudes de cadena incluyendo lactato, 2-oxobutirato, 2-oxopentanoato y 2-oxoglutarato (Steinbuchel *et al., Eur.J.Biochem.* 130:329-334 (1983)). La conversión de alfa-cetoadipato en alfa-hidroxiadipato puede ser catalizada por 2-cetoadipato reductasa, una enzima reportada por ser encontrada en placenta humana y de rata (Suda *et al., Arch.Biochem.Biophys.* 176:610-620 (1976); Suda *et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.* 77:586-591 (1977)). Una oxidorreductasa adicional es la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa mitocondrial (*bdh*) del corazón humano la cual ha sido clonada y caracterizada (Marks *et al., J.Biol.Chem.* 267:15459-15463 (1992)). Enzimas de alcohol deshidrogenasas de *C. beijerinckii* (Ismaiel *et al., J.Bacteriol.* 175:5097-5105 (1993)) y *T. brockii* (Lamed *et al., Biochem.J.* 195:183-190 (1981); Peretz *et al., Biochemistry.* 28:6549-6555 (1989)) se convierten de acetona a isopropanol. Metil etil cetona reductasa cataliza la reducción de MEK a 2-butanol. Enzimas MEK reductasa ejemplares se pueden encontrar en *Rhodococcus ruber* (Kosjek *et al., Biotechnol Bioeng.* 86:55-62 (2004)) y *Pirococcus furiosus* (van der *et al., Eur.J.Biochem.* 268:3062-3068

(2001)).

Proteína	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
mdh	AAC76268.1	1789632	*Escherichia coli*
ldhA	NP_415898.1	16129341	*Escherichia coli*
ldh	YP_725182.1	113866693	*Ralstonia eutropha*
bdh	AAA58352.1	177198	*Homo sapiens*
adh	AAA23199.2	60592974	*Clostridium beijerinckii* NRRL B593
adh	P14941.1	113443	*Thermoanaerobacter brockii* HTD4
sadh	CAD36475	21615553	*Rhodococcus ruber*
adhA	AAC25556	3288810	*Pirococcus furiosus*

A número de organismos puede catalizar la reducción de 4-hidroxi-2-butanona a 1,3-butanodiol, que incluyen aquellos que pertenecen a los géneros *Bacillus, Brevibacterium, Candida, y Klebsiella* entre otros, como se describe por Matsuyama et al. ((1995)). Una fenilacetaldehído reductasa mutasa de *Rhodococcus* (Sar268) y una alcohol deshidrogenasa de *Leifonia* también se han mostrado por catalizar esta transformación a alta proporción (Itoh *et al., Appl.Microbiol Biotechnol.* 75:1249-1256 (2007)).

Enzimas de alcohol deshidrogenasas que reducen sustratos de 3-oxoacil-CoA a sus productos correspondientes de 3-hiroxiacil-CoA también son relevantes para las trayectorias representadas en la Figuras 19-21. Enzimas de 3-Oxoacil-CoA deshidrogenasa (EC 1.1.1.35) se convierten a moléculas de 3-oxoacil-CoA en moléculas de 3-hidroxiacil-CoA y están a menudo involucradas en la beta-oxidación del ácido graso o catabolismo de fenilacetato. Por ejemplo, subunidades de dos complejos de oxidación de ácido graso en *E. coli*, codificadas por *fadB* y *fadJ*, funcionan como 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasas (Binstock *et al., Métodos Enzymol.* 71 Pt C:403-411 (1981)). Dada la proximidad en *E. coli* de *paaH* a otro genes en el operón de degradación de fenilacetato (Nogales *et al.*, 153:357-365 (2007)) y el hecho de que mutantes de *paaH* no pueden crecer fenilacetato (Ismail *et al., Eur.J Biochem.* 270:3047-3054 (2003)), se espera que el gen *paaH* de *E. coli* también codifique una 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa. Acetoacetil-CoA reductasa participa en la trayectoria de fermentación de acetil-CoA a butirato en varias especies de *Clostridia* y ha sido estudiada en detalle

(Jones *et al., Microbiol Rev.* 50:484-524 (1986)). La enzima de *Clostridium acetobutilicum*, codificada por *hbd*, ha sido clonada y funcionalmente expresada en *E. coli* (Youngleson *et al., J Bacteriol.* 171:6800-6807 (1989)). Aún otros genes demostrados por reducir acetoacetil-CoA a 3-hidroxibutiril-CoA son *phbB* de *Zoogloea ramigera* (Ploux *et al., Eur.J Biochem.* 174:177-182 (1988)) y *phaB* de *Rhodobacter sphaeroides* (Alber *et al., Mol.Microbiol* 61:297-309 (2006)). El gen anterior es dependiente de NADPH, su secuencia de nucleótido ha sido determinada (Peoples *et al., Mol.Microbiol* 3:349-357 (1989)) y el gen ha sido expresado en *E. coli*. Estudios de especificidad del sustrato en el gen conducen a la conclusión de que se podría aceptar 3-oxopropionil-CoA como un sustrato además de acetoacetil-CoA (Ploux *et al., Eur.J Biochem.* 174:177-182 (1988)). Genes adicionales incluyen *phaB* en *Paracoccus denitrificans*, *Hbd1* (dominio C-terminal) y *Hbd2* (dominio N-terminal) en *Clostridium kluyveri* (Hillmer y Gottschalk, *Biochim. Biophys. Acta* 3334:12-23 (1974)) y *HSD17B10* en *Bos taurus* (Wakil *et al., J Biol.Chem.* 207:631-638 (1954)). La enzima de *Paracoccus denitrificans* ha sido funcionalmente expresada y caracterizada en *E. coli* (Yabutani *et al., FEMS Microbiol Lett.* 133:85-90 (1995)). Un número de enzimas similares se han encontrado en otras especies de *Clostridia* y en *Metallosphaera sedula* (Berg *et al., Science.* 318:1782-1786 (2007)). La enzima de *Candida tropicalis* es un componente de la enzima multifuncional de la beta-oxidación del ácido graso peroxisomal tipo 2 (MFE-2). El dominio B de deshidrogenasa de esta proteína es catalíticamente activo en acetoacetil-CoA. El dominio ha sido funcionalmente expresado en *E. coli*, una estructura cristalina está disponible, y el mecanismo catalítico es bien entendido (Ilianttila *et al., Biochem Biophys Res Commun* 324:25-30 (2004); Ilianttila *et al., J Mol Biol* 358:1286-1295 (2006)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
fadB	P21177.2	119811	*Escherichia coli*
fadJ	P77399.1	3334437	*Escherichia coli*
paaH	NP_415913.1	16129356	*Escherichia coli*
Hbd2	EDK34807.1	146348271	*Clostridium kluyveri*
Hbd1	EDK32512.1	146345976	*Clostridium kluyveri*
HSD17B10	O02691.3	3183024	*Bos taurus*
phbB	P23238.1	130017	*Zoogloea ramigera*
phaB	YP_353825.1	77464321	*Rhodobacter sphaeroides*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
phaB	BAA08358	675524	*Paracoccus denitrificans*
Hbd	NP_349314.1	15895965	*Clostridium acetobutilicum*
Hbd	AAM14586.1	20162442	*Clostridium beijerinckii*
Msed_1423	YP_001191505	146304189	*Metallosphaera sedula*
Msed_0399	YP_001190500	146303184	*Metallosphaera sedula*
Msed_0389	YP_001190490	146303174	*Metallosphaera sedula*
Msed_1993	YP_001192057	146304741	*Metallosphaera sedula*
Fox2	Q02207	399508	*Candida tropicalis*

Oxidorreductasas bifuncionales se convierten a una acil-CoA en su alcohol correspondiente. Enzimas con esta actividad se requieren para convertir 3-hidroxiglutaril-CoA a 3,5-dihidroxipentanoato (Figura 21, la etapa G) y 3-oxoglutaril-CoA a 5-hidroxi-3-oxopentanoato (Figura 21, etapa K).

Oxidorreductasas bifuncionales ejemplares que se convierten de un acil-CoA a alcohol incluyen aquellas que transforman sustratos tales como acetil-CoA a etanol (por ejemplo, *adhE* de *E. coli* (Kessler *et al., FEBS.Lett.* 281:59-63 (1991))) y butiril-CoA a butanol (e.g. *adhE2* de *C. acetobutilicum* (Fontaine *et al., J.Bacteriol.* 184:821-830 (2002))). Las enzimas de *C. acetobutilicum* codificadas por *bdh* I y *bdh* II (Walter, *et al., J. Bacteriol.* 174:7149-7158 (1992)), reducen acetil-CoA y butiril-CoA a etanol y butanol, respectivamente. Además de reducir acetil-CoA a etanol, las enzimas codificadas por *adhE* en *Leuconostoc mesenteroides* se han mostrado por oxidar el compuesto de cadena ramificada isobutiraldehído a isobutiril-CoA (Kazahaya *et al., J.Gen.Appl.Microbiol.* 18:43-55 (1972); Koo *et al., Biotechnol Lett,* 27:505-510 (2005)). Otra enzima ejemplar puede ser convertida a malonil-CoA a 3-HP. Una enzima dependiente de NADPH con esta actividad se ha caracterizado en *Chloroflexus aurantiacus* en donde participa en el ciclo de 3-hidroxipropionato (Hugler *et al., J Bacteriol*, 184:2404-2410 (2002); Strauss *et al., Eur J Biochem*, 215:633-643 (1993)). Esta enzima, con una masa de 300 kDa, es un sustrato altamente específico y muestra poca similitud de secuencia con otras oxidorreductasas conocidas (Hugler *et al., supra*). Ningunas enzimas en otros organismos se han mostrado por catalizar esta reacción específica; sin embargo existe evidencia bioinformática de que otros organismos pueden tener trayectorias similares (Klatt *et al., Env Microbiol*, 9:2067-2078 (2007)). Candidatos de la enzima en otros organismos que incluyen

Roseiflexus castenholzii, *Erythrobacter sp. NAP1* y gama proteobacteria HTCC2080 marina pueden ser inferidos por similitud de secuencia.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
adhE	NP_415757.1	16129202	*Escherichia coli*
adhE2	AAK09379.1	12958626	*Clostridium acetobutilicum*
bdh I	NP_349892.1	15896543	*Clostridium acetobutilicum*
bdh II	NP_349891.1	15896542	*Clostridium acetobutilicum*
adhE	AAV66076.1	55818563	*Leuconostoc mesenteroides*
mcr	AAS20429.1	42561982	*Chloroflexus aurantiacus*
Rcas_2929	YP_001433009.1	156742880	*Roseiflexus castenholzii*
NAP1_02720	ZP_01039179.1	85708113	*Erythrobacter sp. NAP1*
MGP2080_00535	ZP_01626393.1	119504313	*marine gama proteobacterium HTCC2080*

Moléculas de acil-CoA de cadena larga pueden ser reducidas a sus correspondientes alcoholes por enzimas tales como la *FAR* de jojoba (*Simmondsia chinensis*) la cual codifica una acil-CoA reductasa grasa que forma un alcohol. Su sobreexpresión en *E. coli* resulta en actividad de FAR y la acumulación de alcohol graso (Metz *et al., Plant Physiol*, 122:635-644 (2000)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
FAR	AAD38039.1	5020215	*Simmondsia chinensis*

Otro candidato para catalizar estas etapas es 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (o HMG-CoA reductasa). Esta enzima naturalmente reduce el grupo CoA en 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA a un mevalonato que forma alcohol. El

gen *hmgUn de* Sulfolobus *solfataricus*, que codifica 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, ha sido clonado, secuenciado, y expresado en *E. coli* (Bochar *et al., J Bacteriol.* 179:3632-3638 (1997)). *S. cerevisiae* también tiene dos HMG-CoA reductasas en esta (Basson *et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:5563-5567 (1986)). El gen también ha sido aislado de *Arabidopsis thaliana* y se ha mostrado que complementa la actividad de HMG-COA reductasa en *S. cerevisiae* (Learned *et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:2779-2783 (1989)).

Proteína	***ID de GenBank***	***Número GI***	***Organismo***
HMG1	CAA86503.1	587536	Saccharomyces cerevisiae
HMG2	NP_013555	6323483	*Saccharomyces cerevisiae*
HMG1	CAA70691.1	1694976	*Arabidopsis thaliana*
hmgA	AAC45370.1	2130564	*Sulfolobus solfataricus*

Acil-CoA reductasas en la familia 1.2.1 reducen una acil-CoA a su aldehído correspondiente. Tal conversión es requerida en las Etapas C y H de la Figura 21. Varias enzimas de acil-CoA deshidrogenasas se han descrito en la literatura abierta al público y representan candidatos adecuados para estas etapas. Estas se describen abajo.

Enzimas acil-CoA reductasas ejemplares incluyen acil-CoA reductasa grasa, succinil-CoA reductasa (EC 1.2.1.76), acetil-CoA reductasa y butiril-CoA reductasa. Enzimas grasas ejemplares de acil-CoA reductasa son codificadas por *acr1 de Acinetobacter calcoaceticus* (Reiser, *Journal of Bacteriology* 179:2969-2975 (1997)) y *Acinetobacter sp. M-1* (Ishige *et al., Appl. Environ. Microbiol.* 68:1192-1195 (2002)). Enzimas con actividad de succinil-CoA reductasa son codificadas por *sucD* de *Clostridium kluyveri* (Sohling, *J. Bacteriol.* 178:871-880 (1996)) y *sucD* de *P. gingivalis* (Takahashi, *J. Bacteriol* 182:4704-4710 (2000)). Enzimas succinil-CoA reductasas adicionales participan en el ciclo de 3-hidroxipropionato/4-hidroxibutirato de archaea termofílica que incluye *Metallosphaera sedula* (Berg *et al., Science* 318:1782-1786 (2007)) *y Thermoproteus neutrophilus* (Ramos-Vera *et al., J Bacteriol.*, 191:4286-4297 (2009)). La enzima *M. sedula*, codificada por *Msed_0709*, es estrictamente dependiente de NADPH y también tiene actividad de malonil-CoA reductasa. La enzima *T. neutrophilus* es activa con tanto NADPH como NADH. La enzima que acila acetaldehído deshidrogenasa en *Pseudomonas sp*, codificada por *bphG*, es aún otra como se ha demostrado por oxidar y acilar acetaldehído,

propionaldehído, butiraldehído, isobutiraldehído y formaldehído (Powlowski, *J. Bacteriol.* 175:377-385 (1993)). Además de reducir acetil-CoA a etanol, las enzimas codificadas por *adhE* en *Leuconostoc mesenteroides* se han mostrado por oxidar el compuesto de cadena ramificada isobutiraldehído a isobutiril-CoA (Kazahaya, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 18:43-55 (1972); y Koo *et al., Biotechnol Lett.* 27:505-510 (2005)). La butiraldehído deshidrogenasa cataliza un similar reacción, la conversión de butiril-CoA a butiraldehído, en organismos solventogénicos tales como *Clostridium saccharoperbutilacetonicum* (Kosaka *et al., Biosci Biotechnol Biochem.*, 71:58-68 (2007)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
acr1	YP_047869.1	50086359	*Acinetobacter calcoaceticus*
acr1	AAC45217	1684886	*Acinetobacter bailyi*
acr1	BAB85476.1	18857901	*Acinetobacter sp. Cepa M-1*
Msed_0709	YP_001190808.1	146303492	*Metallosphaera sedula*
Tneu_0421	ACB39369.1	170934108	*Thermoproteus neutrophilus*
sucD	P38947.1	172046062	*Clostridium kluyveri*
sucD	NP_904963.1	34540484	*Porphiromonas gingivalis*
bphG	BAA03892.1	425213	*Pseudomonas sp*
adhE	AAV66076.1	55818563	*Leuconostoc mesenteroides*
Bld	AAP42563.1	31075383	*Clostridium saccharoperbutilacetonicum*

Un tipo de enzima adicional que convierte una acil-CoA a su aldehído correspondiente es malonil-CoA reductasa la cual transforma malonil-CoA a semialdheído malónico. Malonil-CoA reductasa es una enzima clave en la fijación autotrófica de carbono vía el ciclo de 3-hidroxipropionato en bacterias archaeal termocidofílicas (Berg, *Science* 318:1782-1786 (2007); y Thauer, *Science* 318:1732-1733 (2007)). La enzima utiliza NADPH como un cofactor y ha sido caracterizada en *Metallosphaera* y *Sulfolobus sp.* (Alber *et al., J. Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006); y Hugler, *J. Bacteriol.* 184:2404-2410 (2002)). La enzima es codificada por *Msed_0709* en *Metallosphaera sedula* (Alber *et al., J. Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006); y Berg, *Science* 318:1782-1786 (2007)). Un gen que codifica a malonil-CoA reductasa de *Sulfolobus tokodaii* fue clonado y heterólogamente expresado en *E. coli* (Alber *et al., J. Bacteriol* 188:8551-8559

(2006). Esta enzima también ha sido mostrada por catalizar la conversión de metilmalonil-CoA a su aldehído correspondiente (WO2007141208 (2007)). A pesar que la funcionalidad aldehído de deshidrogenasa de estas enzimas es similar a la deshidrogenasa bifuncional de *Chloroflexus aurantiacus*, existe poca similitud de secuencia. Ambos candidatos de malonil-CoA reductasa de la enzima tienen alta similitud de secuencia a aspartato-semialdehído deshidrogenasa, una enzima que cataliza la reducción y desfosforilación concurrente de aspartil-4-fosfato a aspartato semialdehído. Candidatos adicionales del gen pueden ser encontrados por homología de secuencia a proteínas en otros organismos que incluyen *Sulfolobus solfataricus y Sulfolobus acidocaldarius y* han sido listados a continuación. Aún otro candidato para CoA-acilante aldehído deshidrogenasa es el gen *ald* de *Clostridium beijerinckii* (Toth, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4973-4980 (1999). Esta enzima ha sido reportada por reducir acetil-CoA y butiril-CoA a sus aldehídos correspondientes. Este gen es muy similar a *eutE que* codifica una acetaldehído deshidrogenasa de *Salmonella typhimurium y E. coli* (Toth, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4973-4980 (1999).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
Msed_0709	YP_001190808.1	146303492	*Metallosphaera sedula*
Mcr	NP_378167.1	15922498	*Sulfolobus tokodaii*
asd-2	NP_343563.1	15898958	*Sulfolobus solfataricus*
Saci_2370	YP_256941.1	70608071	*Sulfolobus* acidocaldarius
Ald	AAT66436	49473535	*Clostridium beijerinckii*
eutE	AAA80209	687645	*Salmonella typhimurium*
eutE	P77445	2498347	*Escherichia coli*

Enzimas de 2-Enoato reductasa, algunas de las cuales son reversibles, se conocen por catalizar la reducción dependiente de NAD(P)H de una amplia variedad de ácido α, β-carboxílicos insaturados y aldehídos (Rohdich *et al.,* 276:5779-5787 (2001)). Estas enzimas representan candidatos adecuados para llevar a cabo las transformaciones representadas por las etapas I y C de la Figura 20. Varios ejemplos se proporcionan a continuación.

En la secuencia genómica publicada recientemente de *C. kluyveri*, se reportaron 9 secuencias codificantes para enoato reductasas, de las cuales una ha sido caracterizada (Seedorf *et al., Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 105:2128-2133

(2008)). Los genes *enr* de tanto *C. tyrobutiricum* como *M. thermoaceticum* han sido clonados y secuenciados y muestran 59% de identidad entre sí. El gen anterior es también encontrado por tener aproximadamente 75% de similitud al gen caracterizado en *C. kluyveri* (Giesel *et al.,* 135:51-57 (1983)). Se ha reportado con base en estos resultados de secuencia que *enr* es muy similar a la dienoil CoA reductasa en *E. coli* (*fadH*) (Rohdich *et al., J Biol.Chem.* 276:5779-5787 (2001)). El gen *enr* de *C. thermoaceticum* también ha sido expresado en una forma catalíticamente activa en *E. coli* (Rohdich *et al., J Biol.Chem.* 276:5779-5787 (2001)). Esta enzima presenta actividad en un amplio intervalo de compuestos alfa, beta-carbonilo insaturados.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
enr	ACA54153.1	169405742	*Clostridium botulinum A3 str*
enr	CAA71086.1	2765041	*Clostridium tyrobutiricum*
enr	CAA76083.1	3402834	*Clostridium kluyveri*
enr	YP_430895.1	83590886	*Moorella thermoacetica*
fadH	*NP_417552.1*	16130976	*Escherichia coli*

Otro candidato de 2-enoato reductasa es maleilacetato reductasa (MAR, EC 1.3.1.32), una enzima que cataliza la reducción de 2-maleilacetato (4-oxohex-2-enedioato) a 3-oxoadipato. Enzimas MAR participan naturalmente en trayectorias de degradación aromáticas (Kaschabek *et al., J Bacteriol.* 175:6075-6081 (1993); Kaschabek *et al., J Bacteriol.* 177:320-325 (1995); Camara *et al., J Bacteriol.* (2009); Huang *et al., Appl Environ.Microbiol* 72:7238-7245 (2006)). La enzima actividad fue identificada y caracterizada en *Pseudomonas* sp. cepa B13 (Kaschabek *et al.,* 175:6075-6081 (1993); Kaschabek *et al.,* 177:320-325 (1995)), y el gen codificante fue clonado y secuenciado (Kasberg *et al., J Bacteriol.* 179:3801-3803 (1997)). Candidatos MAR adicionales del gen incluyen el gen *clcE* de *Pseudomonas* sp. cepa B13 (Kasberg *et al., J Bacteriol.* 179:3801-3803 (1997)), gen *macUn* de *Rhodococcus opacus* (Seibert *et al.,* 180:3503-3508 (1998)), el gen *macUn* de *Ralstonia eutropha* (también conocido como *Cupriavidus necator*) (Seibert *et al., Microbiology* 150:463-472 (2004)), *tfdFII* de *Ralstonia eutropha* (Seibert *et al., J Bacteriol.* 175:6745-6754 (1993)) y *NCgl1112* en *Corynebacterium glutamicum* (Huang *et al., Appl Environ.Microbiol* 72:7238-7245 (2006)). Una MAR en *Pseudomonas reinekei MT1,* codificada por *ccaD*, fue

recientemente identificada (Camara *et al., J Bacteriol.* (2009)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
clcE	3913241	O30847.1	*Pseudomonas* sp. cepa B13
macA	7387876	O84992.1	*Rhodococcus opacus*
macA	5916089	AAD55886	*Cupriavidus necator*
tfdFII	1747424	AAC44727.1	*Ralstonia eutropha JMP134*
NCgl1112	19552383	NP_600385	*Corynebacterium glutamicum*
ccaD	134133940	ABO61029.1	*Pseudomonas reinekei MT1*

La Etapa A de la Figuras 19-21 y Etapa M de la Figura 19 requiere condensación de cualquiera de 3-hidroxipropionil-CoA, acrilil-CoA, succinil-CoA o malonil-CoA con acetil-CoA. Varias enzimas □-cetotiolasa se han descrito en la literatura abierta al público y representan candidatos adecuados para estas etapa. Estas se describen abajo.

Por ejemplo, 3-Oxoadipil-CoA tiolasa representa un tipo de enzima beta-cetotiolasa que es adecuada para las etapas mencionadas anteriormente. 3-Oxoadipil-CoA tiolasa (EC 2.3.1.174) naturalmente convierte beta-cetoadipil-CoA a succinil-CoA y acetil-CoA y es una enzima clave de la trayectoria beta-cetoadipato para degradación de compuestos aromáticos. La enzima es dispersada en bacterias y hongos del suelo que incluyen *Pseudomonas putida* (Harwood *et al., J Bacteriol.* 176:6479-6488 (1994)) y *Acinetobacter calcoaceticus* (Doten *et al., J Bacteriol.* 169:3168-3174 (1987)). Los productos del gen codificados por *pcaF* en *Pseudomonas* cepa B13 (Kaschabek *et al., J Bacteriol.* 184:207-215 (2002)), *phaD* en *Pseudomonas putida U* (Olivera *et al., Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 95:6419-6424 (1998)), *paaE* en *Pseudomonas fluorescens ST* (Di *et al., Arch.Microbiol* 188:117-125 (2007)), y *paaJ* de *E. coli* (Nogales *et al., Microbiology* 153:357-365 (2007)) también catalizan esta transformación. Varias beta-cetotiolasas presentan actividades significantes y selectivas en la dirección de formación de oxoadipil-CoA que incluyen *bkt* de *Pseudomonas putida*, *pcaF y bkt* de *Pseudomonas aeruginosa PAO1*, *bkt* de *Burkholderia ambifaria* AMMD, *paaJ* de *E. coli*, y *phaD* de *P. putida*.

Proteína	GI#	Acceso de GenBank #	Organismo
paaJ	16129358	NP_415915.1	*Escherichia coli*
pcaF	17736947	AAL02407	*Pseudomonas knackmussii* (B13)
phaD	3253200	AAC24332.1	*Pseudomonas putida*
pcaF	506695	AAA85138.1	*Pseudomonas putida*
pcaF	141777	AAC37148.1	*Acinetobacter calcoaceticus*
paaE	106636097	ABF82237.1	*Pseudomonas fluorescens*
bkt	115360515	YP_777652.1	*Burkholderia ambifaria AMMD*
bkt	9949744	AAG06977.1	*Pseudomonas aeruginosa PAO1*
pcaF	9946065	AAG03617.1	*Pseudomonas aeruginosa PAO1*

Glutaril-CoA y acetil-CoA son condensados para formar 3-oxopimeloil-CoA por oxopimeloil-CoA:glutaril-CoA aciltransferasa, a beta-cetotiolasa (EC 2.3.1.16). Una enzima que cataliza esta transformación es encontrada en *Ralstonia eutropha* (anteriormente conocida como *Alcaligenes eutrophus*), codificada por genes *bktB y bktC* (Slater *et al., J.Bacteriol.* 180:1979-1987 (1998); Haywood *et al.,* 52:91-96 (1988)). Se conoce la secuencia de la proteína BktB; sin embargo, la secuencia de la proteína BktC no se ha reportado. El operón *pim* de *Rhodopseudomonas palustris* también codifica una beta-cetotiolasa, codificada por *pimB*, predicha por catalizar esta transformación en la dirección degradativa durante la degradación de benzoil-CoA (Harrison *et al.,* 151:727-736 (2005)). Un candidato de enzima beta-cetotiolasa en *S. aciditrophicus* se identificó por homología de secuencia a *bktB* (43% de identidad, valor e = 1e-93).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
bktB	YP_725948	11386745	*Ralstonia eutropha*
pimB	CAE29156	39650633	*Rhodopseudomonas palustris*
syn_02642	YP_462685.1	85860483	*Syntrophus aciditrophicus*

Enzimas de beta-cetotiolasa que catalizan la formación de beta-

cetovalerato de acetil-CoA y propionil-CoA pueden también ser capaces de catalizar la condensación de acetil-CoA con 3-hidroxipropionil-CoA, acrilil-CoA, succinil-CoA, o malonil-CoA. *Zoogloea ramigera* tiene dos cetotiolasas que pueden formar □-cetovaleril-CoA de propionil-CoA y acetil-CoA y *R. eutropha* tiene un □-oxidación cetotiolasa que es también capaz de catalizar esta transformación (Gruys *et al.*, Patente Estadounidense 5,958,745 (1999)). Las secuencias de estos genes o sus proteínas traducidas no se han reportado, pero varios candidatos en *R. eutropha*, *Z. ramigera*, u otros organismos pueden ser identificados en base a la homología de secuencia a *bktB* de *R. eutropha*. Estos incluyen:

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
phaA	YP_725941.1	113867452	*Ralstonia eutropha*
h16_A1713	YP_726205.1	113867716	*Ralstonia eutropha*
pcaF	YP_728366.1	116694155	*Ralstonia eutropha*
h16_B1369	YP_840888.1	116695312	*Ralstonia eutropha*
h16_A0170	YP_724690.1	113866201	*Ralstonia eutropha*
h16_A0462	YP_724980.1	113866491	*Ralstonia eutropha*
h16_A1528	YP_726028.1	113867539	*Ralstonia eutropha*
h16_B0381	YP_728545.1	116694334	*Ralstonia eutropha*
h16_B0662	YP_728824.1	116694613	*Ralstonia eutropha*
h16_B0759	YP_728921.1	116694710	*Ralstonia eutropha*
h16_B0668	YP_728830.1	116694619	*Ralstonia eutropha*
h16_A1720	YP_726212.1	113867723	*Ralstonia eutropha*
h16_A1887	YP_726356.1	113867867	*Ralstonia eutropha*
phbA	P07097.4	135759	*Zoogloea ramigera*
bktB	YP_002005382.1	194289475	*Cupriavidus taiwanensis*
Rmet_1362	YP_583514.1	94310304	*Ralstonia metallidurans*
Bphy_0975	YP_001857210.1	186475740	*Burkholderia phymatum*

Candidatos adicionales incluyen beta-cetotiolasas que son conocidas por convertir dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA (EC 2.1.3.9). Enzimas de acetoacetil-CoA tiolasa ejemplares incluyen los productos del gen de *atoB* de *E. coli* (Martin *et al., Nat.Biotechnol* 21:796-802 (2003)), *thlA y thlB* de *C. acetobutilicum* (Hanai *et al., Appl Environ Microbiol* 73:7814-7818 (2007); Winzer *et al., J.Mol.Microbiol Biotechnol* 2:531-541 (2000)), y *ERG10* de *S. cerevisiae*

(Hiser *et al., J.Biol.Chem.* 269:31383-31389 (1994)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
atoB	NP_416728	16130161	*Escherichia coli*
thlA	NP_349476.1	15896127	*Clostridium acetobutilicum*
thlB	NP_149242.1	15004782	*Clostridium acetobutilicum*
ERG10	NP_015297	6325229	*Saccharomyces cerevisiae*

Enzimas en la familia 2.8.3 catalizan la transferencia reversible de una porción CoA de una molécula a otra. Tal transformación es requerida por las etapas F, O, G, T, H, y E de la Figura 19 y etapas B y H de la Figura 20. Varias enzimas de CoA transferasa se han descrito en la literatura abierta al público y representan candidatos adecuados para estas etapa. Estas se describen abajo.

Mucha transferasas tienen especificidad ampliada y de este modo pueden utilizar Aceptores CoA tan diversos como acetato, succinato, propionato, butirato, 2-metilacetoacetato, 3-cetohexanoato, 3-cetopentanoato, valerato, cronato, 3-mercaptopropionato, propionato, vinilacetato, butirato, entre otros. Por ejemplo, una enzima de *Roseburia* sp. A2-183 fue mostrada por tener actividad de butiril-CoA:acetato:CoA transferasa y propionil-CoA:acetato:CoA transferasa (Charrier *et al., Microbiology* 152, 179-185 (2006)). Homólogos cercanos se pueden encontrar en, por ejemplo, *Roseburia intestinalis* L1-82, *Roseburia inulinivorans* DSM 16841, *Eubacterium rectale* ATCC 33656. Otro enzima con actividad de propionil-CoA transferasa se puede encontrar en *Clostridium propionicum* (Selmer *et al., Eur J Biochem* 269, 372-380 (2002)). Esta enzima puede usar acetato, (R)-lactato, (S)-lactato, acrilato, y butirato como la CoA aceptora (Selmer *et al., Eur J Biochem* 269, 372-380 (2002); Schweiger and Buckel, *FEBS Letters*, 171(1) 79-84 (1984)). Homólogos cercanos se pueden encontrar en, por ejemplo, *Clostridium novyi* NT, *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052, y *Clostridium botulinum* C str. Eklund. *YgfH* codifica una propionil CoA:succinato CoA transferasa en *E. coli* (Haller *et al., Biochemistry*, 39(16) 4622-4629). Homólogos cercanos se pueden encontrar en, por ejemplo, *Citrobacter youngae* ATCC 29220, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae serovar*, y *Yersinia intermedia* ATCC 29909. Estas proteínas son identificadas a continuación.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
Ach1	AAX19660.1	60396828	*Roseburia* sp. A2-183
ROSINTL182_07121	ZP_04743841.2	257413684	*Roseburia* intestinalis L1-82
ROSEINA2194_03642	ZP_03755203.1	225377982	*Roseburia inulinivorans*
EUBREC_3075	YP_002938937.1	238925420	*Eubacterium rectale ATCC 33656*
Pct	CAB77207.1	7242549	*Clostridium propionicum*
NT01CX_2372	YP_878445.1	118444712	*Clostridium novyi NT*
Cbei_4543	YP_001311608.1	150019354	*Clostridium beijerinckii*
CBC_A0889	ZP_02621218.1	168186583	*Clostridium botulinum C str. Eklund*
ygfH	NP_417395.1	16130821	*Escherichia coli*
CIT292_04485	ZP_03838384.1	227334728	*Citrobacter youngae ATCC 29220*
SARI_04582	YP_001573497.1	161506385	*Salmonella enterica subsp. arizonae serovar*
yinte0001_14430	ZP_04635364.1	238791727	*Yersinia intermedia ATCC 29909*

Una enzima candidata adicional es la enzima de dos unidades codificada por *pcaI* y *pcaJ* en *Pseudomonas*, la cual se ha mostrado por tener actividad de 3-oxoadipil-CoA/succinato transferasa (Kaschabek *et al., supra*). Existen enzimas similares con base en la homología en *Acinetobacter* sp. ADP1 (Kowalchuk *et al., Gene* 146:23-30 (1994)) y *Streptomyces coelicolor.* Succinil-CoA:3:oxoácido-CoA transferasas ejemplares adicionales están presentes en *Helicobacter pilori* (Corthesy-Theulaz *et al., J.Biol.Chem.* 272:25659-25667 (1997)) y *Bacillus subtilis* (Stols *et al., Protein.Expr.Purif.* 53:396-403 (2007)). Estas proteínas son identificadas a continuación.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
pcaI	AAN69545.1	24985644	*Pseudomonas putida*
pcaJ	NP_746082.1	26990657	*Pseudomonas putida*
pcaI	YP_046368.1	50084858	*Acinetobacter sp. ADP1*
pcaJ	AAC37147.1	141776	*Acinetobacter sp. ADP1*
pcaI	NP_630776.1	21224997	*Streptomyces coelicolor*
pcaJ	NP_630775.1	21224996	*Streptomyces coelicolor*
HPAG1_0676	YP_627417	108563101	*Helicobacter pilori*
HPAG1_0677	YP_627418	108563102	*Helicobacter pilori*
ScoA	NP_391778	16080950	*Bacillus subtilis*
ScoB	NP_391777	16080949	*Bacillus subtilis*

Una CoA transferasa que puede utilizar acetato como el CoA aceptor es acetoacetil-CoA transferasa, codificada por los genes *atoA* (alfa subunidad) y *atoD* (beta subunidad) de *E. coli* (Vanderwinkel *et al., Biochem.Biophys.Res Commun.* 33:902-908 (1968); Korolev *et al., Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr.* 58:2116-2121 (2002)). Esta enzima también ha sido mostrada por transferir la porción CoA a acetato de una variedad de sustratos acil-CoA lineales y ramificados, que incluyen isobutirato (Matthies *et al., Appl Environ Microbiol* 58:1435-1439 (1992)), valerato (Vanderwinkel *et al., supra*) y butanoato (Vanderwinkel *et al., supra*). Enzimas similares existen en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Duncan *et al., Appl Environ Microbiol* 68:5186-5190 (2002)), *Clostridium acetobutilicum* (Cary *et al., Appl Environ Microbiol* 56:1576-1583 (1990)), y *Clostridium saccharoperbutilacetonicum* (Kosaka *et al., Biosci.Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007)). Estas proteínas son identificadas a continuación.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
atoA	P76459.1	2492994	*Escherichia coli K12*
atoD	P76458.1	2492990	*Escherichia coli K12*

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
actA	YP_226809.1	62391407	*Corynebacterium glutamicum ATCC 13032*
cg0592	YP_224801.1	62389399	*Corynebacterium glutamicum ATCC 13032*
ctfA	NP_149326.1	15004866	*Clostridium acetobutilicum*
ctfB	NP_149327.1	15004867	*Clostridium acetobutilicum*
ctfA	AAP42564.1	31075384	*Clostridium saccharoperbutilacetonicum*
ctfB	AAP42565.1	31075385	*Clostridium saccharoperbutilacetonicum*

Candidatos de transferasa ejemplares adicionales son catalizados por los productos del gen de *cat1*, *cat2*, y *cat3* de *Clostridium kluyveri* los cuales han sido mostrados por exhibir actividad de succinil-CoA, 4-hidroxibutiril-CoA, y butiril-CoA transferasa, respectivamente (Seedorf *et al., supra*; Sohling *et al., Eur.J Biochem.* 212:121-127 (1993); Sohling *et al., J Bacteriol.* 178:871-880 (1996)). Actividades similares de CoA transferasa están también presentes en *Trichomonas vaginalis* (van Grinsven *et al., J.Biol.Chem.* 283:1411-1418 (2008)) y *Trypanosoma brucei* (Riviere *et al., J.Biol.Chem.* 279:45337-45346 (2004)). Estas proteínas son identificadas a continuación.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
cat1	P38946.1	729048	*Clostridium kluyveri*
cat2	P38942.2	172046066	*Clostridium kluyveri*
cat3	EDK35586.1	146349050	*Clostridium kluyveri*
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	*Trichomonas vaginalis G3*
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	*Trypanosoma brucei*

La enzima glutaconato-CoA-transferasa (EC 2.8.3.12) de la bacteria anaeróbica *Acidaminococcus fermentans* reacciona con diácido glutaconil-CoA y 3-butenoil-CoA (Mack *et al., FEBS Lett.* 405:209-212 (1997)). Los genes que codifican esta enzima son *gctA* y *gctB*. Esta enzima tiene actividad reducida pero

detectable con otros derivados de CoA que incluyen glutaril-CoA, 2-hidroxiglutaril-CoA, adipil-CoA y acrilil-CoA (Buckel *et al., Eur.J.Biochem.* 118:315-321 (1981)). La enzima ha sido clonada y expresada en *E. coli* (Mack *et al., Eur.J.Biochem.* 226:41-51 (1994)). Estas proteínas son identificadas a continuación.

Proteína	**ID de GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
gctA	CAA57199.1	559392	*Acidaminococcus fermentans*
gctB	CAA57200.1	559393	*Acidaminococcus fermentans*

Enzimas en la familia 3.1.2 hidrolizan moléculas de acil-CoA a sus correspondientes ácidos. Tal transformación es requerida por las etapas F, O, G, T, H, y E de la Figura 19 y etapas B y H de la Figura 20. Varias de tales enzimas se han descrito en la literatura y representan candidatos adecuados para estas etapas.

Por ejemplo, las enzimas codificadas por *acot12* de cerebro de *Rattus norvegicus* (Robinson *et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.* 71:959-965 (1976)) pueden reaccionar con butiril-CoA, hexanoil-CoA y malonil-CoA. La tioesterasa de ácido dicarboxílico humana, codificada por *acot8,* presenta actividad en glutaril-CoA, adipil-CoA, suberil-CoA, sebacil-CoA, y dodecanodioil-CoA (Westin *et al., J.Biol.Chem.* 280:38125-38132 (2005)). El homólogo de *E. coli* más cercano a esta enzima, *tesB*, puede también hidrolizar un intervalo de tiolésteres de CoA (Naggert *et al., J Biol Chem* 266:11044-11050 (1991)). Una enzima similar también ha sido caracterizada en el hígado de rata (Deana R., *Biochem Int* 26:767-773 (1992)). Enzimas adicionales con actividad de hidrolasa en *E. coli* incluyen *ybgC*, *paaI*, y *ybdB* (Kuznetsova, *et al., FEMS Microbiol Rev*, 2005, 29(2):263-279; Song *et al., J Biol Chem*, 2006, 281(16):11028-38). Aunque su secuencia no se ha reportado, la enzima del mitocondrión de la hoja de chícharo tiene una amplia especificidad de sustrato, con actividad demostrada en acetil-CoA, propionil-CoA, butiril-CoA, palmitoil-CoA, oleoil-CoA, succinil-CoA, y crotonil-CoA (Zeiher *et al., Plant.Physiol.* 94:20-27 (1990)) La acetil-CoA hidrolasa, *ACH1*, de *S. cerevisiae* representa otra candidato de hidrolasa (Buu *et al., J.Biol.Chem.* 278:17203-17209 (2003)).

Proteína	Acceso de GenBank #	GI#	Organismo
acot12	NP_570103.1	18543355	*Rattus norvegicus*

tesB	NP_414986	16128437	*Escherichia coli*
acot8	CAA15502	3191970	*Homo sapiens*
acot8	NP_570112	51036669	*Rattus norvegicus*
tesA	NP_415027	16128478	*Escherichia coli*
ybgC	NP_415264	16128711	*Escherichia coli*
paaI	NP_415914	16129357	*Escherichia coli*
ybdB	NP_415129	16128580	*Escherichia coli*
ACH1	NP_009538	6319456	*Saccharomyces cerevisiae*

Aún otro candidato de hidrolasa es la glutaconato CoA-transferasa de *Acidaminococcus fermentans*. Esta enzima se transformó por mutagénesis dirigida al sitio en una acil-CoA hidrolasa con actividad en glutaril-CoA, acetil-CoA y 3-butenoil-CoA (Mack *et al., FEBS.Lett.* 405:209-212 (1997)). Esto sugiere que las enzimas que codifican succinil-CoA:3-cetoácido-CoA transferasas y acetoacetil-CoA:acetil-CoA transferasas pueden también servir como candidatos para esta reacción etapa pero podrían requerir ciertas mutaciones para cambiar su función.

Proteína	Acceso de GenBank #	GI#	Organismo
gctA	CAA57199	559392	*Acidaminococcus fermentans*
gctB	CAA57200	559393	*Acidaminococcus fermentans*

Enzimas hidrolasas adicionales incluyen 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa la cual ha sido descrita por catalizar eficientemente la conversión de 3-hidroxiisobutiril-CoA a 3-hidroxiisobutirato durante la degradación de valina (Shimomura *et al., J Biol Chem.* 269:14248-14253 (1994)). Genes que codifican esta enzima incluyen *hibch* de *Rattus norvegicus* (Shimomura *et al., Métodos Enzymol.* 324:229-240 (2000)) y *Homo sapiens* (Shimomura *et al., supra*). Candidatos similares del gen también pueden ser identificados por homología de secuencia, que incluyen *hibch* de *Saccharomyces cerevisiae* y *BC_2292* de *Bacillus cereus*.

Proteína	Acceso de GenBank #	GI#	Organismo
hibch	Q5XIE6.2	146324906	*Rattus norvegicus*
hibch	Q6NVY1.2	146324905	*Homo sapiens*
hibch	P28817.2	2506374	*Saccharomyces cerevisiae*

BC_2292	AP09256	29895975	*Bacillus cereus*

Enzimas descarboxilasas en la clase EC 4.1.1 se requieren para catalizar las etapas U,Y,V, y X de la Figura 19, etapas D,J,M, y N de la Figura 20, y etapas M,N, y P de la Figura 21. Enzimas descarboxilasas candidatas se han descrito anteriormente en esta solicitud.

La hidratación de un doble enlace puede ser catalizada por enzimas hidratasas en la familia 4.2.1 de enzimas. La remoción de agua para formar un doble enlace es catalizada por enzimas deshidratasas en la familia 4.2.1 de enzimas. Enzimas hidratasas son algunas veces reversibles y también catalizan la deshidratación. Enzimas deshidratasas son algunas veces reversibles y también catalizan la hidratación. La adición o remoción de agua de un sustrato dado es requerida por las etapas S, K, L, R, D, C, J, Q, y W en la Figura 19, por la etapa F en la Figura 20, y por las etapas E, F, y O en la Figura 21. Varias enzimas hidratasas y deshidratasas se han descrito en la literatura y representan candidatos adecuados para estas etapas.

Por ejemplo, muchas enzimas deshidratasas catalizan la alfa, beta-eliminación de agua la cual involucra activación del alfa-hidrógeno por un grupo carbonilo, carboxilato o CoA-tiol éster de electrón atrayente y remoción del grupo hidroxilo de la posición beta (Buckel *et al., J Bacteriol*, 117:1248-60 (1974); Martins *et al., PNAS* 101:15645-9 (2004)). Las enzimas ejemplares incluyen 2-(hidroximetil)glutarato deshidratasa (EC 4.2.1.-), fumarasa (EC 4.2.1.2), 3-deshidroquinato deshidratasa (EC 4.2.1.10), ciclohexanona hidratasa (EC 4.2.1.-) y 2-ceto-4-pentenoato deshidratasa (EC 4.2.1.80), citramalato hidroliasa y dimetilmaleato hidratasa.

La 2-(Hidroximetil)glutarato deshidratasa es una enzima que contiene [4Fe-4S] que deshidrata 2-(hidroximetil)glutarato a 2-metilene-glutarato, estudiada por su papel en el catabolismo de nicotinato en *Eubacterium barkeri* (anteriormente *Clostridium barkeri*) (Alhapel *et al., Proc Natl Acad Sci* 103:12341-6 (2006)). Enzimas similares con alta homología de secuencia son encontradas en *Bacteroides capillosus*, *Anaerotruncus colihominis*, y *Natranaerobius thermophilius*. Estas enzimas son homólogas a las subunidades alfa y beta de serina deshidratasas bacterianas que contienen [4Fe-4S] (por ejemplo, enzimas de *E. coli* codificadas por *tdcG*, *sdhB*, y *sdaA*). Una enzima con similar funcionalidad en *E. barkeri* es dimetilmaleato hidratasa, una enzima sensible al oxígeno y dependiente de Fe^{2+} reversible en la familia aconitasa que hidrata

dimetilmaleato para formar (2R,3S)-2,3-dimetilmalato. Esta enzima es codificada por *dmdAB* (Alhapel *et al., Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12341-6 (2006); Kollmann-Koch *et al., Hoppe Seilers.Z.Physiol Chem.* 365:847-857 (1984)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
hmd	ABC88407.1	86278275	*Eubacterium barkeri*
BACCAP_02294	ZP_02036683.1	154498305	*Bacteroides capillosus*
ANACOL_02527	ZP_02443222.1	167771169	*Anaerotruncus colihominis*
NtherDRAFT_2368	ZP_02852366.1	169192667	*Natranaerobius thermophilus*
dmdA	ABC88408	86278276	*Eubacterium barkeri*
dmdB	ABC88409	86278277	*Eubacterium barkeri*

Enzimas de fumarato hidratasa (EC 4.2.1.2) catalizan naturalmente la hidratación reversible de fumarato a malato. A pesar que la capacidad de fumarato hidratasa para reaccionar con 3-oxobutanol como un sustrato no ha sido descrita en la literatura, una riqueza de información estructural está disponible para esta enzima y otros investigadores han diseñado exitosamente por ingeniería la enzima para alterar actividad, inhibición y localización (Weaver, 61:1395-1401 (2005)). *E. coli* tiene tres fumarasas: FumA, FumB, y FumC que son reguladas por condiciones de crecimiento. FumB es sensible al oxígeno y solamente es activa bajo condiciones anaeróbicas. FumA está activa bajo condiciones microanaeróbicas, y FumC es la enzima solamente activa en crecimiento aeróbico (Tseng *et al., J Bacteriol*, 183:461-467 (2001); Woods *et al.,* 954:14-26 (1988); Guest *et al., J Gen Microbiol* 131:2971-2984 (1985)). Candidatos adicionales de la enzima son encontrados en *Campilobacter jejuni* (Smith *et al., Int.J Biochem.Cell Biol* 31:961-975 (1999)), *Thermus thermophilus* (Mizobata *et al., Arch.Biochem.Biophys.* 355:49-55 (1998)) *y Rattus norvegicus* (Kobayashi *et al., J. Biochem*, 89:1923-1931 (1981)). Enzimas similares con alta homología de secuencia incluyen *fum1* de *Arabidopsis thaliana* y *fumC* de *Corynebacterium glutamicum.* La fumarasa *MmcBC* de *Pelotomaculum thermopropionicum* es otra clase de fumarasa con dos subunidades (Shimoyama *et al., FEMS Microbiol Lett*, 270:207-213 (2007)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
fumA	NP_416129.1	16129570	*Escherichia coli*
fumB	NP_418546.1	16131948	*Escherichia coli*
fumC	NP_416128.1	16129569	*Escherichia coli*
fumC	O69294	9789756	*Campilobacter jejuni*
fumC	P84127	75427690	*Thermus thermophilus*
fumH	P14408	120605	*Rattus norvegicus*
fum1	P93033	39931311	*Arabidopsis thaliana*
fumC	Q8NRN8	39931596	*Corynebacterium glutamicum*
MmcB	YP_001211906	147677691	*Pelotomaculum thermopropionicum*
MmcC	YP_001211907	147677692	*Pelotomaculum thermopropionicum*

La deshidratación de 4-hidroxi-2-oxovalerato a 2-oxopentenoato es catalizada por 4-hidroxi-2-oxovalerato hidratasa (EC 4.2.1.80). Esta enzima participa en trayectorias de degradación aromáticas y es típicamente co-transcrita con un gen que codifica una enzima con actividad de 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa. Productos ejemplares del gen son codificados por *mhpD* of *E. coli* (Ferrandez *et al., J Bacteriol.* 179:2573-2581 (1997); Pollard *et al., Eur J Biochem.* 251:98-106 (1998)), *todG* y *cmtF* de *Pseudomonas putida* (Lau *et al., Gene* 146:7-13 (1994); Eaton, *J Bacteriol.* 178:1351-1362 (1996)), *cnbE* de *Comamonas* sp. CNB-1 (Ma *et al., Appl Environ Microbiol* 73:4477-4483 (2007)) y mhpD de *Burkholderia xenovorans* (Wang *et al., FEBS J* 272:966-974 (2005)). Una enzima cercanamente relacionada, 2-oxohepta-4-eno-1,7-dioato hidratasa, participa en la degradación del ácido 4-hidroxifenilacético, donde se convierte 2-oxo-hept-4-eno-1,7-dioato (OHED) a 2-oxo-4-hidroxi-hepta-1,7-dioato usando magnesio como un cofactor (Burks *et al., J.Am.Chem.Soc.* 120: (1998)). Candidatos de hidratasa OHED de la enzima se han identificado y caracterizado en *E. coli C* (Roper *et al., Gene* 156:47-51 (1995); Izumi *et al., J Mol.Biol.* 370:899-911 (2007)) y *E. coli W* (Prieto *et al., J Bacteriol.* 178:111-120 (1996)). La comparación de secuencia revela homólogos en un amplio intervalo de bacterias, plantas y animales. Enzimas con secuencias muy similares están contenidas en *Klebsiella pneumonia* (91% de identidad, valor e = 2e-138) y *Salmonella enterica* (91% de identidad, valor e = 4e-138), entre otros.

Proteína	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
mhpD	AAC73453.2	87081722	*Escherichia coli*
cmtF	AAB62293.1	1263188	*Pseudomonas putida*
todG	AAA61942.1	485738	*Pseudomonas putida*
cnbE	YP_001967714.1	190572008	*Comamonas* sp. CNB-1
mhpD	Q13VU0	123358582	*Burkholderia xenovorans*
hpcG	CAA57202.1	556840	*Escherichia coli C*
hpaH	CAA86044.1	757830	*Escherichia coli W*
hpaH	ABR80130.1	150958100	*Klebsiella pneumoniae*
Sari_01896	ABX21779.1	160865156	*Salmonella enterica*

Otro candidato de la enzima es citramalato hidroliasa (EC 4.2.1.34), una enzima que naturalmente deshidrata 2-metilmalato a mesaconato. Esta enzima ha sido estudiada en *Methanocaldococcus jannaschii* en el contexto de la trayectoria de piruvato a 2-oxobutanoato, donde se ha demostrado que tiene una amplia especificidad de sustrato (Drevland *et al., J Bacteriol.* 189:4391-4400 (2007)). Esta actividad de la enzima también se ha detectado en *Clostridium tetanomorphum*, *Morganella morganii, Citrobacter amalonaticus* donde se cree que participa en la degradación de glutamato (Kato *et al., Arch.Microbiol* 168:457-463 (1997)). La secuencia de proteína de *M. jannaschii* no lleva homología significante a los genes en estos organismos.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
leuD	Q58673.1	3122345	*Methanocaldococcus jannaschii*

Dimetilmaleato hidratasa (EC 4.2.1.85) es una enzima sensible al oxígeno y dependiente de Fe^{2+} reversible en la familia aconitasa que hidrata dimetilmaleato para formar (2R,3S)-2,3-dimetilmalato. Esta enzima es codificada por *dmdAB* en *Eubacterium barkeri* (Alhapel *et al., supra*; Kollmann-Koch *et al., Hoppe Seilers.Z.Physiol Chem.* 365:847-857 (1984)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
dmdA	ABC88408	86278276	*Eubacterium barkeri*
dmdB	ABC88409.1	86278277	*Eubacterium barkeri*

Oleato hidratasas representan candidatos adicionales adecuados como se sugiere en el documento WO2011076691. Estos son particularmente útiles para la etapa W de la Figura 19 y etapa O de la Figura 21. Ejemplos incluyen las siguientes proteínas.

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
OhyA	ACT54545.1	254031735	*Elizabethkingia meningoseptica*
HMPREF0841_1446	ZP_07461147.1	306827879	*Streptococcus pyogenes ATCC 10782*
P700755_13397	ZP_01252267.1	91215295	*Psychroflexus torquis ATCC 700755*
RPB_2430	YP_486046.1	86749550	*Rhodopseudomonas palustris*

Enoil-CoA hidratasas (EC 4.2.1.17) catalizan la deshidratación de un intervalo de sustratos de 3-hidroxiacil-CoA (Roberts *et al., Arch.Microbiol* 117:99-108 (1978); Agnihotri *et al., Bioorg.Med.Chem.* 11:9-20 (2003); Conrad *et al., J Bacteriol.* 118:103-111 (1974)). La enoil-CoA hidratasa de *Pseudomonas putida*, codificada por *ech*, cataliza la conversión de 3-hidroxibutiril-CoA a crotonil-CoA (Roberts *et al., Arch.Microbiol* 117:99-108 (1978)). Esta transformación es también catalizada por el producto del gen de *crt* de *Clostridium acetobutilicum*, el producto del gen *crt1* de *C. kluyveri, y* otros organismos clostridiales Atsumi *et al., Metab Eng* 10:305-311 (2008); Boynton *et al., J Bacteriol.* 178:3015-3024 (1996); Hillmer *et al., FEBS Lett.* 21:351-354 (1972)). Candidatos de enoil-CoA hidratasa adicionales son *phaA* y *phaB*, de *P. putida*, y *paaA* y *paaB* de *P. fluorescens* (Olivera *et al., Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 95:6419-6424 (1998)). El producto del gen de *pimF* en *Rhodopseudomonas palustris* es predicho por codificar una enoil-CoA hidratasa que participa en la degradación de pimeloil-CoA (Harrison *et al., Microbiology* 151:727-736 (2005)). Finalmente, un número de genes de

Escherichia coli ha sido mostrado por demonstrar la funcionalidad de enoil-CoA hidratasa que incluye *maoC* (Park *et al., J Bacteriol.* 185:5391-5397 (2003)), *paaF* (Ismail *et al., Eur.J Biochem.* 270:3047-3054 (2003); Park *et al., Appl.Biochem.Biotechnol* 113-116:335-346 (2004); Park *et al., Biotechnol Bioeng* 86:681-686 (2004)) y *paaG* (Ismail *et al., Eur.J Biochem.* 270:3047-3054 (2003); Park and Lee, *Appl.Biochem.Biotechnol* 113-116:335-346 (2004); Park and Yup, *Biotechnol Bioeng* 86:681-686 (2004)).

Proteína	Acceso a GenBank No.	GI No.	Organismo
ech	NP_745498.1	26990073	*Pseudomonas putida*
crt	NP_349318.1	15895969	*Clostridium acetobutilicum*
crt1	YP_001393856	153953091	*Clostridium kluyveri*
phaA	ABF82233.1	26990002	*Pseudomonas putida*
phaB	ABF82234.1	26990001	*Pseudomonas putida*
paaA	NP_745427.1	106636093	*Pseudomonas fluorescens*
paaB	NP_745426.1	106636094	*Pseudomonas fluorescens*
maoC	NP_415905.1	16129348	*Escherichia coli*
paaF	NP_415911.1	16129354	*Escherichia coli*
paaG	NP_415912.1	16129355	*Escherichia coli*

Alternativamente, los productos del gen *E. coli* de *fadA* y *fadB* codifican un multicomplejo de enzima involucrado en la oxidación del ácido graso que presenta actividad de enoil-CoA hidratasa (Yang *et al., Biochemistry* 30:6788-6795 (1991); Yang, *J Bacteriol.* 173:7405-7406 (1991); Nakahigashi *et al., Nucleic Acids Res.* 18:4937 (1990)). Agénicos a un regulador negativo codificado por *fadR* se pueden utilizar para activar el producto del gen *fadB* (Sato *et al., J Biosci.Bioeng* 103:38-44 (2007)). Los genes *fadI* y *fadJ* codifican funciones similares y son naturalmente expresados bajo condiciones anaeróbicas (Campbell *et al., Mol.Microbiol* 47:793-805 (2003)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
fadA	YP_026272.1	49176430	*Escherichia coli*
fadB	NP_418288.1	16131692	*Escherichia coli*
fadI	NP_416844.1	16130275	*Escherichia coli*
fadJ	NP_416843.1	16130274	*Escherichia coli*

fadR	NP_415705.1	16129150	*Escherichia coli*

La conversión de sustratos de acil-CoA a sus productos de ácido puede ser catalizada por una CoA ácido-tiol ligasa o CoA sintetasa en la familia 6.2.1 de enzimas, varias de las cuales son reversibles. Varias reacciones mostradas en las Figuras 19-20 son catalizadas por enzimas ácido-tiol ligasa. Estas reacciones incluyen las Etapas F, O, G, T, H, y E de la Figura 19 y las Etapas B y H de la Figura 20. Varias enzimas que catalizan actividades de CoA ácido-tiol ligasa o CoA sintetasa se han descrito en la literatura y representan candidatos adecuados para estas etapas.

Por ejemplo, acetil-CoA sintetasa que forma ADP (ACD, EC 6.2.1.13) es una enzima que acopla la conversión de acil-CoA ésteres a sus correspondientes ácidos con la síntesis concomitante de ATP. ACD I de *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por AF1211, fue mostrada para operar en una variedad de sustratos lineales y ramificados que incluyen isobutirato, isopentanoato, y fumarato (Musfeldt *et al., J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). Una segunda ACD reversible en *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por AF1983, también es mostrada por tener un amplio rango de sustrato con alta actividad en los compuestos cíclicos fenilacetato y indoleacetato (Musfeldt and Schonheit, *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). La enzima de *Haloarcula marismortui* (anotada como una succinil-CoA sintetasa) acepta propionato, butirato, y ácidos de cadena ramificada (isovalerato e isobutirato) como sustratos, y fue mostrada por operar en las direcciones delantera y reversa (Brasen *et al., Arch Microbiol* 182:277-287 (2004)). Las ACD codificadas por *PAE3250* de crenarchaeon hipertermofílico de *Pirobaculum aerophilum* muestran el intervalo de sustrato más amplio de todas las ACDs caracterizadas, que reaccionan con acetil-CoA, isobutiril-CoA (sustrato preferido) y fenilacetil-CoA (Brasen et al, *supra*). La evolución directa o diseñada por ingeniería se puede usar para modificar esta enzima para operar a la temperatura fisiológica del organismo hospedero. Las enzimas de *A. fulgidus*, *H. marismortui* y *P. aerophilum* todas se han clonado, funcionalmente expresado, y caracterizado en *E. coli* (Brasen and Schonheit, *supra*; Musfeldt and Schonheit, *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). Un candidato adicional es succinil-CoA sintetasa, codificada por *sucCD* de *E. coli* y genes *LSC1* y *LSC2* de *Saccharomyces cerevisiae*. Estas enzimas catalizan la formación de succinil-CoA de succinato con el consumo concomitante de un ATP en una reacción la cual es reversible *in vivo* (Buck *et al., Biochemistry* 24:6245-6252 (1985)). La acil CoA ligasa de

Pseudomonas putida ha sido demostrada por funcionar en varios sustratos alifáticos que incluyen ácidos acético, propiónico, butírico, valérico, hexanoico, heptanoico y octanoico y en compuestos aromáticos tales como ácidos fenilacético y fenoxiacético (Fernandez-Valverde *et al., Appl.Environ.Microbiol.* 59:1149-1154 (1993)). Una enzima relacionada, malonil CoA sintetasa (6.3.4.9) de *Rhizobium leguminosarum* podría ser convertida a varios diácidos, es decir, etil-, propil-, alil-, isopropil-, dimetil-, ciclopropil-, ciclopropilmetilen-, ciclobutil-, y bencil-malonato en sus correspondientes monotioésteres (Pohl *et al., J.Am.Chem.Soc.* 123:5822-5823 (2001)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
AF1211	NP_070039.1	11498810	*Archaeoglobus fulgidus*
AF1983	NP_070807.1	11499565	*Archaeoglobus fulgidus*
Scs	YP_135572.1	55377722	*Haloarcula marismortui*
PAE3250	NP_560604.1	18313937	*Pirobaculum aerophilum* str. IM2
sucC	NP_415256.1	16128703	*Escherichia coli*
sucD	AAC73823.1	1786949	*Escherichia coli*
LSC1	NP_014785	6324716	*Saccharomyces cerevisiae*
LSC2	NP_011760	6321683	*Saccharomyces cerevisiae*
paaF	AAC24333.2	22711873	*Pseudomonas putida*
matB	AAC83455.1	3982573	*Rhizobium leguminosarum*

Otra enzima candidata para estas etapas es 6-carboxihexanoato-CoA ligasa, también conocida como pimeloil-CoA ligasa (EC 6.2.1.14), la cual naturalmente activa pimelato a pimeloil-CoA durante la biosíntesis de biotina en bacterias gram-positivas. La enzima de *Pseudomonas mendocina,* clonada en *E. coli*, fue mostrada por aceptar los sustratos alternos hexanedioato y nonanedioato (Binieda *et al., Biochem.J* 340 (Pt 3):793-801 (1999)). Otros candidatos son encontrados en *Bacillus subtilis* (Bower *et al., J Bacteriol.* 178:4122-4130 (1996)) y *Lysinibacillus sphaericus* (anteriormente *Bacillus sphaericus*) (Ploux *et al., Biochem.J* 287 (Pt 3):685-690 (1992)).

Proteína	ID de GenBank	Número GI	Organismo
bioW	NP_390902.2	50812281	*Bacillus subtilis*

bioW	CAA10043.1	3850837	*Pseudomonas mendocina*
bioW	P22822.1	115012	*Bacillus sphaericus*

CoA-ligasas adicionales incluyen la dicarboxilato-CoA ligasa de rata para la cual la secuencia es aún no caracterizada (Vamecq *et al., Biochem.J* 230:683-693 (1985)), cualquiera de las dos fenilacetato-CoA ligasas caracterizadas de *P. chrysogenum* (Lamas-Maceiras *et al., Biochem.J* 395:147-155 (2006); Wang *et al.,* 360:453-458 (2007)), la fenilacetato-CoA ligasa de *Pseudomonas putida* (Martinez-Blanco *et al., J Biol Chem* 265:7084-7090 (1990)) y la 6-carboxihexanoato-CoA ligasa de *Bacillus subtilis* (Bower et al. *J Bacteriol* 178(14):4122-4130 (1996)). Las acetoacetil-CoA sintetasas de *Mus musculus* (Hasegawa *et al., Biochim Biophys Acta* 1779:414-419 (2008)) y *Homo sapiens* (Ohgami *et al., Biochem.Pharmacol.* 65:989-994 (2003)) catalizan naturalmente la conversión de acetoacetato dependiente de ATP en acetoacetil-CoA.

Proteína	Acceso No.	GI No.	Organismo
phl	CAJ15517.1	77019264	*Penicillium chrysogenum*
phlB	ABS19624.1	152002983	*Penicillium chrysogenum*
paaF	AAC24333.2	22711873	*Pseudomonas putida*
bioW	NP_390902.2	50812281	*Bacillus subtilis*
AACS	NP_084486.1	21313520	*Mus musculus*
AACS	NP_076417.2	31982927	*Homo sapiens*

Como enzimas en otras clases, ciertas enzimas en la clase EC 6.2.1 han sido determinadas por tener especificidad de sustrato amplia. La acil CoA ligasa de *Pseudomonas putida* ha sido demostrada por funcional en varios sustratos alifáticos que incluyen ácidos acético, propiónico, butírico, valérico, hexanoico, heptanoico y octanoico y en compuestos aromáticos tales como ácidos fenilacético y fenoxiacético (Fernandez-Valverde *et al., Applied and Environmental Microbiology* 59:1149-1154 (1993)). Una enzima relacionada, malonil CoA sintetasa (6.3.4.9) de *Rhizobium trifolii* podría convertir varios diácidos, es decir, etil-, propil-, alil-, isopropil-, dimetil-, ciclopropil-, ciclopropilmetileno-, ciclobutil-, y bencil-malonato en sus correspondientes monotioésteres (Pohl *et al., J.Am.Chem.Soc.* 123:5822-5823 (2001)).

A través de esta solicitud varias publicaciones se han referenciado. Las descripciones de estas publicaciones en sus totalidades, que incluyen publicaciones de GenBank y Número GI, están de este modo incorporados por referencia en su totalidad para describir más completamente el estado de la técnica al cual está invención pertenece. A pesar que la invención ha sido descrita con referencia a los ejemplos proporcionados anteriormente, se debe entender que se pueden hacer varias modificaciones sin apartarse del espíritu de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente, caracterizado porque comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de tolueno que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de tolueno expresada en una cantidad suficiente para producir tolueno, tal trayectoria de tolueno es seleccionada de (A) 1) una o ambas de fenilalanina aminotransferasa y fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato descarboxilasa, y 3) fenilacetaldehído descarbonilasa; (B) 1) una o más de fenilalanina aminotransferasa y fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato descarboxilasa, 3) una o más de fenilacetaldehído deshidrogenasa y fenilacetaldehído oxidasa, y 4) fenilacetato descarboxilasa; (C) 1) una o más de fenilalanina aminotransferasa y fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato oxidasa, y 3) fenilacetato descarboxilasa; y (D) 1) fenilalanina aminotransferasa y/o fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato oxidasa y 3) fenilacetato descarboxilasa.

2. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno.

3. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno.

4. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque los tres ácidos nucleicos exógenos codifican 1) fenilalanina aminotransferasa o fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato descarboxilasa, 3) fenilacetaldehído descarbonilasa.

5. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno.

6. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque los cuatro ácidos

nucleicos exógenos codifican 1) fenilalanina aminotransferasa o fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato descarboxilasa, 3) fenilacetaldehído deshidrogenasa o oxidasa, y 4) fenilacetato descarboxilasa.

7. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

8. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

9. Un método para producir tolueno, caracterizado porque comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de tolueno, dicha trayectoria comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de tolueno expresada en una cantidad suficiente para producir tolueno, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir tolueno, tal trayectoria de tolueno es seleccionada de (A) 1) una o ambas de fenilalanina aminotransferasa y fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato descarboxilasa, y 3) fenilacetaldehído descarbonilasa; (B) 1) una o más de fenilalanina aminotransferasa y fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato descarboxilasa, 3) una o más de fenilacetaldehído deshidrogenasa y fenilacetaldehído oxidasa, y 4) fenilacetato descarboxilasa; (C) una o más de fenilalanina aminotransferasa y fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato oxidasa, y 3) fenilacetato descarboxilasa; y (D) 1) fenilalanina aminotransferasa y/o fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato oxidasa y 3) fenilacetato descarboxilasa.

10. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

11. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno.

12. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno.

13. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado

porque los tres ácidos nucleicos exógenos codifican 1) fenilalanina aminotransferasa o fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato descarboxilasa, y 3) fenilacetaldehído descarbonilasa.

14. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno.

15. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque los cuatro ácidos nucleicos exógenos codifican 1) fenilalanina aminotransferasa o fenilalanina oxidorreductasa (desaminación), 2) fenilpiruvato descarboxilasa, 3) fenilacetaldehído deshidrogenasa o oxidasa, y 4) fenilacetato descarboxilasa.

16. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

17. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente, caracterizado porque comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de benceno que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de benceno expresada en una cantidad suficiente para producir benceno, dicha trayectoria de benceno comprende una fenilalanina benceno-liasa.

18. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es la fenilalanina benceno-liasa.

19. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

20. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

21. Un método para producir benceno, caracterizado porque comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de benceno, dicha trayectoria comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de benceno expresada en una cantidad suficiente para producir benceno, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir benceno, dicha trayectoria de benceno comprende una fenilalanina benceno-liasa.

22. El método de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es la fenilalanina benceno-liasa.

23. El método de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

24. El método de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

25. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente, caracterizado porque comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de estireno que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de estireno expresada en una cantidad suficiente para producir estireno, dicha trayectoria de estireno es seleccionada de (A) 1) benzoil-CoA acetiltransferasa, 2) una o más de 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA sintetasa, transferasa, e hidrolasa, 3) benzoil-acetato descarboxilasa, 4) acetofenona reductasa, y 5) 1-feniletanol deshidratasa; o (B) 1) benzoil-CoA acetiltransferasa, 2) fosfotrans-3-oxo-3-fenilpropionilasa, 3) benzoil-acetato cinasa, 4) benzoil-acetato descarboxilasa, 5) acetofenona reductasa, y 6) 1-feniletanol deshidratasa.

26. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno.

27. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno.

28. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno.

29. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende cinco ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno.

30. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque tales cinco ácidos

nucleicos exógenos codifican 1) benzoil-CoA acetiltransferasa, 2) uno de 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA sintetasa, transferasa, e hidrolasa, 3) benzoil-acetato descarboxilasa, 4) acetofenona reductasa, y 5) 1-feniletanol deshidratasa.

31. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende seis ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno.

32. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque tales seis ácidos nucleicos exógenos codifican 1) benzoil-CoA acetiltransferasa, 2) fosfotrans-3-oxo-3-fenilpropionilasa, 3) benzoil-acetato cinasa, 4) benzoil-acetato descarboxilasa, 5) acetofenona reductasa, y 6) 1-feniletanol deshidratasa.

33. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

34. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

35. Un método para producir estireno, caracterizado porque comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de estireno, dicha trayectoria comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de estireno expresada en una cantidad suficiente para producir estireno, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir estireno, dicha trayectoria de estireno es seleccionada de (A) 1) benzoil-CoA acetiltransferasa, 2) una o más de 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA sintetasa, transferasa, e hidrolasa, 3) benzoil-acetato descarboxilasa, 4) acetofenona reductasa, y 5) 1-feniletanol deshidratasa; o (B) 1) benzoil-CoA acetiltransferasa, 2) fosfotrans-3-oxo-3-fenilpropionilasa, 3) benzoil-acetato cinasa, 4) benzoil-acetato descarboxilasa, 5) acetofenona reductasa, y 6) 1-feniletanol deshidratasa.

36. El método de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

37. El método de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos

exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno.

38. El método de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno.

39. El método de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno.

40. El método de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende cinco ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno.

41. El método de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque dichos cinco ácidos nucleicos exógenos codifican 1) benzoil-CoA acetiltransferasa, 2) uno de 3-oxo-3-fenilpropionil-CoA sintetasa, transferasa, e hidrolasa, 3) benzoil-acetato descarboxilasa, 4) acetofenona reductasa, y 5) 1-feniletanol deshidratasa.

42. El método de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende seis ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de estireno.

43. El método de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque dichos seis ácidos nucleicos exógenos codifican 1) benzoil-CoA acetiltransferasa, 2) fosfotrans-3-oxo-3-fenilpropionilasa, 3) benzoil-acetato cinasa, 4) benzoil-acetato descarboxilasa, 5) acetofenona reductasa, y 6) 1-feniletanol deshidratasa.

44. El método de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

45. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente, caracterizado porque comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 1,3-butadieno que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria de enzima 1,3-butadieno expresada en una cantidad suficiente para producir 1,3-butadieno, dicha trayectoria de 1,3-butadieno seleccionadas de (A) 1) *trans*, *trans*-muconato descarboxilasa y 2) *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (B) 1) *cis*, *trans*-muconato *cis*-descarboxilasa y 2) *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (C) 1) *cis*, *trans*-muconato *trans*-descarboxilasa 2) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (D) 1) *cis*, *cis*-muconato descarboxilasa y 2) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (E) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; y (F) *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa.

46. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 1,3-butadieno.

47. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 46, caracterizado porque dichos dos ácidos nucleicos exógenos codifican una serie seleccionada de (A) 1) *trans*, *trans*-muconato descarboxilasa y 2) *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (B) 1) *cis*, *trans*-muconato *cis*-descarboxilasa y 2) *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (C) 1) *cis*, *trans*-muconato *trans*-descarboxilasa 2) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; y (D) 1) *cis*, *cis*-muconato descarboxilasa y 2) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa.

48. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

49. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

50. Un método para producir 1,3-butadieno, caracterizado porque comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 1,3-butadieno, dicha trayectoria comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria de enzima 1,3-butadieno expresada en una cantidad suficiente para producir 1,3-butadieno, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 1,3-butadieno, dicha trayectoria de 1,3-butadieno seleccionadas de (A) 1) *trans*, *trans*-muconato descarboxilasa y 2) *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (B) 1) *cis*, *trans*-muconato *cis*-descarboxilasa y 2) *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (C) 1) *cis*, *trans*-muconato *trans*-descarboxilasa 2) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (D) 1) *cis*, *cis*-muconato descarboxilasa y 2) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (E) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; y (F) *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa.

51. El método de conformidad con la reivindicación 50, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

52. El método de conformidad con la reivindicación 50, caracterizado

porque dicho microorganismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 1,3-butadieno.

53. El método de conformidad con la reivindicación 52, caracterizado porque dichos dos ácidos nucleicos exógenos codifican una serie seleccionada de (A) 1) *trans*, *trans*-muconato descarboxilasa y 2) *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (B) 1) *cis*, *trans*-muconato *cis*-descarboxilasa y 2) *trans*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; (C) 1) *cis*, *trans*-muconato *trans*-descarboxilasa 2) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa; y (D) 1) *cis*, *cis*-muconato descarboxilasa y 2) *cis*-2,4-pentadienoato descarboxilasa.

54. El método de conformidad con la reivindicación 50, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

55. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente, caracterizado porque comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato expresada en una cantidad suficiente para producir (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, dicha trayectoria de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato comprende eritrosa-4-fosfato deshidratasa y (2,4-dioxobutoxi)fosfonato reductasa.

56. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato.

57. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 56, caracterizado porque dichos dos ácidos nucleicos exógenos codifican eritrosa-4-fosfato deshidratasa y (2,4-dioxobutoxi)fosfonato reductasa.

58. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

59. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano es cultivado anaeróbicamente.

60. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente, caracterizado porque comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de benzoato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de benzoato expresada en una cantidad

suficiente para producir benzoato, dicha trayectoria de benzoato comprende 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa; 3-deshidroquinato sintasa; 3-deshidroquinato deshidratasa; shikimato deshidrogenasa; shikimato cinasa; 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa; corismato sintasa; y corismato liasa.

61. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de benzoato.

62. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de benzoato.

63. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de benzoato.

64. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende cinco ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de benzoato.

65. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende seis ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de benzoato.

66. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende siete ácidos nucleico exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de benzoato.

67. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende ocho ácidos nucleico exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de benzoato.

68. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 67, caracterizado porque dichos ocho ácidos nucleico exógenos codifican 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa; 3-deshidroquinato sintasa; 3-deshidroquinato deshidratasa; shikimato

deshidrogenasa; shikimato cinasa; 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa; corismato sintasa; y corismato liasa.

69. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque comprende además una trayectoria de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato que comprende eritrosa-4-fosfato deshidratasa y (2,4-dioxobutoxi)fosfonato reductasa.

70. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

71. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

72. Un método para producir benzoato, caracterizado porque comprende cultivar el organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 60, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir benzoato.

73. El método de conformidad con la reivindicación 72, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

74. El método de conformidad con la reivindicación 72, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende ocho ácidos nucleico exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de benzoato.

75. El método de conformidad con la reivindicación 74, caracterizado porque dichos ocho ácidos nucleico exógenos codifican 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa; 3-deshidroquinato sintasa; 3-deshidroquinato deshidratasa; shikimato deshidrogenasa; shikimato cinasa; 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa; corismato sintasa; y corismato liasa.

76. El método de conformidad con la reivindicación 72, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende además una trayectoria de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato que comprende eritrosa-4-fosfato deshidratasa y (2,4-dioxobutoxi)fosfonato reductasa.

77. El método de conformidad con la reivindicación 72, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

78. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente, caracterizado porque comprende un organismo microbiano que tiene una

trayectoria de benceno que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de benceno expresada en una cantidad suficiente para producir benceno, dicha trayectoria de benceno se selecciona de una serie de enzimas de las trayectorias seleccionadas de: a) benzoato descarboxilasa; b) benzoato reductasa y benzaldehído descarbonilasa; c) benzoato cinasa, (benzoiloxi)fosfonato reductasa, y benzaldehído descarbonilasa; d) (benzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), fosfotransbenzoilasa, (benzoiloxi)fosfonato reductasa, y benzaldehído descarbonilasa; y e) (benzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), benzoil-CoA reductasa y benzaldehído descarbonilasa, f) (benzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), benzoato descarboxilasa, g) benzoil-CoA reductasa y benzaldehído descarbonilasa, h) fosfotransbenzoilasa, (benzoiloxi)fosfonato reductasa, y benzaldehído descarbonilasa, i) fosfotransbenzoilasa, benzoato cinasa, benzoato descarboxilasa, j) fosfotransbenzoilasa, benzoato cinasa, benzoato reductasa, benzaldehído descarbonilasa; k) fosfotransbenzoilasa, (benzoiloxi)fosfonato reductasa, y benzaldehído descarbonilasa; y l) benzoil-CoA reductasa y benzaldehído descarbonilasa.

79. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque dicha trayectoria de benceno comprende benzoato descarboxilasa.

80. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque dicha trayectoria de benceno comprende benzoato reductasa y benzaldehído descarbonilasa

81. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque dicha trayectoria de benceno comprende benzoato cinasa, (benzoiloxi)fosfonato reductasa, y benzaldehído descarbonilasa.

82. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque dicha trayectoria de benceno comprende (benzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), fosfotransbenzoilasa, (benzoiloxi)fosfonato reductasa, y benzaldehído descarbonilasa.

83. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque dicha trayectoria de benceno comprende (benzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), benzoil-CoA reductasa y benzaldehído descarbonilasa.

84. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de benceno.

85. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de benceno.

86. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de benceno.

87. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque comprende además una trayectoria de benzoato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de benzoato expresada en una cantidad suficiente para producir benzoato, dicha trayectoria de benzoato comprende 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa; 3-deshidroquinato sintasa; 3-deshidroquinato deshidratasa; shikimato deshidrogenasa; shikimato cinasa; 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa; corismato sintasa; y corismato liasa.

88. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque comprende además una trayectoria de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato que comprende eritrosa-4-fosfato deshidratasa y (2,4-dioxobutoxi)fosfonato reductasa.

89. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

90. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

91. Un método para producir benceno, caracterizado porque comprende cultivar el organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 78, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir benceno.

92. El método de conformidad con la reivindicación 91, caracterizado

porque dicha trayectoria de benceno comprende benzoato descarboxilasa.

93. El método de conformidad con la reivindicación 91, caracterizado porque dicha trayectoria de benceno comprende benzoato reductasa y benzaldehído descarbonilasa

94. El método de conformidad con la reivindicación 91, caracterizado porque dicha trayectoria de benceno comprende benzoato cinasa, (benzoiloxi)fosfonato reductasa, y benzaldehído descarbonilasa.

95. El método de conformidad con la reivindicación 91, caracterizado porque dicha trayectoria de benceno comprende (benzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), fosfotransbenzoilasa, (benzoiloxi)fosfonato reductasa, y benzaldehído descarbonilasa.

96. El método de conformidad con la reivindicación 91, caracterizado porque dicha trayectoria de benceno comprende (benzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), benzoil-CoA reductasa y benzaldehído descarbonilasa.

97. El método de conformidad con la reivindicación 91, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de benceno.

98. El método de conformidad con la reivindicación 91, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de benceno.

99. El método de conformidad con la reivindicación 91, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de benceno.

100. El método de conformidad con la reivindicación 91, caracterizado porque comprende además una trayectoria de benzoato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de benzoato expresada en una cantidad suficiente para producir benzoato, dicha trayectoria de benzoato comprende 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa; 3-deshidroquinato sintasa; 3-deshidroquinato deshidratasa; shikimato deshidrogenasa; shikimato cinasa; 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa; corismato sintasa; y corismato liasa.

101. El método de conformidad con la reivindicación 91, caracterizado porque comprende además una trayectoria de (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato que comprende eritrosa-4-fosfato deshidratasa y (2,4-dioxobutoxi)fosfonato reductasa.

102. El método de conformidad con la reivindicación 91,

caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

103. El método de conformidad con la reivindicación 91, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente es cultivado en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

104. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente, caracterizado porque comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de tolueno que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de tolueno expresada en una cantidad suficiente para producir tolueno, dicha trayectoria de tolueno se selecciona de una serie de enzimas de las trayectorias seleccionadas de: a) *p*-toluato descarboxilasa; b) *p*-toluato reductasa y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa; c) *p*-toluato cinasa, (*p*-metilbenzoiloxi)fosfonato reductasa, y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa; d) (*p*-metilbenzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), fosfotrans-*p*-metilbenzoilasa, (*p*-metilbenzoiloxi)fosfonato reductasa, y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa; y e) (*p*-metilbenzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), *p*-metilbenzoil-CoA reductasa y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa, f) (p-metilbenzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), p-toluato descarboxilasa, g) p-metilbenzoil-CoA reductasa y p-metilbenzaldehído descarbonilasa, h) fosfotrans-p-metilbenzoilasa, (p-metilbenzoiloxi)fosfonato reductasa, y p-metilbenzaldehído descarbonilasa, i) fosfotrans-p-metilbenzoilasa, p-toluato cinasa, p-toluato descarboxilasa, j) fosfotrans-p-metilbenzoilasa, p-toluato cinasa, p-toluato reductasa, p-metilbenzaldehído descarbonilasa; k) fosfotrans-*p*-metilbenzoilasa, (*p*-metilbenzoiloxi)fosfonato reductasa (desfosforilación), y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa; y l) *p*-metilbenzoil-CoA reductasa y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa.

105. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado porque dicha trayectoria de tolueno comprende *p*-toluato descarboxilasa.

106. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado porque dicha trayectoria de tolueno comprende *p*-toluato reductasa y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa

107. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado porque dicha trayectoria de tolueno comprende c) *p*-toluato cinasa, (*p*-metilbenzoiloxi)fosfonato reductasa, y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa.

108. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado porque dicha trayectoria de tolueno comprende (*p*-metilbenzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), fosfotrans-*p*-metilbenzoilasa, (*p*-metilbenzoiloxi)fosfonato reductasa, y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa.

109. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado porque dicha trayectoria de tolueno comprende (*p*-metilbenzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), *p*-metilbenzoil-CoA reductasa y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa.

110. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno.

111. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno.

112. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno.

113. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado porque comprende además una trayectoria de p-toluato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de *p*-toluato expresada en una cantidad suficiente para producir *p*-toluato, dicha trayectoria de *p*-toluato comprende 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa; 3-deshidroquinato sintasa; 3-deshidroquinato deshidratasa; shikimato deshidrogenasa; shikimato cinasa; 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa; corismato sintasa; y corismato liasa.

114. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado porque comprende además una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato que comprende DXP sintasa, DXP reductoisomerasa, y 2ME4P deshidratasa.

115. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

116. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

117. Un método para producir tolueno, caracterizado porque comprende cultivar el organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 104, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir tolueno.

118. El método de conformidad con la reivindicación 117, caracterizado porque dicha trayectoria de tolueno comprende *p*-toluato descarboxilasa.

119. El método de conformidad con la reivindicación 117, caracterizado porque dicha trayectoria de tolueno comprende *p*-toluato reductasa y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa

120. El método de conformidad con la reivindicación 117, caracterizado porque dicha trayectoria de tolueno comprende c) *p*-toluato cinasa, (*p*-metilbenzoiloxi)fosfonato reductasa, y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa.

121. El método de conformidad con la reivindicación 117, caracterizado porque dicha trayectoria de tolueno comprende (*p*-metilbenzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), fosfotrans-*p*-metilbenzoilasa, (*p*-metilbenzoiloxi)fosfonato reductasa, y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa.

122. El método de conformidad con la reivindicación 117, caracterizado porque dicha trayectoria de tolueno comprende (*p*-metilbenzoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa), *p*-metilbenzoil-CoA reductasa y *p*-metilbenzaldehído descarbonilasa.

123. El método de conformidad con la reivindicación 117, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno.

124. El método de conformidad con la reivindicación 117, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno.

125. El método de conformidad con la reivindicación 117, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de tolueno.

126. El método de conformidad con la reivindicación 117, caracterizado porque comprende además una trayectoria de *p*-toluato que

comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de p-toluato expresada en una cantidad suficiente para producir *p*-toluato, dicha trayectoria de *p-toluato* comprende 2-deshidro-3-desoxifosfoheptanoato sintasa; 3-deshidroquinato sintasa; 3-deshidroquinato deshidratasa; shikimato deshidrogenasa; shikimato cinasa; 3-fosfoshikimato-2-carboxiviniltransferasa; corismato sintasa; y corismato liasa.

127. El método de conformidad con la reivindicación 117, caracterizado porque comprende además una trayectoria de (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato que comprende DXP sintasa, DXP reductoisomerasa, y 2ME4P deshidratasa.

128. El método de conformidad con la reivindicación 117, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

129. El método de conformidad con la reivindicación 117, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente es cultivado en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

130. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente, caracterizado porque comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad suficiente para producir 2,4-pentadienoato, dicha trayectoria de 2,4-pentadienoato que tiene una serie de enzimas seleccionadas de A) i) una 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa, ii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iii) una 2-oxopentenoato reductasa, y iv) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa; B) i) una desaminasa AKP, ii) una acetilacrilato reductasa, y iii) una 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; C) i) una AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, ii) una 2,4-dioxopentanoato-2-reductasa, iii) una 2-hidroxi-4-oxopentanoato deshidratasa, iv) una acetilacrilato reductasa, y v) una 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; D) i) una AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, ii) una 2,4-dioxopentanoato-4-reductasa, iii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iv) una 2-oxopentenoato reductasa, y v) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa; y E) i) una AKP reductasa, ii) una 2-amino-4-hidroxipentanoato aminotransferasa y/o deshidrogenasa, iii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iv) una 2-oxopentenoato reductasa, y v) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa.

131. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque dicho microorganismo

microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato.

132. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato.

133. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 132, caracterizado porque los tres ácidos nucleicos exógenos codifican i) una desaminasa AKP, ii) una acetilacrilato reductasa, y iii) una 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa.

134. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato.

135. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 134, caracterizado porque los cuatro ácidos nucleicos exógenos codifican i) una 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa, ii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iii) una 2-oxopentenoato reductasa, y iv) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa.

136. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende cinco ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato.

137. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 136, caracterizado porque dichos cinco ácidos nucleicos exógenos codifican i) una AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, ii) una 2,4-dioxopentanoato-2-reductasa, iii) una 2-hidroxi-4-oxopentanoato deshidratasa, iv) una acetilacrilato reductasa, y v) una 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa.

138. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 136, caracterizado porque dichos cinco ácidos nucleicos exógenos codifican i) una AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, ii) una 2,4-dioxopentanoato-4-reductasa, iii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iv) una 2-oxopentenoato reductasa, y v) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa.

139. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de

conformidad con la reivindicación 136, caracterizado porque dichos cinco ácidos nucleicos exógenos codifican i) una AKP reductasa, ii) una 2-amino-4-hidroxipentanoato aminotransferasa y/o deshidrogenasa, iii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iv) una 2-oxopentenoato reductasa, y v) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa.

140. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

141. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

142. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque comprende además una 2,4-pentadienoato descarboxilasa expresada en una cantidad suficiente para producir 1,3-butadieno por conversión de 2,4-pentadienoato a 1,3-butadieno.

143. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 130, caracterizado porque comprende además al menos uno de una AKP tiolasa, una ornitina 4,5-aminomutasa, una 2,4-diaminopentanoato 4-aminotransferasa y a 2,4-diaminopentanoato 4-deshidrogenasa.

144. Un método para producir 2,4-pentadienoato, caracterizado porque comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato, dicha trayectoria comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad suficiente para producir 2,4-pentadienoato, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 2,4-pentadienoato, dicha trayectoria de 2,4-pentadienoato seleccionadas de A) i) una 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa, ii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iii) una 2-oxopentenoato reductasa, y iv) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa; B) i) una desaminasa AKP, ii) una acetilacrilato reductasa, y iii) una 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; C) i) una AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, ii) una 2,4-dioxopentanoato-2-reductasa, iii) una 2-hidroxi-4-oxopentanoato deshidratasa, iv) una acetilacrilato reductasa, y v) una 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; D) i) una AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, ii) una 2,4-dioxopentanoato-4-reductasa, iii) una 4-hidroxi-2-

oxovalerato deshidratasa, iv) una 2-oxopentenoato reductasa, y v) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa; y E) i) una AKP reductasa, ii) una 2-amino-4-hidroxipentanoato aminotransferasa y/o deshidrogenasa, iii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iv) una 2-oxopentenoato reductasa, y v) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa.

145. El método de conformidad con la reivindicación 144, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

146. El método de conformidad con la reivindicación 144, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

147. El método de conformidad con la reivindicación 144, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato.

148. El método de conformidad con la reivindicación 144, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende tres ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato.

149. El método de conformidad con la reivindicación 148, caracterizado porque los tres ácidos nucleicos exógenos codifican i) una desaminasa AKP, ii) una acetilacrilato reductasa, y iii) una 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa.

150. El método de conformidad con la reivindicación 144, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato.

151. El método de conformidad con la reivindicación 150, caracterizado porque los cuatro ácidos nucleicos exógenos codifican i) una 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa, ii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iii) una 2-oxopentenoato reductasa, y iv) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa.

152. El método de conformidad con la reivindicación 144, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende cinco ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato.

153. El método de conformidad con la reivindicación 152,

caracterizado porque dichos cinco ácidos nucleicos exógenos codifican i) una AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, ii) una 2,4-dioxopentanoato-2-reductasa, iii) una 2-hidroxi-4-oxopentanoato deshidratasa, iv) una acetilacrilato reductasa, y v) una 4-hidroxipent-2-enoato deshidratasa.

154. El método de conformidad con la reivindicación 152, caracterizado porque dichos cinco ácidos nucleicos exógenos codifican i) una AKP aminotransferasa y/o deshidrogenasa, ii) una 2,4-dioxopentanoato-4-reductasa, iii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iv) una 2-oxopentenoato reductasa, y v) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa.

155. El método de conformidad con la reivindicación 152, caracterizado porque dichos cinco ácidos nucleicos exógenos codifican i) una AKP reductasa, ii) una 2-amino-4-hidroxipentanoato aminotransferasa y/o deshidrogenasa, iii) una 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, iv) una 2-oxopentenoato reductasa, y v) una 2-hidroxipentenoato deshidratasa.

156. El método de conformidad con la reivindicación 144, caracterizado porque comprende además una 2,4-pentadienoato descarboxilasa expresada en una cantidad suficiente para convertir 2,4-pentadienoato a 1,3-butadieno.

157. El método de conformidad con la reivindicación 144, caracterizado porque comprende además al menos uno de una AKP tiolasa, una ornitina 4,5-aminomutasa, una 2,4-diaminopentanoato 4-aminotransferasa y a 2,4-diaminopentanoato 4-deshidrogenasa.

158. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente, caracterizado porque comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad suficiente para producir 2,4-pentadienoato, dicha trayectoria de 2,4-pentadienoato que tiene una serie de enzimas seleccionadas de:

1) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

2) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, D. 5-hidroxipent-2-

enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

3) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

4) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

5) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

6) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

7) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

8) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

9) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA

deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

10) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

11) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

12) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, D. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

13) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, N. 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, R. 3-hidroxipent-4-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

14) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, N. 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, T. 3-hidroxipent-4-enoil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, S. 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y

15) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, O. 3-oxopent-4-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, P. 3-oxopent-4-enoato reductasa, S. 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa;

16) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, N. 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, R. 3-hidroxipent-4-enoil-CoA deshidratasa, E. pent-2,4-dienoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa;

17) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, N. 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, T. 3-

hidroxipent-4-enoil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, S. 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa;

18) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, O. 3-oxopent-4-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, P. 3-oxopent-4-enoato reductasa, S. 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa.

19) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, Q. 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa;

20) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, Q. 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa;

21) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, Q. 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa;

22) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, Q. 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa;

23) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, Q. 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; and

24) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, Q. 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa.

159. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 158, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o ocho ácidos nucleico exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato.

160. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de

conformidad con la reivindicación 158, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

161. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 158, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

162. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 158, caracterizado porque comprende además una 2,4-pentadieno descarboxilasa para convertir 2,4-pentadienoato a 1,3-butadieno.

163. Un método para producir 2,4-pentadienoato, caracterizado porque comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 158, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 2,4-pentadienoato.

164. El método de conformidad con la reivindicación 163, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o ocho ácidos nucleico exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato.

165. El método de conformidad con la reivindicación 163, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

166. El método de conformidad con la reivindicación 163, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

167. Un método para producir 1,3-butadieno, caracterizado porque comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 162, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 1,3-butadieno.

168. El método de conformidad con la reivindicación 167, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o ocho ácidos nucleico exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato.

169. El método de conformidad con la reivindicación 167, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

170. El método de conformidad con la reivindicación 167,

caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

171. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente, caracterizado porque comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 1,3-butadieno que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria de enzima 1,3-butadieno expresada en una cantidad suficiente para producir 1,3-butadieno, dicha trayectoria de 1,3-butadieno que tiene una serie de enzimas seleccionadas de:

1) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, N. 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, T. 3-hidroxipent-4-enoil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, Y. 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa;

2) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, O. 3-oxopent-4-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, P. 3-oxopent-4-enoato reductasa, Y. 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa;

3) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, M. acrilil-CoA acetiltransferasa, N. 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, T. 3-hidroxipent-4-enoil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, Y. 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa;

4) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, M. acrilil-CoA acetiltransferasa, O. 3-oxopent-4-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, P. 3-oxopent-4-enoato reductasa, Y. 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa;

5) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, N. 3-oxopent-4-enoil-CoA reductasa, T. 3-hidroxipent-4-enoil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, Y. 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa;

6) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, O. 3-oxopent-4-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, P. 3-oxopent-4-enoato reductasa, Y. 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa;

172. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 171, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos, tres, cuatro, o cinco ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 1,3-butadieno.

173. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 171, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

174. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de

conformidad con la reivindicación 171, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

175. Un método para producir 1,3-butadieno, caracterizado porque comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 171, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 1,3-butadieno.

176. El método de conformidad con la reivindicación 175, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos, tres, cuatro, o cinco ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 1,3-butadieno.

177. El método de conformidad con la reivindicación 175, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

178. El método de conformidad con la reivindicación 175, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

179. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente, caracterizado porque comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 1,3-butadieno que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de 3-buteno-1-ol expresada en una cantidad suficiente para producir 3-buteno-1-ol, dicha trayectoria de 3-buteno-1-ol que tiene una serie de enzimas seleccionadas de:

1) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, U. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

2) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

3) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, U. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

4) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, V. 5-

hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

5) A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

6) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, U. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

7) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

8) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, U. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

9) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

10) M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

11) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, U. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

12) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

13) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, U. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

14) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

15) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, A. 3-hidroxipropanoil-CoA acetiltransferasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

16) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, U. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

17) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, F. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, I. 3-oxo-5-hidroxipentanoato reductasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

18) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, U. 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

19) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, G. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, J. 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

20) K. 3-hidroxipropanoil-CoA deshidratasa, M. acrilil-CoA acetiltransferasa, L. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA deshidratasa, B. 3-oxo-5-hidroxipentanoil-CoA reductasa, C. 3,5-dihidroxipentanoil-CoA deshidratasa, H. 5-hidroxipent-2-enoil-CoA sintetasa, transferasa y/o hidrolasa, V. 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

180. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 179, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, o siete, ácidos nucleico exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 3-buteno-1-ol.

181. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de

conformidad con la reivindicación 179, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

182. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 179, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

183. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 179, caracterizado porque comprende además una 3-buteno-1-ol deshidratasa para convertir 3-buteno-1-ol a 1,3-butadieno.

184. Un método para producir 3-buteno-1-ol, caracterizado porque comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 179, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 3-buteno-1-ol.

185. El método de conformidad con la reivindicación 184, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, o siete ácidos nucleico exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 3-buteno-1-ol.

186. El método de conformidad con la reivindicación 184, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

187. El método de conformidad con la reivindicación 184, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

188. El método de conformidad con la reivindicación 184, caracterizado porque comprende además la deshidratación química de 3-buteno-1-ol para proporcionar 1,3-butadieno.

189. Un método para producir 1,3-butadieno, caracterizado porque comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 183, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 1,3-butadieno.

190. El método de conformidad con la reivindicación 189, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o ocho ácidos nucleico exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 1,3-butadieno.

191. El método de conformidad con la reivindicación 189, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico

heterólogo.

192. El método de conformidad con la reivindicación 189, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

193. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente, caracterizado porque comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 1,3-butadieno que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria de enzima 1,3-butadieno expresada en una cantidad suficiente para producir 1,3-butadieno, dicha trayectoria de 1,3-butadieno seleccionadas de:

(A) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato descarboxilasa; una 3-oxopent-4-enoato reductasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa;

(B) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato descarboxilasa; una 3-oxopent-4-enoato reductasa; una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadienoato descarboxilasa;

(C) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato reductasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa;

(D) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato reductasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadienoato descarboxilasa;

(E) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato reductasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa;

(F) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato reductasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y una 2,4-

pentadienoato descarboxilasa;

(G) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA reductasa; una 3-hidroxiadipil-CoA transferasa, una 3-hidroxiadipil-CoA sintetasa o una 3-hidroxiadipil-CoA hidrolasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa; y

(H) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA reductasa; una 3-hidroxiadipil-CoA transferasa, una 3-hidroxiadipil-CoA sintetasa o una 3-hidroxiadipil-CoA hidrolasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadienoato descarboxilasa.

194. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 193, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete ácidos nucleico exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 1,3-butadieno.

195. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 194, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende ácidos nucleico exógenos que codifican cada una de las enzimas seleccionadas de:

(A) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato descarboxilasa; una 3-oxopent-4-enoato reductasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa;

(B) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato descarboxilasa; una 3-oxopent-4-enoato reductasa; una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadienoato descarboxilasa;

(C) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato reductasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa;

(D) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato reductasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y una 2,4-

pentadienoato descarboxilasa;

(E) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato reductasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa;

(F) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato reductasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadienoato descarboxilasa;

(G) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA reductasa; una 3-hidroxiadipil-CoA transferasa, una 3-hidroxiadipil-CoA sintetasa o una 3-hidroxiadipil-CoA hidrolasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato descarboxilasa; y

(H) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA reductasa; una 3-hidroxiadipil-CoA transferasa, una 3-hidroxiadipil-CoA sintetasa o una 3-hidroxiadipil-CoA hidrolasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadienoato descarboxilasa.

196. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 193, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende además:

(i) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa;

(ii) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H2 hidrogenasa; o

(iii) al menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H2 hidrogenasa, y combinaciones

de las mismas.

197. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 196, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano que comprende (i) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, ferredoxina, y combinaciones de las mismas.

198. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 196, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano que comprende (ii) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, y combinaciones de las mismas.

199. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 196, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano que comprende (i) comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa;

en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (ii) comprende cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o

en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (iii) comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una CO deshidrogenasa y una H_2 hidrogenasa.

200. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 193, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

201. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 193, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

202. Un método para producir 1,3-butadieno, caracterizado porque

comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente de cualquier uno de conformidad con las reivindicaciones 193-201, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 1,3-butadieno.

203. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente, caracterizado porque comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad suficiente para producir 2,4-pentadienoato, dicha trayectoria de 2,4-pentadienoato seleccionadas de:

(A) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato descarboxilasa; una 3-oxopent-4-enoato reductasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa;

(B) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato reductasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa;

(C) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato reductasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; and

(D) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA reductasa; una 3-hidroxiadipil-CoA transferasa, una 3-hidroxiadipil-CoA sintetasa o una 3-hidroxiadipil-CoA hidrolasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa.

204. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 203, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos, tres, cuatro, cinco, o seis ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato.

205. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 204, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende ácidos nucleico exógenos que codifican cada una de las enzimas seleccionadas de:

(A) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato descarboxilasa; una 3-oxopent-

4-enoato reductasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa;

(B) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato deshidrogenasa; una 2-fumarilacetato reductasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa;

(C) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintetasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; una 3-oxoadipato reductasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa; and

(D) una succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoadipil-CoA reductasa; una 3-hidroxiadipil-CoA transferasa, una 3-hidroxiadipil-CoA sintetasa o una 3-hidroxiadipil-CoA hidrolasa; una 3-hidroxiadipato deshidrogenasa; una 3-hidroxihex-4-enodioato descarboxilasa; y una 3-hidroxipent-4-enoato deshidratasa.

206. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 203, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende además:

(i) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa;

(ii) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H2 hidrogenasa; o

(iii) al menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H2 hidrogenasa, y combinaciones de las mismas.

207. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 206, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano que comprende (i) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato

cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, ferredoxina, y combinaciones de las mismas.

208. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 206, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano que comprende (ii) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, y combinaciones de las mismas.

209. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 206, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano que comprende (i) comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa;

en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (ii) comprende cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o

en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (iii) comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una CO deshidrogenasa y una H_2 hidrogenasa.

210. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 203, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

211. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 203, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

212. Un método para producir 2,4-pentadienoato, caracterizado porque comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente de cualquier uno de conformidad con las reivindicaciones 203-211, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 2,4-pentadienoato.

213. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente, caracterizado porque comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 1,3-butadieno que comprende al menos un ácido nucleico exógeno

que codifica una trayectoria de enzima 1,3-butadieno expresada en una cantidad suficiente para producir 1,3-butadieno, dicha trayectoria de 1,3-butadieno seleccionadas de:

(A) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa;

(B) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa;

(C) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa;

(D) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa;

(E) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa;

(F) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa;

(G) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa;

(H) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa

(reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa;

(I) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa;

(J) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa;

(K) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa;

(L) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa;

(M) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa;

(N) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; and

(O) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa.

214. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 213, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete ácidos nucleico

exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 1,3-butadieno.

215. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 214, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende ácidos nucleico exógenos que codifican cada una de las enzimas seleccionadas de:

(A) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa;

(B) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa;

(C) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa;

(D) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa;

(E) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa;

(F) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa;

(G) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa;

(H) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa;

(I) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa;

(J) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa;

(K) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa;

(L) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa;

(M) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; y una 2,4-pentadieno descarboxilasa;

(N) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa; and

(O) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa; y una 3-buteno-1-ol deshidratasa.

216. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de

conformidad con la reivindicación 213, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende además:

(i) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa;

(ii) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H2 hidrogenasa; o

(iii) al menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H2 hidrogenasa, y combinaciones de las mismas.

217. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 216, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano que comprende (i) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, ferredoxina, y combinaciones de las mismas.

218. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 216, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano que comprende (ii) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, y combinaciones de las mismas.

219. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 216, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano que comprende (i) comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa;

en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (ii) comprende cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o

en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (iii) comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una CO deshidrogenasa y una H_2 hidrogenasa.

220. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 213, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

221. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 213, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

222. Un método para producir 1,3-butadieno, caracterizado porque comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente de cualquier uno de conformidad con las reivindicaciones 213-221, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 1,3-butadieno.

223. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente, caracterizado porque comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 2,4-pentadienoato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de trayectoria de 2,4-pentadienoato expresada en una cantidad suficiente para producir 2,4-pentadienoato, dicha trayectoria de 2,4-pentadienoato seleccionadas de:

(A) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa;

(B) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa;

(C) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa;

(D) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; and

(E) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa.

224. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 223, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos, tres, cuatro, cinco o seis ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 2,4-pentadienoato.

225. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 224, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende ácidos nucleico exógenos que codifican cada una de las enzimas seleccionadas de:

(A) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa;

(B) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa;

(C) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa;

(D) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa; and

(E) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato deshidratasa.

226. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 223, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende además:

(i) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa;

(ii) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H2 hidrogenasa; o

(iii) al menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H2 hidrogenasa, y combinaciones de las mismas.

227. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 226, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano que comprende (i) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, ferredoxina, y combinaciones de las mismas.

228. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 226, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano que comprende (ii) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, y combinaciones de las mismas.

229. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 226, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano que comprende (i) comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-

cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa;

en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (ii) comprende cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o

en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (iii) comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una CO deshidrogenasa y una H_2 hidrogenasa.

230. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 223, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

231. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 223, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

232. Un método para producir 2,4-pentadienoato, caracterizado porque comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente de cualquier uno de conformidad con las reivindicaciones 223-231, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 2,4-pentadienoato.

233. Un organismo microbiano que no se origina naturalmente, caracterizado porque comprende un organismo microbiano que tiene una trayectoria de 3-buteno-1-ol que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de 3-buteno-1-ol expresada en una cantidad suficiente para producir 3-buteno-1-ol, dicha trayectoria de 3-buteno-1-ol seleccionadas de:

(A) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

(B) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

(C) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-

oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

(D) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

(E) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

(F) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

(G) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

(H) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

(I) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y

(J) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa.

234. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 233, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende dos, tres, cuatro o cinco ácidos nucleicos exógenos cada uno codificando una enzima de la trayectoria de 3-buteno-1-ol.

235. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 234, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende ácidos nucleico exógenos que codifican cada una de las enzimas seleccionadas de:

(A) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

(B) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de aldehído); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

(C) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

(D) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de CoA y formación de alcohol); una 5-hidroxi-3-oxopentanoato reductasa; y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

(E) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

(F) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3,5-dioxopentanoato reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

(G) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa;

(H) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de aldehído); una 3-hidroxi-5-oxopentanoato reductasa; y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa;

(I) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); una 3,5-dihidroxipentanoato deshidratasa; y una 5-hidroxipent-2-enoato descarboxilasa; y

(J) una malonil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa; una 3-oxoglutaril-CoA

reductasa (reducción de cetona); una 3-hidroxiglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); y una 3,5-dihidroxipentanoato descarboxilasa.

236. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 233, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano comprende además:

(i) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa;

(ii) una trayectoria reductora de TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una trayectoria reductora de la enzima TCA, en donde al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H2 hidrogenasa; o

(iii) al menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las mismas.

237. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 236, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano que comprende (i) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, ferredoxina, y combinaciones de las mismas.

238. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 236, caracterizado porque dicho microorganismo microbiano que comprende (ii) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, y combinaciones de las mismas.

239. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 236, caracterizado porque dicho microorganismo

microbiano que comprende (i) comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa;

en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (ii) comprende cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o

en donde dicho microorganismo microbiano que comprende (iii) comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una CO deshidrogenasa y una H_2 hidrogenasa.

240. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 233, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

241. El organismo microbiano que no se origina naturalmente de conformidad con la reivindicación 233, caracterizado porque el organismo microbiano que no se origina naturalmente está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

242. Un método para producir 3-buteno-1-ol, caracterizado porque comprende cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente de cualquier uno de conformidad con las reivindicaciones 233-241, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 3-buteno-1-ol.

243. Un método para producir 1,3-butadieno caracterizado porque comprende, cultivar un organismo microbiano que no se origina naturalmente de cualquier uno de conformidad con las reivindicaciones 233-241, bajo condiciones y por un periodo de tiempo suficiente para producir 3-buteno-1-ol, y convertir químicamente tal 3-buteno-1-ol a 1,3-butadieno.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a organismos microbianos que no se originan naturalmente que tienen una trayectoria de tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno. La invención adicionalmente proporciona métodos para usar tales organismos para producir tolueno, benceno, p-toluato, tereftalato, (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, (2-hidroxi-4-oxobutoxi)fosfonato, benzoato, estireno, 2,4-pentadienoato, 3-buten-1-ol o 1,3-butadieno.

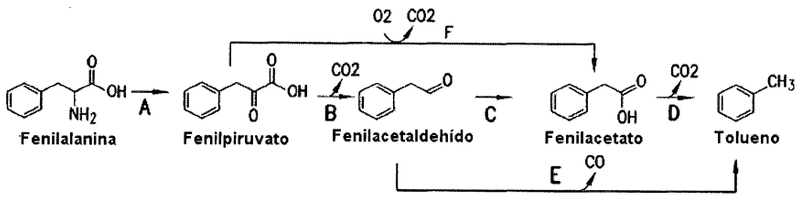

O2 CO2
F
OH
NH2
A
OH
O
CO2
B
O
C
OH
O
CO2
D
CH3
Fenilalanina
Fenilpiruvato
Fenilacetaldehído
Fenilacetato
Tolueno
E
CO

FIG.1

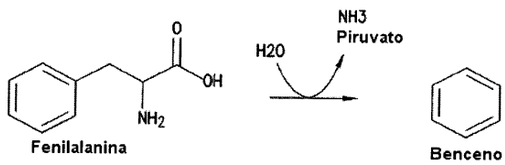


FIG.2

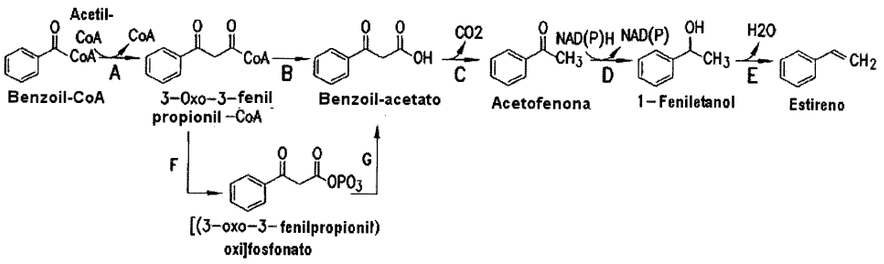

Acetil-
CoA
CoA
A
Benzoil-CoA
3-Oxo-3-fenil
propionil -CoA
B
Benzoil-acetato
CO2
C
Acetofenona
NAD(P)H
NAD(P)
D
1-Feniletanol
H2O
E
Estireno
F
G
[(3-oxo-3-fenilpropionil)
oxi]fosfonato

FIG.3

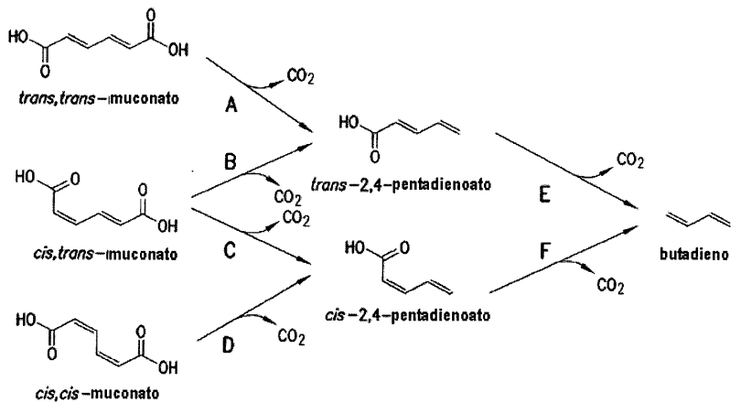
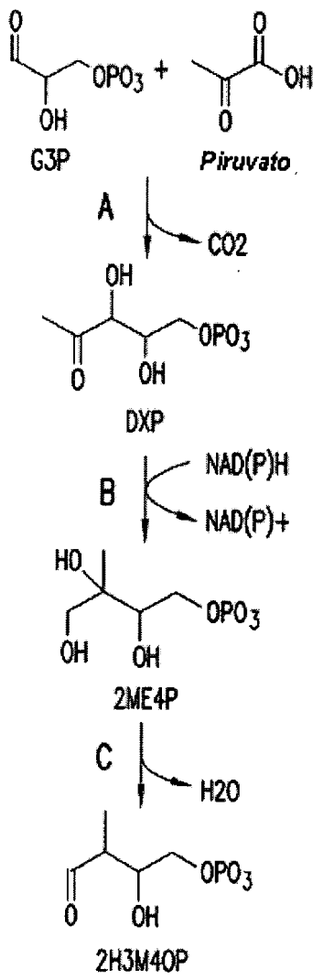

trans,trans–muconato
cis,trans–muconato
cis,cis–muconato
trans–2,4–pentadienoato
cis–2,4–pentadienoato
butadieno
A
B
C
D
E
F
CO2

FIG.4


OPO3 +
OH
G3P
Piruvato
A
CO2
OH
OPO3
OH
DXP
B
NAD(P)H
NAD(P)+
HO
OPO3
OH
OH
2ME4P
C
H2O
OPO3
OH
2H3M4OP

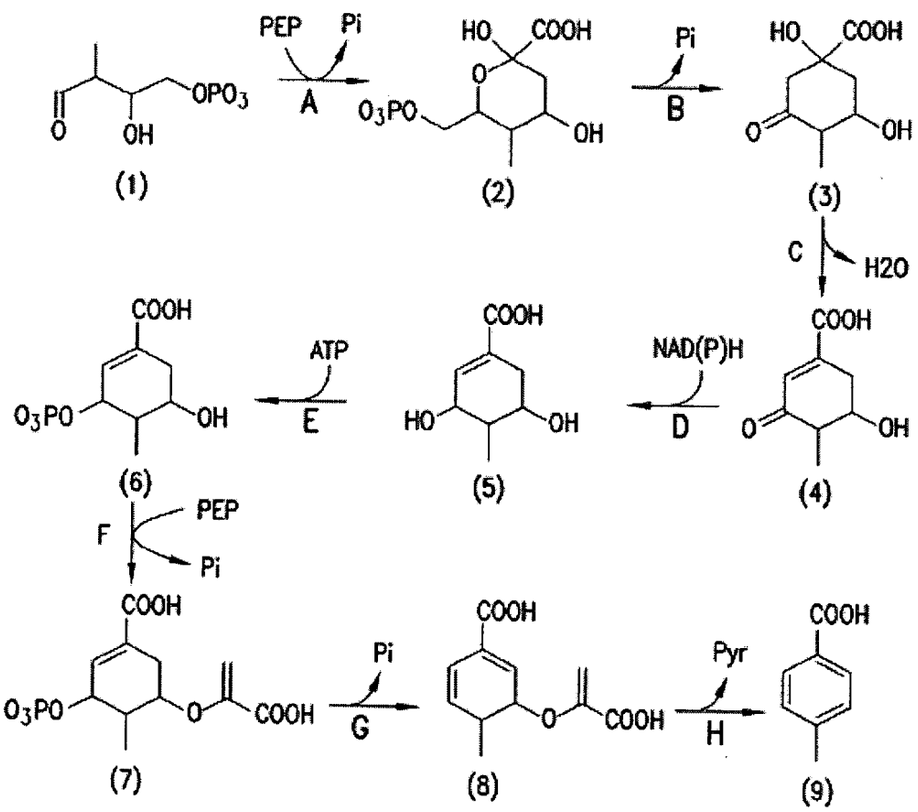

PEP
Pi
A
B
C
H2O
D
NAD(P)H
E
ATP
F
PEP
Pi
G
Pi
Pyr
H
COOH
HO
OH
O
OPO3
O3PO
(1)
(2)
(3)
(4)
(5)
(6)
(7)
(8)
(9)

FIG.6

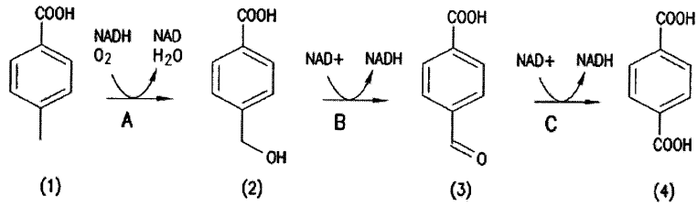

COOH
NADH
O2
NAD
H2O
A
COOH
OH
NAD+
NADH
B
COOH
O
NAD+
NADH
C
COOH
COOH
(1)
(2)
(3)
(4)

FIG.7

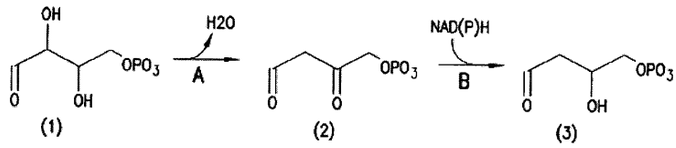


FIG.8

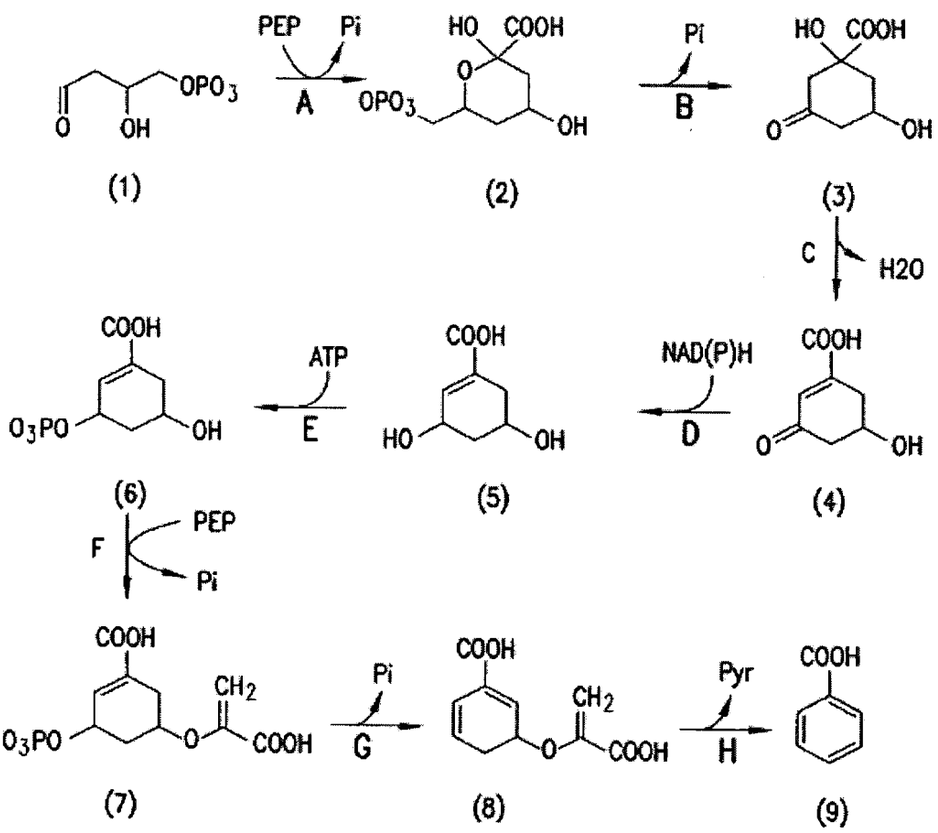

PEP
Pi
A
HO
COOH
OPO3
OH
O
(1)
(2)
Pi
B
(3)
C
H2O
(4)
NAD(P)H
D
(5)
ATP
E
(6)
F
PEP
Pi
(7)
Pi
G
CH2
(8)
Pyr
H
(9)

FIG.9

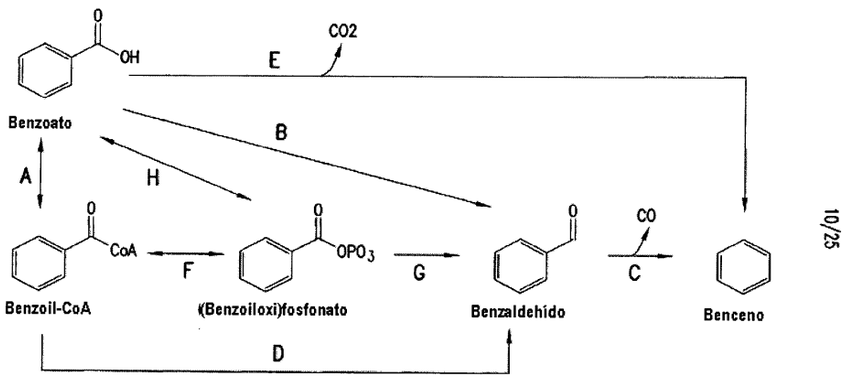

Benzoato
Benzoil-CoA
(Benzoiloxi)fosfonato
Benzaldehido
Benceno
CO2
CO
A
B
C
D
E
F
G
H
CoA
OPO3
OH

FIG.10

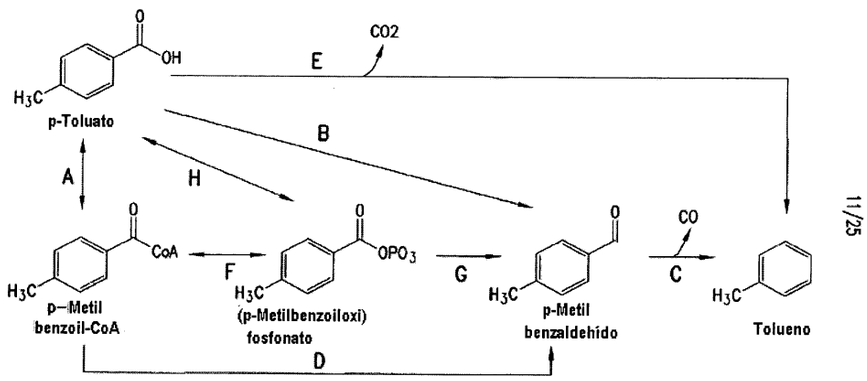

p-Toluato
CO2
E
B
A
H
p-Metil
benzoil-CoA
F
(p-Metilbenzoiloxi)
fosfonato
G
p-Metil
benzaldehído
CO
C
Tolueno
D

FIG.11

FIG.12

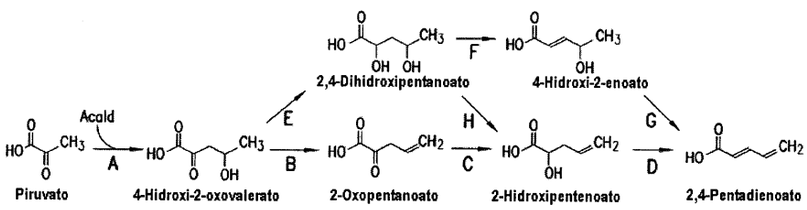
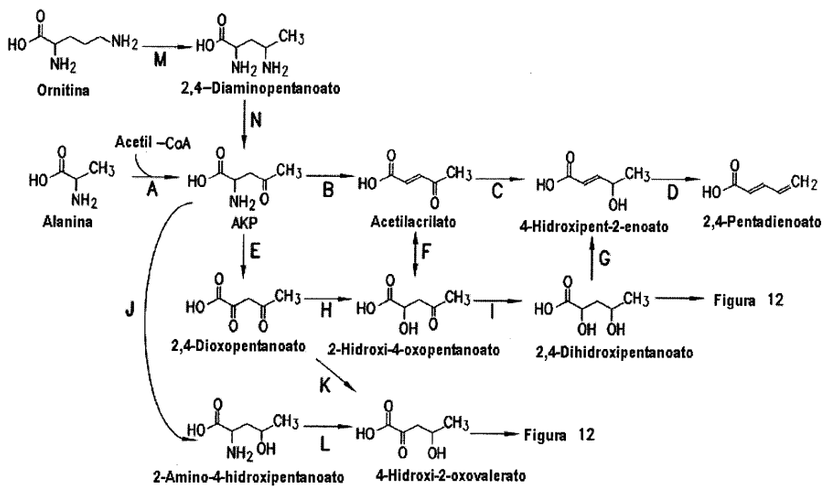

Acoild
A
Piruvato
4-Hidroxi-2-oxovalerato
B
2-Oxopentanoato
C
2-Hidroxipentenoato
D
2,4-Pentadienoato
E
2,4-Dihidroxipentanoato
F
4-Hidroxi-2-enoato
G
H

FIG.13


Ornitina
M
2,4–Diaminopentanoato
N
Acetil –CoA
A
Alanina
AKP
B
Acetilacrilato
C
4-Hidroxipent-2-enoato
D
2,4-Pentadienoato
E
F
G
J
H
I
Figura 12
2,4-Dioxopentanoato
2-Hidroxi-4-oxopentanoato
2,4-Dihidroxipentanoato
K
L
Figura 12
2-Amino-4-hidroxipentanoato
4-Hidroxi-2-oxovalerato

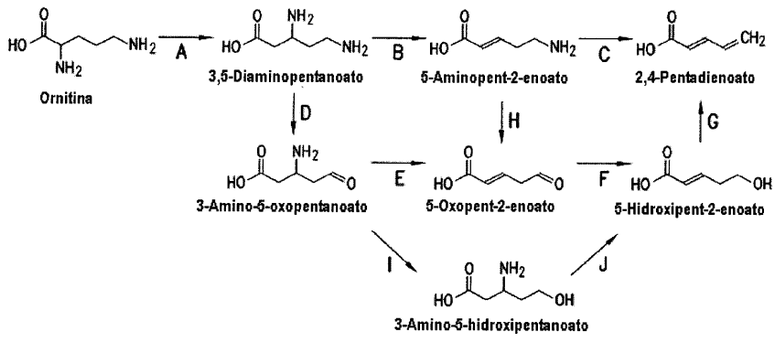
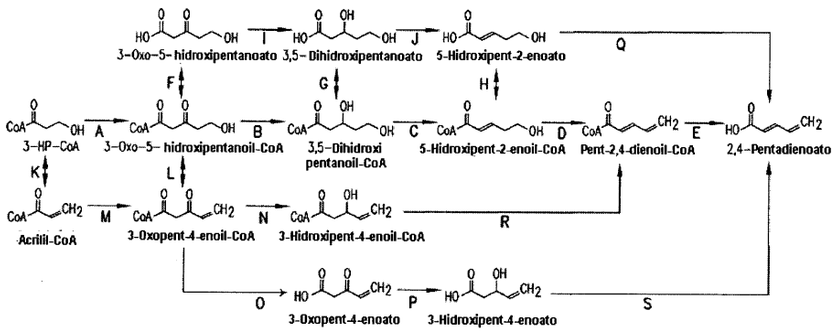

Ornitina
A
3,5-Diaminopentanoato
B
5-Aminopent-2-enoato
C
2,4-Pentadienoato
D
H
G
3-Amino-5-oxopentanoato
E
5-Oxopent-2-enoato
F
5-Hidroxipent-2-enoato
I
J
3-Amino-5-hidroxipentanoato

FIG. 14

362

FIG. 15


3-Oxo-5-hidroxipentanoato
I
3,5-Dihidroxipentanoato
J
5-Hidroxipent-2-enoato
Q
F
G
H
3-HP-CoA
A
3-Oxo-5-hidroxipentanoil-CoA
B
3,5-Dihidroxi pentanoil-CoA
C
5-Hidroxipent-2-enoil-CoA
D
Pent-2,4-dienoil-CoA
E
2,4-Pentadienoato
K
L
Acrilil-CoA
M
3-Oxopent-4-enoil-CoA
N
3-Hidroxipent-4-enoil-CoA
R
O
3-Oxopent-4-enoato
P
3-Hidroxipent-4-enoato
S

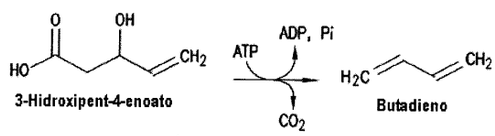

O
OH
HO
CH2
3-Hidroxipent-4-enoato
ATP
ADP, Pi
CO2
H2C
CH2
Butadieno

FIG.16

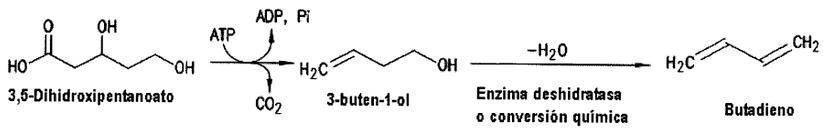

O
OH
HO
OH
3,5-Dihidroxipentanoato
ATP
ADP, Pi
CO_2
H_2C
OH
3-buten-1-ol
$-H_2O$
Enzima deshidratasa
o conversión química
H_2C
CH_2
Butadieno

FIG.17

365

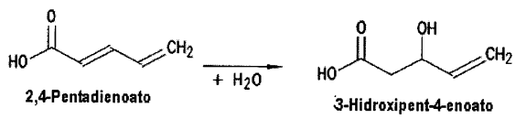

O
HO
CH2
+ H2O
2,4-Pentadienoato
O
OH
HO
CH2
3-Hidroxipent-4-enoato

FIG.18

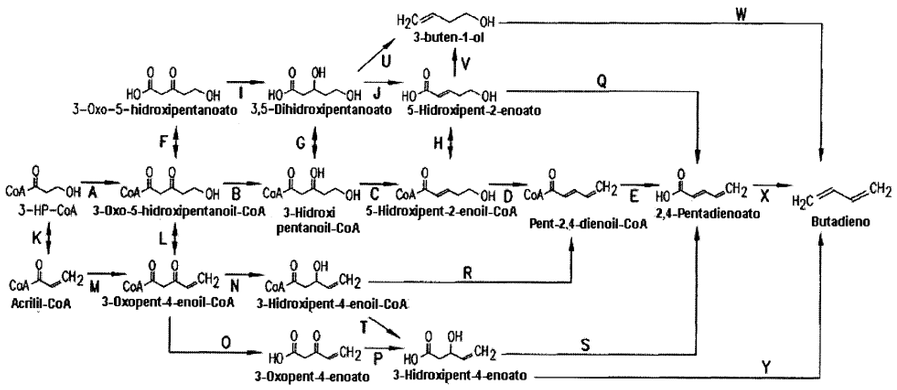

3-buten-1-ol
W
U
V
3-Oxo-5-hidroxipentanoato
I
3,5-Dihidroxipentanoato
J
5-Hidroxipent-2-enoato
Q
F
G
H
3-HP-CoA
A
3-Oxo-5-hidroxipentanoil-CoA
B
3-Hidroxi pentanoil-CoA
C
5-Hidroxipent-2-enoil-CoA
D
Pent-2,4-dienoil-CoA
E
2,4-Pentadienoato
X
Butadieno
K
L
Acrilil-CoA
M
3-Oxopent-4-enoil-CoA
N
3-Hidroxipent-4-enoil-CoA
R
T
O
P
S
3-Oxopent-4-enoato
3-Hidroxipent-4-enoato
Y

FIG.19

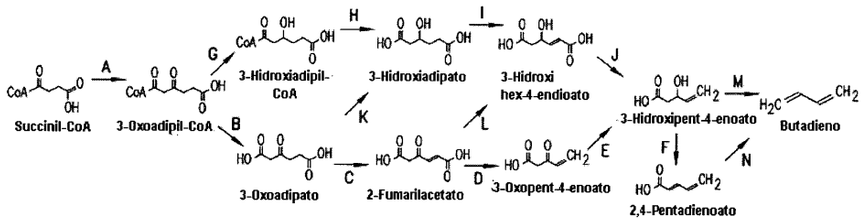

Succinil-CoA
A
3-Oxoadipil-CoA
G
3-Hidroxiadipil-CoA
H
3-Hidroxiadipato
I
3-Hidroxi hex-4-endioato
J
3-Hidroxipent-4-enoato
M
Butadieno
B
3-Oxoadipato
C
2-Fumarilacetato
D
3-Oxopent-4-enoato
E
K
L
F
N
2,4-Pentadienoato

FIG.20

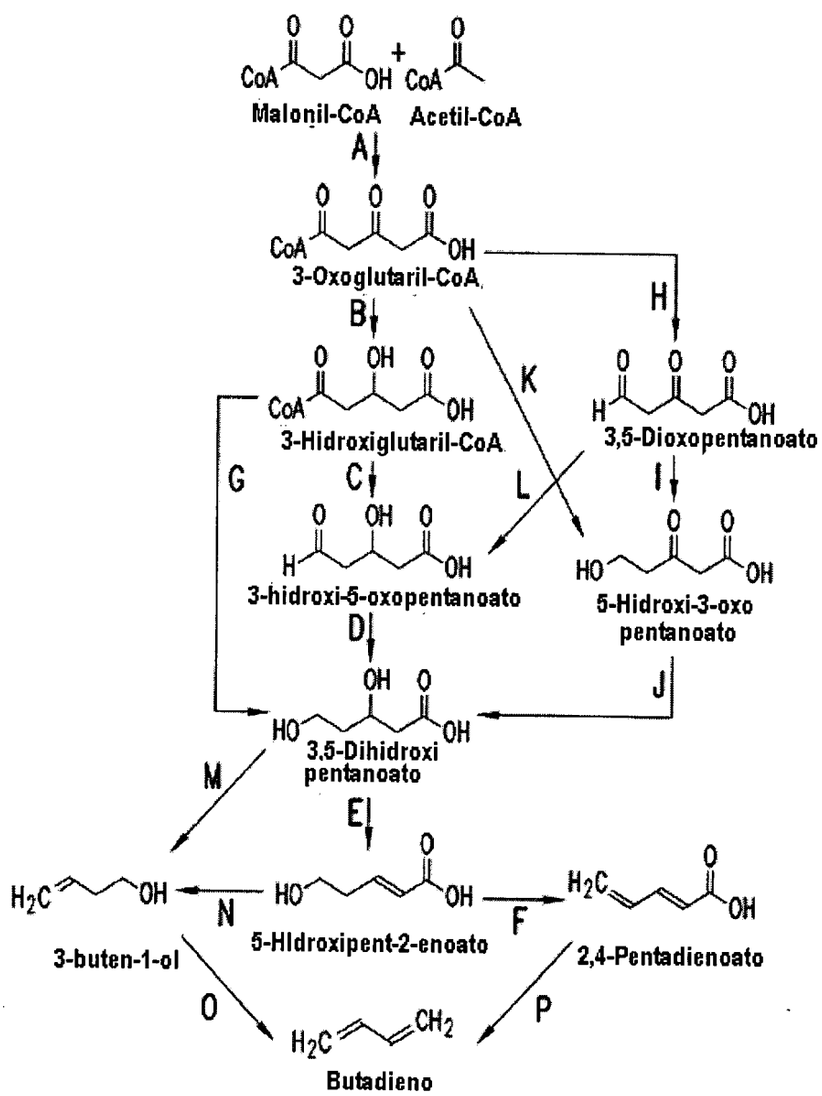

Malonil-CoA
Acetil-CoA
A
3-Oxoglutaril-CoA
B
H
3-Hidroxiglutaril-CoA
K
3,5-Dioxopentanoato
G
C
L
I
3-hidroxi-5-oxopentanoato
5-Hidroxi-3-oxo pentanoato
D
J
3,5-Dihidroxi pentanoato
M
E
3-buten-1-ol
N
5-HIdroxipent-2-enoato
F
2,4-Pentadienoato
O
P
Butadieno

FIG.21

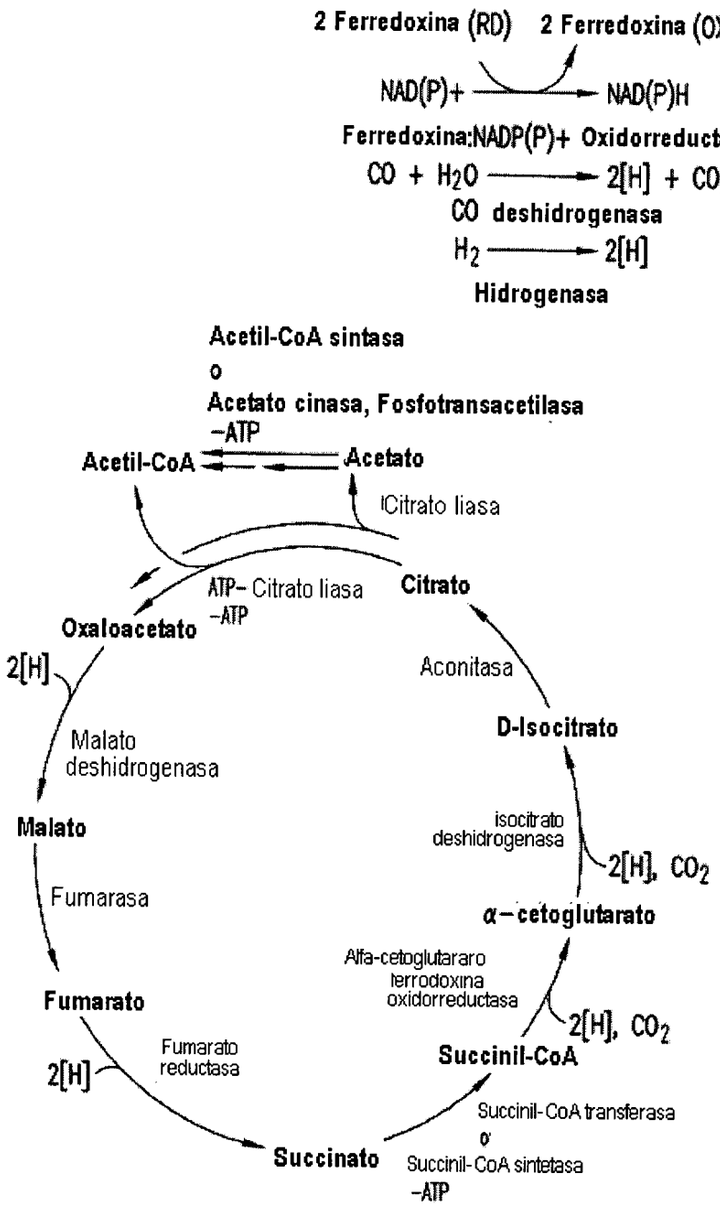

2 Ferredoxina (RD)
2 Ferredoxina (OX)
NAD(P)+
NAD(P)H
Ferredoxina:NADP(P)+ Oxidorreductasa
CO + H2O
2[H] + CO2
CO deshidrogenasa
H2
2[H]
Hidrogenasa
Acetil-CoA sintasa
o
Acetato cinasa, Fosfotransacetilasa
-ATP
Acetil-CoA
Acetato
Citrato liasa
ATP- Citrato liasa
-ATP
Citrato
Oxaloacetato
2[H]
Malato deshidrogenasa
Aconitasa
D-Isocitrato
Malato
isocitrato deshidrogenasa
2[H], CO2
Fumarasa
α-cetoglutarato
Alfa-cetoglutararo ferrodoxina oxidorreductasa
Fumarato
2[H], CO2
Fumarato reductasa
Succinil-CoA
2[H]
Succinil-CoA transferasa
o
Succinil-CoA sintetasa
-ATP
Succinato

FIG.22

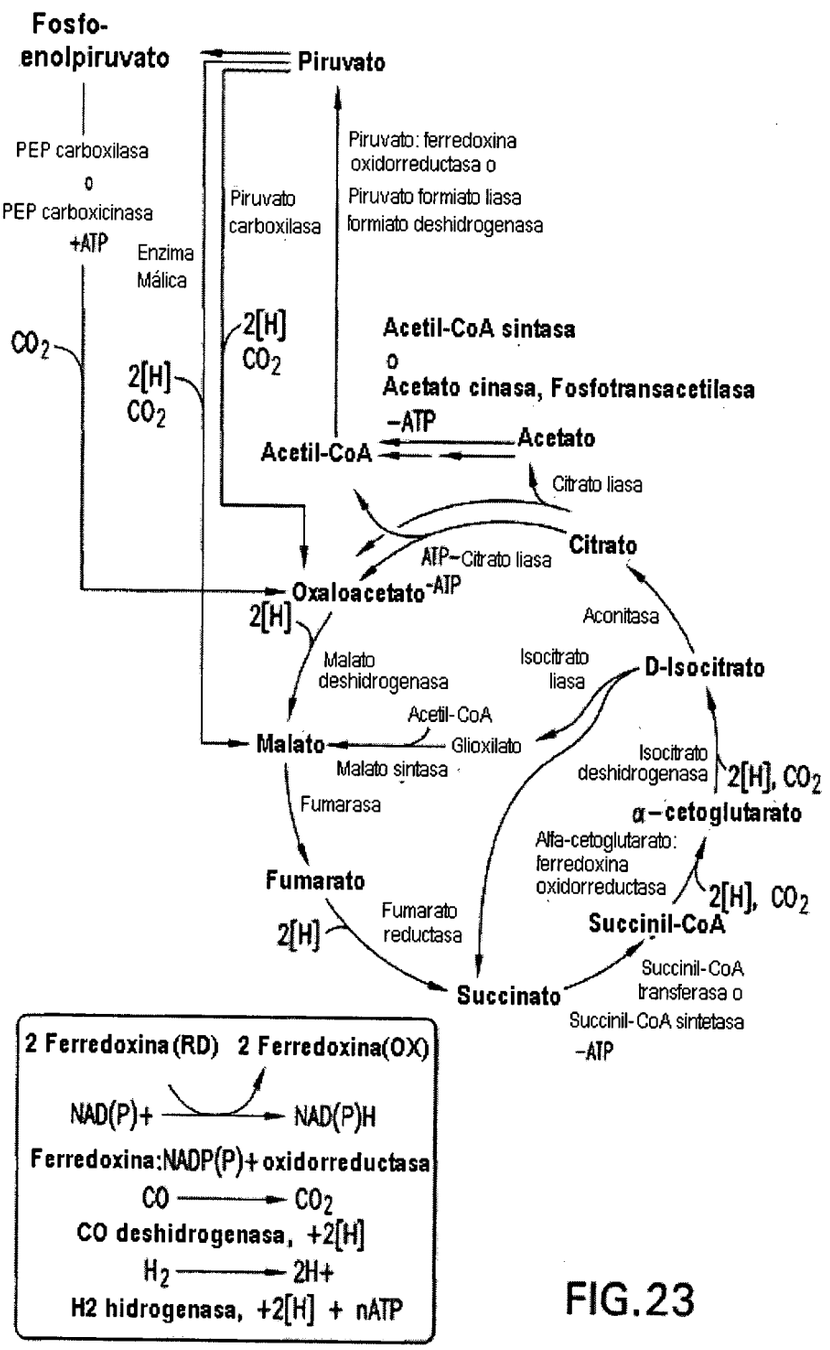

Fosfo-
enolpiruvato
Piruvato
PEP carboxilasa
o
PEP carboxicinasa
+ATP
Enzima
Málica
Piruvato
carboxilasa
Piruvato: ferredoxina
oxidorreductasa o
Piruvato formiato liasa
formiato deshidrogenasa
CO_2
2[H]
CO_2
2[H]
CO_2
Acetil-CoA sintasa
o
Acetato cinasa, Fosfotransacetilasa
-ATP
Acetil-CoA
Acetato
Citrato liasa
Citrato
ATP-Citrato liasa
-ATP
Oxaloacetato
2[H]
Aconitasa
Malato
deshidrogenasa
Isocitrato
liasa
D-Isocitrato
Acetil-CoA
Malato
Glioxilato
Malato sintasa
Isocitrato
deshidrogenasa
2[H], CO_2
Fumarasa
α-cetoglutarato
Alfa-cetoglutarato:
ferredoxina
oxidorreductasa
Fumarato
2[H], CO_2
Fumarato
reductasa
Succinil-CoA
Succinil-CoA
transferasa o
Succinil-CoA sintetasa
-ATP
Succinato
2 Ferredoxina(RD) 2 Ferredoxina(OX)
NAD(P)+ NAD(P)H
Ferredoxina:NADP(P)+ oxidorreductasa
CO CO_2
CO deshidrogenasa, +2[H]
H_2 2H+
H2 hidrogenasa, +2[H] + nATP

FIG.23

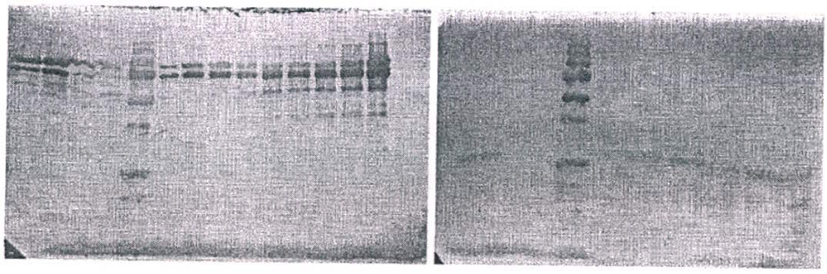
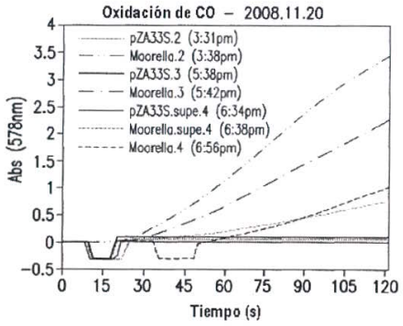


FIG.24


Oxidación de CO – 2008.11.20
pZA33S.2 (3:31pm)
Moorella.2 (3:38pm)
pZA33S.3 (5:38pm)
Moorella.3 (5:42pm)
pZA33S.supe.4 (6:34pm)
Moorella.supe.4 (6:38pm)
Moorella.4 (6:56pm)
Abs (578nm)
Tiempo (s)

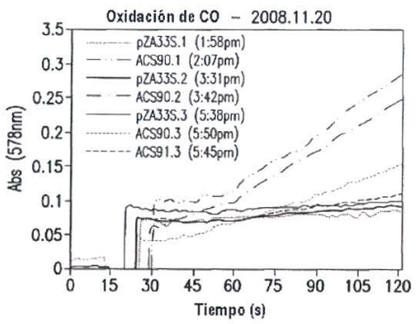

Oxidación de CO – 2008.11.20
pZA33S.1 (1:58pm)
ACS90.1 (2:07pm)
pZA33S.2 (3:31pm)
ACS90.2 (3:42pm)
pZA33S.3 (5:38pm)
ACS90.3 (5:50pm)
ACS91.3 (5:45pm)
Abs (578nm)
Tiempo (s)

FIG.25

BRIGARD & CASTRO
BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros), **GENOMATICA, INC.**

domiciliado(s) en, 10520 Wateridge Circle San Diego, CA 92121, United States of America

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales, lemas comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre, domicilio y/o dirección; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, domiciliado(s) en la Calle 70A No. 4 - 41, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

POWER OF ATTORNEY

I (We), **GENOMATICA, INC.**

domiciled in, 10520 Wateridge Circle San Diego, CA 92121, United States of America

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names, slogans and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name, domicile and/or address related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages: claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoint **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, domiciled in Calle 70A No. 4 - 41, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in San Diego, CA

this 5th day of July 200~~8~~ 2012

Signature M X Hernandez

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy de de
personalmente compareció ante mí,

a quien conozco, y de quien me consta que firmó el anterior documento, debidamente juramentado declaró y dijo que él (ella) es

de, **GENOMATICA, INC.**

Sociedad legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y representación de la expresada compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del objeto social de la sociedad.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las pruebas de la existencia de la sociedad.

Estado de
con fecha

y que quien confiere el presente poder es su representante.

Notario Público (sello)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 5th day of July of 2012 personally appeared before me,
Mary Susan Howard
to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument who being by me duly sworn did depose and say that he (she) is the
Vice President, Intelectual Property
of, **GENOMATICA, INC.**

Which is legally constituted for a term not yet expired, that deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney: that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purpose of company.

The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existence of the company.

State of Delaware
under date of 7/07

and that he (she) who grants the present power of attorney is its Representative.

DAWN COUGHLIN
Commission # 1960533
Notary Public - California
San Diego County
My Comm. Expires Nov 17, 2015

Notary Public (Seal)
Dawn Coughlin

CERTIFICADO NOTARIAL PERSONA NATURAL

Hoy de de , compareció(eron) ante mí

a quien (es) conozco y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede y quien(es) declara(n) que otorgan el mismo para los fines y propósitos que en él se expresan.

Notario Público (sello)

LEGALIZACIÓN POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

NOTARIAL CERTIFICATE NATURAL PERSON

On this day of of
personally appeared before me

who is(are) known to me and who I attest executed the foregoing document and he (they) declared he (they) grant(s) the document for the uses and purposes therein expressed.

Notary Public (Seal)

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.

State of California
Secretary of State

APOSTILLE (Convention de La Haye du 5 octobre 1961)			
1. Country: Pays / País:	United States of America		
This public document Le présent acte public / El presente documento público			
2. has been signed by a été signé par ha sido firmado por	*Dawn Coughlin*		
3. acting in the capacity of agissant en qualité de quien actúa en calidad de	*Notary Public, State of California*		
4. bears the seal / stamp of est revêtu du sceau / timbre de y está revestido del sello / timbre de	*Dawn Coughlin, Notary Public, State of California*		
Certified Attesté / Certificado			
5. at à / en	Sacramento, California	**6. the** le / el día	*27th day of July 2012*
7. by par / por	Secretary of State, State of California		
8. N° sous n° bajo el número	*37105*		
9. Seal / stamp: Sceau / timbre: Sello / timbre:		**10. Signature:** Signature: Firma:	Debra Bowen

This Apostille is the trilingual model Apostille Certificate as suggested by the Permanent Bureau and developed in response to the 2009 Special Commission on the practical operation of the Hague Apostille Convention.
This Apostille only certifies the authenticity of the signature and the capacity of the person who has signed the public document, and, where appropriate, the identity of the seal or stamp which the public document bears.
This Apostille does not certify the content of the document for which it was issued.
This Apostille is not valid for use anywhere within the United States of America, its territories or possessions.
To verify the issuance of this Apostille, see: www.sos.ca.gov/business/notary/apostille-search/.

Cette apostille est le modèle d'Apostille trilingue tel que suggéré par le Bureau Permanent et élaboré en réponse à la Commission spéciale de 2009 sur le fonctionnement pratique de la Convention de La Haye Apostille.
Cette Apostille atteste uniquement la véracité de la signature, la qualité en laquelle le signataire de l'acte a agi et, le cas échéant, l'identité du sceau ou timbre dont cet acte public est revêtu.
Cette Apostille ne certifie pas le contenu de l'acte pour lequel elle a été émise.
L'utilisation de cette Apostille n'est pas valable en / au États-Unis d'Amérique, ses territoires où possessions.
Cette Apostille peut être vérifiée à l'adresse suivante: www.sos.ca.gov/business/notary/apostille-search/.

Esta apostilla es el modelo trilingüe Certificado de Apostilla según lo sugerido por la Oficina Permanente y desarrollado en respuesta a la Comisión especial de 2009 sobre el funcionamiento práctico del Convenio de La Haya sobre Apostilla
Esta Apostilla certifica únicamente la autenticidad de la firma, la calidad en que el signatario del documento haya actuado y, en su caso, la identidad del sello o timbre del que el documento público esté revestido.
Esta Apostilla no certifica el contenido del documento para el cual se expidió.
No es válido el uso de esta Apostilla en Estados Unidos de América, sus territorios o posesiones.
Esta Apostilla se puede verificar en la dirección siguiente: www.sos.ca.gov/business/notary/apostille-search/.

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE PODER A NOMBRE DE **GENOMATICA, INC.**

CERTIFICADO NOTARIAL

Hay un sello que dice:
DAWN COUGHLIN
Comisión No. 1960533
Notario Público – California
Condado de San Diego
Mi comisión vence el 17 de noviembre de 2015

123All
376

A 7397497

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

January 28, 2013

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON MARCH 01, 2011.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office

P. R. Grant

P. R. GRANT
Certifying Officer

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
DEPARTMENT OF COMMERCE

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
Robin E. OSTERHOUT	02/03/2011
Anthony P. BURGARD	12/01/2010
Priti PHARKYA	12/01/2010
Mark J. BURK	02/08/2011

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Genomatica, Inc.
Street Address:	10520 Wateridge Circle
City:	San Diego
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	92121

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	61381407

CH $40.00 61381407

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (858)314-1150
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 858-314-1200
Email: scgenua@jonesday.com
Correspondent Name: Sandra C. Genua
Address Line 1: 222 East 41st Street
Address Line 4: New York, NEW YORK 10017

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	871943-888099
NAME OF SUBMITTER:	Sandra Genua

Total Attachments: 3
source=12956-099-888 Assignment#page1.tif

501452398

source=12956-099-888 Assignment#page2.tif
source=12956-099-888 Assignment#page3.tif

Docket No.: 066662-0331

ASSIGNMENT

WHEREAS We, Robin E. Osterhout of San Diego, CA; Anthony P. Burgard of Bellefonte, PA; Priti Pharkya of San Diego, CA; and Mark J. Burk of San Diego, CA; have made a certain new and useful invention as set forth in an application for United States Letters Patent, entitled MICROORGANISMS AND METHODS FOR THE BIOSYNTHESIS OF 2,4-PENTADIENOATE, AROMATICS AND 1,3-BUTADIENE, for which an application for United States Letters Patent was filed on September 9, 2010, 2010, and identified by United States Application No. 61/381,407;

AND WHEREAS, Genomatica, Inc., a corporation of the State of Delaware and having an address of 10520 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121 is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to said invention and in and to any and all Letters Patent of the United States and foreign countries which may be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, for good and valuable consideration, the receipt for and sufficiency of which is hereby acknowledged, We do hereby sell, assign, transfer and set over unto Genomatica, Inc., its legal representatives, successors, and assigns, the entire right, title and interest in and to said invention as set forth in the above-mentioned application, including the right of priority and including any continuations, continuations-in-part, divisions, reissues, re-examinations or extensions thereof, and in and to any and all patents of the United States and foreign countries which may be issued for said invention;

UPON SAID CONSIDERATIONS, We hereby agree with the said assignee that We will not execute any writing or do any act whatsoever conflicting with these presents, and that We will, at any time upon request, without further or additional consideration but at the expense of said assignee, execute such additional assignments and other writings and do such additional acts as said assignee may deem necessary or desirable to perfect the assignee's enjoyment of this grant, and render all necessary assistance in making application for and obtaining original, divisional, continuations, continuations-in-part, reexamined, reissued, or extended Letters Patent of the United States or of any and all foreign countries on said invention, and in enforcing any rights or choses in action accruing as a result of such applications or patents, by giving testimony in any proceedings or transactions involving such applications or patents, and by executing preliminary statements and other affidavits, it being understood that the foregoing covenant and agreement shall bind, and inure to the benefit of the assigns and legal representatives of assignor and assignee;

AND We request the Commissioner for Patents and Trademarks to issue any Letters Patent of the United States which may be issued for said invention to said Genomatica, Inc., its legal representatives, successors or assigns, as the sole owner of the entire right, title and interest in and to said patent and the invention covered thereby.

Application No. 61/381,407

2/3/2011
Date

Robin E. Osterhout

State of California)
)ss.
County of San Diego)
On Feb. 3, 2011 before me, Atia M. Huey,
personally appeared Robin E. Osterhout who proved
to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and Acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.
I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.
Witness my hand and official seal.

ATIA M. HUEY
Commission # 1854418
Notary Public - California
San Diego County
My Comm. Expires Jun 16, 2013

Notary Public

NOTARY PUBLIC SEAL

12/01/10
Date

Anthony P. Burgard

State of California)
)ss.
County of San Diego)
On Dec 1, 2010 before me, Atia M. Huey,
personally appeared Anthony P. Burgard who proved
to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and Acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.
I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.
Witness my hand and official seal.

ATIA M. HUEY
Commission # 1854418
Notary Public - California
San Diego County
My Comm. Expires Jun 16, 2013

Notary Public

NOTARY PUBLIC SEAL

Application No. 61/381,407

Dec 1, 2010 — Priti Pharkya
Date

State of California)
)ss.
County of San Diego)
On Dec 1, 2010 before me, Ana M. Huey,
personally appeared Priti Pharkya who
proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and Acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.
I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.
Witness my hand and official seal.

Notary Public

ATIA M. HUEY
Commission # 1854418
Notary Public - California
San Diego County
My Comm. Expires Jun 16, 2013
NOTARY PUBLIC SEAL

February 08, 2011 — Mark J. Burk
Date

State of California)
)ss.
County of San Diego)
On Feb. 08, 2011 before me, Ana M. Huey,
personally appeared Mark J. Burk who proved
to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and Acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.
I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.
Witness my hand and official seal.

Notary Public

ATIA M. HUEY
Commission # 1854418
Notary Public - California
San Diego County
My Comm. Expires Jun 16, 2013
NOTARY PUBLIC SEAL

RECORDED: 03/01/2011

PATENT
REEL: 025878 FRAME: 0102

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE CESIÓN A **GENOMATICA, INC.**, firmado por los cedentes y el cesionario.

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
A TODO AQUEL QUE PUEDA LLEGAR LA PRESENTE:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE ESTADOS UNIDOS
Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

28 de enero de 2013

LA PRESENTE CERTIFICA QUE EL ANEXO ES UNA COPIA VERDADERA TOMADA DE LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO ARCHIVADO EL 01 DE MARZO DE 2011.

Por la autoridad del
Subsecretario de Comercio para la Propiedad Intelectual
y Director de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

(Firma)
P.R. GRANT
Funcionario que certifica

Hay un sello que dice:
Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos
Departamento de Comercio

CESIÓN DE PATENTE

Versión electrónica v1.1

Versión de la hoja v1.1

TIPO DE PRESENTACIÓN:	CESIÓN NUEVA
NATURALEZA DEL ACUERDO:	CESIÓN

DATOS DE LA PARTE CEDENTE

Nombre	Fecha de ejecución
Robin E. Osterhout	02/03/2011
Anthony P. Burgard	12/01/2010
Priti Pharkya	12/01/2010
Mark J. Burk	02/08/2011

DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE

Nombre:	Genomatica, Inc.
Dirección:	10520 Wateridge Circle
Ciudad:	San Diego
Estado/País:	CALIFORNIA
Código Postal:	92121

NÚMERO DE PROPIEDADES Total: 1

Tipo de Propiedad	Número
Número de solicitud:	61381407

DATOS DE CORRESPONDENCIA

Número de Fax: (858) 314 1150

La correspondencia será enviada por Correo de Estados Unidos cuando los intentos de hacerlo por fax no sean exitosos.

Teléfono: (858) 314 1200

Correo electrónico: scgenua@jonesday.com

Nombre del destinatario: Sandra C. Genua

Dirección Línea 1: 222 East 41st Street

Dirección Línea 4: New York, NEW YORK 10017

NÚMERO DE EXPEDIENTE DE ABOGADO:	871943-888099
NOMBRE DEL REMITENTE:	Sandra Genua

Anexos: 3

Fuente= 12956-099-888 Assignment#page1.tif

PATENTE

501452398

ROLLO: 025878 CUADRO: 0098

Fuente= 12956-099-888 Assignment#page2.tif
Fuente= 12956-099-888 Assignment#page3.tif

PATENTE

ROLLO: 025878 CUADRO: 0099

Expediente No. 066662-0331

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE NOSOTROS, **Robin E. Osterhout** de San Diego, CA; **Anthony P. Burgard** de Bellefonte, PA; **Priti Pharkya** de San Diego, CA y **Mark J. Burk** de San Diego, CA, hemos hecho cierta invención nueva y útil tal como se establece en una solicitud para Título de Patentes de los Estados Unidos, titulada: MICROORGANISMOS Y MÉTODOS PARA LA BIOSÍNTESIS DE AROMÁTICOS, 2,4-PENTADIENOATO Y 1,3-BUTADIENO, para la cual se presentó una solicitud para Título de Patentes de los Estados Unidos el 05 de mayo de 2010 e identificada con la solicitud de Estados Unidos No. 61/381,407;

Y CONSIDERANDO QUE, **Genomatica, Inc.**, una empresa del Estado de California con dirección 10520 Wateridge Circle, San Diego, California 92121, desea adquirir el derecho, título e interés total en y para dicha invención y en y para cualquier y todos los Títulos de Patentes de los Estados Unidos y países extranjeros que se puedan obtener para esta;

AHORA, POR LO TANTO, por una consideración buena y valiosa, el recibo y la suficiencia de la cual se reconoce por la presente, nosotros por la presente vendemos, cedemos, transferimos y traspasamos a Genomatica, Inc., sus representantes legales, sucesores y designados, el derecho, título e interés total en y para dicha invención tal como se describe en la solicitud mencionada arriba, incluido el derecho de prioridad y cualquier continuación, continuación en parte, división, reexpedición, reexaminación o extensión de la misma, y en y para cualquier y todas las patentes de los Estados Unidos y países extranjeros que se puedan expedir para dicha invención;

BAJO DICHAS CONSIDERACIONES, por la presente acordamos con dicho CESIONARIO que no ejecutaremos ningún escrito o haremos ningún acto que en absoluto entre en conflicto con la presente, y que ejecutaremos, en cualquier momento por requerimiento, sin consideración adicional o extra pero a expensas de dicho CESIONARIO, dichas cesiones adicionales y otros escritos y haremos dichos actos adicionales que dicho CESIONARIO pueda considerar necesario o deseable para perfeccionar el disfrute por parte del CESIONARIO de esta concesión, y suministrará toda la asistencia necesaria en la relación de la solicitud y obtención original, divisional, continuación, continuación en parte, reexaminación, reexpedición o extensión de Título de Patentes de los Estados Unidos o de cualquier y todos los países extranjeros sobre dicha invención, y en mantener vigente cualquier derecho o elegir en acción la acumulación como un resultado de dichas solicitudes o patentes, por dar testimonio en cualquier procedimiento o transacción que involucre dichas solicitudes o patentes, y por ejecutar declaraciones preliminares y demás, se entiende que el anterior pacto y acuerdo constituye obligación de las partes y redundará en beneficio de los designados y representantes legales del CEDENTE y CESIONARIO;

Y NOSOTROS solicitamos al Comisionado de Patentes y Marcas expedir cualquier Título de Patentes de los Estados Unidos que se pueda expedir para dicha invención a dicha Genomatica, Inc., sus representantes legales, sucesores y designados, como el único propietario del derecho, título e interés total en y para dicha patente y la invención amparada por la presente.

PATENTE

ROLLO: 025878 CUADRO: 0100

02/03/2011 (firma)
Fecha ROBIN E. OSTERHOUT

Estado de California
Condado de San Diego

El 03 de febrero de 2011, ante mí, Atia M. Huey, compareció personalmente Robert E. Osterhout, quien me comprobó sobre la base de evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre se suscribe al documento adjunto y reconoció ante mí que ejecutó el mismo en su capacidad autorizada y que mediante su firma en el documento la persona, o entidad a nombre de la cual la persona actuó, ejecutó el documento.

Yo certifico bajo la PENA DE PERJURIO contemplada en las leyes del estado de California que el anterior párrafo es verdadero y correcto.

Testigos mi firma y sello oficial.

(firma)
Notario público

Hay un sello que dice:
ATIA M. HUEY
Comisión No. 1854418
Notario público – California
Condado de San Diego
Mi comisión vence el 16 de junio de 2013

12/01/2010 (firma)
Fecha ANTHONY P. BURGARD

Estado de California
Condado de San Diego

El 01 de diciembre de 2010, ante mí, Atia M. Huey, compareció personalmente Anthony Burgard, quien me comprobó sobre la base de evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre se suscribe al documento adjunto y reconoció ante mí que ejecutó el mismo en su capacidad autorizada y que mediante su firma en el documento la persona, o entidad a nombre de la cual la persona actuó, ejecutó el documento.

Yo certifico bajo la PENA DE PERJURIO contemplada en las leyes del estado de California que el anterior párrafo es verdadero y correcto.

Testigos mi firma y sello oficial.

(firma)
Notario público

Hay un sello que dice:
ATIA M. HUEY
Comisión No. 1854418
Notario público – California
Condado de San Diego
Mi comisión vence el 16 de junio de 2013

PATENTE

ROLLO: 025878 CUADRO: 0101

12/01/2010
Fecha

(firma)
PRITI PHARKYA

Estado de California
Condado de San Diego

El 01 de diciembre de 2010, ante mí, Atia M. Huey, compareció personalmente Priti Pharkya, quien me comprobó sobre la base de evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre se suscribe al documento adjunto y reconoció ante mí que ejecutó el mismo en su capacidad autorizada y que mediante su firma en el documento la persona, o entidad a nombre de la cual la persona actuó, ejecutó el documento.

Yo certifico bajo la PENA DE PERJURIO contemplada en las leyes del estado de California que el anterior párrafo es verdadero y correcto.

Testigos mi firma y sello oficial.

(firma)
Notario público

Hay un sello que dice:
ATIA M. HUEY
Comisión No. 1854418
Notario público – California
Condado de San Diego
Mi comisión vence el 16 de junio de 2013

02/08/11
Fecha

(firma)
MARK J. BURK

Estado de California
Condado de San Diego

El 08 de febrero de 2011, ante mí, Atia M. Huey, compareció personalmente Mark J. Burk, quien me comprobó sobre la base de evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre se suscribe al documento adjunto y reconoció ante mí que ejecutó el mismo en su capacidad autorizada y que mediante su firma en el documento la persona, o entidad a nombre de la cual la persona actuó, ejecutó el documento.

Yo certifico bajo la PENA DE PERJURIO contemplada en las leyes del estado de California que el anterior párrafo es verdadero y correcto.

Testigos mi firma y sello oficial.

(firma)
Notario público

Hay un sello que dice:
ATIA M. HUEY
Comisión No. 1854418
Notario público – California
Condado de San Diego
Mi comisión vence el 16 de junio de 2013

ARCHIVADO: 03/01/2011

PATENTE

ROLLO: 025878 CUADRO: 0102

388

123411 388

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 003545

Bogotá D.C., Enero 14 de 2013 - 17:10:58

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	446244901	14/01/2013	34.942.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr UNDITARIO	Vr CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	7 TTLOS-TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	500.000.00	500.000.00
				$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-037828- -00000-0000

Fecha: 2013-02-25 15:59:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 388

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-037828- -00000-0000

Fecha: 2013-02-25 15:59:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 388

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE U

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐