



No. 14-082149- -00000-0000

Fecha: 2014-04-15 16:12:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 19/82.



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TITULO** _____

MICRO-DIAGNOSTICOS Y METODOS PARA PRODUCIR ALQUENOS

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** GENOMATICA INC.

DOMICILIO SAN DIEGO CALIFORNIA ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

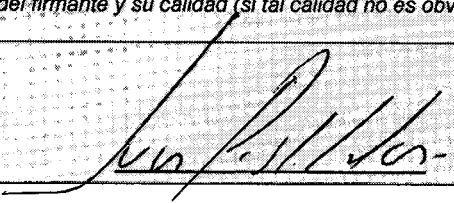
22. **BOGOTÁ, D.C.** _____

	Espacio	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 14-082149- -00000-0000 Fecha: 2014-04-15 16:12:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 181 182	adicación ☒
---	---------	--	---

AS. 127.542

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2012/055469	Fecha 14.09.2012
Publicación Internacional No.		WO 2013/040383	Fecha 21.03.2013
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos) MICROORGANISMOS Y MÉTODOS PARA PRODUCIR ALQUENOS		
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
1. GENOMATICA, INC.		APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE IDENTIFICACIÓN TIPO
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN 10520 Wateridge Circle San Diego, CA 92121 (US)		No. TELÉFONO	
CIUDAD SAN DIEGO		CORREO ELECTRÓNICO	
DEPARTAMENTO/ESTADO CA		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN US	
PAÍS DE RESIDENCIA US			
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. BURK.		Mark, J.	US
2. OSTERHOUT		Robin, E.	US
3.			
4.			
5.			
6.			
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. US	CALIFORNIA	SAN DIEGO	10520 Wateridge Circle San Diego, CA 92121 (US)
2. US	CALIFORNIA	SAN DIEGO	10520 Wateridge Circle San Diego, CA 92121 (US)
3.			
4.			
5.			
6.			
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	61/535,893 16.09.2011
2.			
3.			

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>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.</i>			
☐ 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		
<i>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.</i>			
☐ 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		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ 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. 14-0022308	Fecha: 27.02.2014
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 161		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 10		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 1		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ 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



(10) International Publication Number

WO 2013/040383 A1

(43) International Publication Date
21 March 2013 (21.03.2013)

(51) International Patent Classification:
C12N 15/74 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2012/055469

(22) International Filing Date:
14 September 2012 (14.09.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/535,893 16 September 2011 (16.09.2011) 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): BURK, Mark, J. [US/US]; 10520 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121 (US). OSTERHOUT, Robin, E. [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, BN, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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))

(54) Title: MICROORGANISMS AND METHODS FOR PRODUCING ALKENES

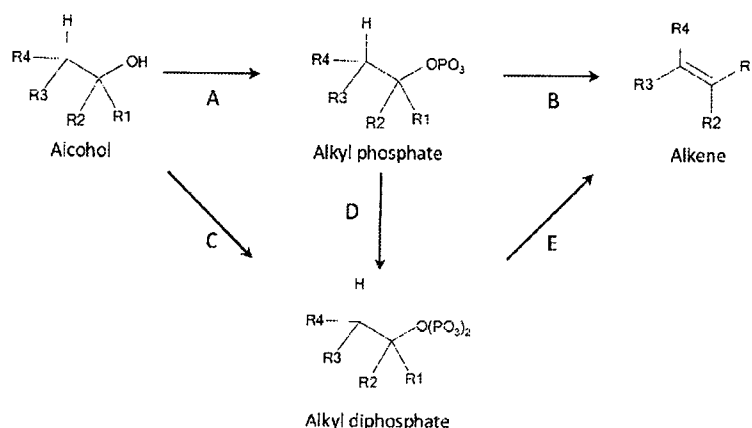


Figure 1

(57) Abstract: Non-naturally occurring microbial organisms are disclosed containing an alkene pathway having at least one exogenous nucleic acid encoding an alkene pathway enzyme expressed in a sufficient amount to convert an alcohol to an alkene. The disclosure additionally provides methods of using such microbial organisms to produce an alkene, by culturing a non-naturally occurring microbial organism containing an alkene pathway as described herein under conditions and for a sufficient period of time to produce an alkene.

MICROORGANISMOS Y MÉTODOS PARA PRODUCIR ALQUENOS**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad
5 de la solicitud Provisional de Estados Unidos No. de serie
61/535,893, presentada el 16 de septiembre de 2011, los
contenidos completos de la cual se incorporan en la presente
por referencia.

La presente invención se refiere generalmente a
10 procesos biosintética, y más específicamente a organismos que
tienen una capacidad biosintética de alqueno.

Los alquenos son comúnmente producidos por craqueo
de los alcanos que se encuentran en el petróleo crudo. El
craqueo utiliza el calor y un catalizador para descomponer
15 los alcanos. Generalmente, los alquenos son hidrocarburos
insaturados con un enlace doble ($R-C=C-R$). Debido a la
propiedad inherente de los alquenos que son más reactivos que
los alcanos debido a la presencia de un enlace doble, los
alquenos se utilizan frecuentemente en la manufactura de
20 plásticos. Por ejemplo, los alquenos se utilizan en la
manufactura de polietileno, cloruro de polivinilo (PVC) y
Teflón. Los alquenos inferiores, que se obtienen por el
craqueo de queroseno o gasolina, también se utilizan
comúnmente como combustible e iluminante. Algunos alquenos,
25 tales como 1,3-butadieno, estireno y propileno, son

particularmente útiles en la manufactura.

Se producen anualmente más de 25 billones de libras de butadieno (1,3-butadieno, BD) y se aplican en la manufactura de polímeros tales como cauchos sintéticos y resinas ABS, y productos químicos tales como hexametilendiamina y 1,4-butanodiol. El butadieno se produce típicamente como un subproducto del proceso de craqueo con vapor para la conversión de materias primas de petróleo tales como nafta, gas de petróleo licuado, etano o gas natural a etileno y otras olefinas. La capacidad de manufacturar butadieno a partir de materias primas alternativas y/o renovables, representaría un gran avance en la búsqueda de procesos de producción de productos químicos más sustentables.

Una posible forma de producir butadieno de manera renovable involucra la fermentación de azúcares u otras materias primas para producir dioles, tales como 1,4-butanodiol o 1,3-butanodiol, los cuales se separan, se purifican, y luego se deshidratan a butadieno en una segunda etapa que implica la catálisis a base de metal. La producción fermentativa directa de butadieno a partir de materias primas renovables evitaría la necesidad de etapas de deshidratación y el gas butadieno (bp -4.4°C) se emitiría continuamente desde el fermentador y fácilmente se podría condensar y recolectar. El desarrollo de un proceso de producción

MICROORGANISMOS Y MÉTODOS PARA PRODUCIR ALQUENOS

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad
5 de la solicitud Provisional de Estados Unidos No. de serie
61/535,893, presentada el 16 de septiembre de 2011, los
contenidos completos de la cual se incorporan en la presente
por referencia.

La presente invención se refiere generalmente a
10 procesos biosintética, y más específicamente a organismos que
tienen una capacidad biosintética de alqueno.

Los alquenos son comúnmente producidos por craqueo
de los alcanos que se encuentran en el petróleo crudo. El
craqueo utiliza el calor y un catalizador para descomponer
15 los alcanos. Generalmente, los alquenos son hidrocarburos
insaturados con un enlace doble ($R-C=C-R$). Debido a la
propiedad inherente de los alquenos que son más reactivos que
los alcanos debido a la presencia de un enlace doble, los
alquenos se utilizan frecuentemente en la manufactura de
20 plásticos. Por ejemplo, los alquenos se utilizan en la
manufactura de polietileno, cloruro de polivinilo (PVC) y
Teflón. Los alquenos inferiores, que se obtienen por el
craqueo de queroseno o gasolina, también se utilizan
comúnmente como combustible e iluminante. Algunos alquenos,
25 tales como 1,3-butadieno, estireno y propileno, son

particularmente útiles en la manufactura.

Se producen anualmente más de 25 billones de libras de butadieno (1,3-butadieno, BD) y se aplican en la manufactura de polímeros tales como cauchos sintéticos y resinas ABS, y productos químicos tales como hexametilendiamina y 1,4-butanodiol. El butadieno se produce típicamente como un subproducto del proceso de craqueo con vapor para la conversión de materias primas de petróleo tales como nafta, gas de petróleo licuado, etano o gas natural a etileno y otras olefinas. La capacidad de manufacturar butadieno a partir de materias primas alternativas y/o renovables, representaría un gran avance en la búsqueda de procesos de producción de productos químicos más sustentables.

Una posible forma de producir butadieno de manera renovable involucra la fermentación de azúcares u otras materias primas para producir dioles, tales como 1,4-butanodiol o 1,3-butanodiol, los cuales se separan, se purifican, y luego se deshidratan a butadieno en una segunda etapa que implica la catálisis a base de metal. La producción fermentativa directa de butadieno a partir de materias primas renovables evitaría la necesidad de etapas de deshidratación y el gas butadieno (bp -4.4°C) se emitiría continuamente desde el fermentador y fácilmente se podría condensar y recolectar. El desarrollo de un proceso de producción

fermentativa eliminaría la necesidad de butadieno de origen fósil y permitiría ahorros sustanciales en el costo, energía, y residuos nocivos y emisiones en relación con el butadieno derivado petroquímicamente.

5 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
10 (estireno-etileno/butileno-estireno), estireno-divinilbenceno (S-DVB), y poliésteres insaturados. Estos materiales se utilizan en caucho, plásticos, aislantes, fibra de vidrio, tuberías, piezas de barcos y automóviles, recipientes para alimentos y base de alfombra.

15 El estireno es más comúnmente producido por la deshidrogenación catalítica de etilbenceno. El etilbenceno se mezcla en la fase de gas con 10-15 veces su volumen en vapor a alta temperatura, y se pasa sobre un lecho de catalizador sólido. La mayoría de los catalizadores de deshidrogenación
20 de etilbenceno se basan en óxido de hierro (III), promovido por varios porcentajes de óxido de potasio o carbonato de potasio. El vapor cumple varias funciones en esta reacción. Es la fuente de calor para la alimentación de la reacción endotérmica, y remueve el coque que tiende a formarse en el
25 catalizador de óxido de hierro a través de la reacción de

desplazamiento del gas de agua. El promotor de potasio aumenta esta reacción de descoquización. El vapor también diluye el reactivo y los productos, cambiando la posición de equilibrio químico hacia los productos. Una planta de
5 estireno típica consiste de dos o tres reactores en serie, que funcionan bajo vacío para mejorar la conversión y la selectividad. Las conversiones por paso típicas son casi 65% para dos reactores y 70-75% para tres reactores.

El propileno se produce principalmente como un
10 subproducto de la refinación de petróleo y de la producción de etileno por craqueo con vapor de materias primas de hidrocarburos. El propeno se separa por destilación fraccionada de mezclas de hidrocarburos obtenidas del craqueo y otros procesos de refinación. Las materias primas de
15 hidrocarburos típicas son de combustibles fósiles no renovables, tal como el petróleo, gas natural y en un grado mucho menor de carbón. Se manufacturan anualmente más de 75 billones de libras de propileno, convirtiéndose en el segundo más grande producto químico de origen fósil producido detrás
20 del etileno. El propileno es un producto químico base que se convierte en una amplia gama de polímeros, intermediarios de polímeros y productos químicos. Algunos de los derivados más comunes del producto químico y propileno grado polímero son polipropileno, ácido acrílico, butanol, butanodiol,
25 acrilonitrilo, óxido de propileno, isopropanol y cumeno. El

uso del derivado de propileno, polipropileno, en la producción de plásticos, tal como moldeo por inyección, y fibras, tales como alfombras, representa más de un tercio del consumo de EE.UU. para este derivado. El propileno también se
5 utiliza en la producción de caucho sintético y como un propulsor o componente en aerosoles.

La capacidad de manufacturar propileno a partir de materias primas alternativas y/o renovables, representaría un gran avance en la búsqueda de procesos de producción de
10 productos químicos más sustentables. Una forma posible para producir propileno de manera renovable implica la fermentación de azúcares u otras materias primas para producir los alcoholes 2-propanol (isopropanol) o 1-propanol, que se separa, se purifica, y luego se deshidrata a propileno
15 en una segunda etapa que implica la catálisis a base de metal. La producción fermentativa directa del propileno a partir de materias primas renovables evitaría la necesidad de deshidratación. Durante la producción fermentativa, el gas de propileno se emitiría continuamente desde el fermentador, el
20 cual fácilmente se podría recolectar y condensar. El desarrollo de un proceso de producción fermentativa también eliminaría la necesidad de propileno de origen fósil y permitiría ahorros sustanciales en el costo, energía, y residuos nocivos y emisiones en relación con el propileno
25 derivado petroquímicamente.

Por lo tanto, existe una necesidad de métodos alternativos para producir efectivamente cantidades comerciales de alquenos. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención proporciona organismos microbianos de origen no natural que contienen una trayectoria de alqueno que tiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de alqueno expresada en una cantidad suficiente para convertir un alcohol a un alqueno. En algunos aspectos de la invención, el organismo microbiano comprende una trayectoria de alqueno seleccionada de: (1) una alcohol cinasa y una fosfato liasa; (2) una difosfocinasa y una difosfato liasa; y (3) una alcohol cinasa, una alquil fosfato cinasa y una difosfato liasa. La invención proporciona adicionalmente métodos de uso de tales organismos microbianos para producir un alqueno, cultivando un organismo microbiano de origen no natural que contiene una trayectoria de alqueno como se describe en la presente bajo condiciones y durante un período de tiempo suficiente para producir un alqueno.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la conversión de un sustrato de alcohol a un alqueno vía intermediarios de fosfato de alquilo

o difosfato de alquilo. Las enzimas son A. alcohol cinasa, B. fosfato liasa, C. difosfocinasa, D. alquil fosfato cinasa y E. difosfato liasa. R^1 , R^2 , R^3 , y R^4 son cada uno independientemente (a) hidrógeno, ciano, halo, o nitro; (b)

5 alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, o heterociclilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Q; o (c) $-C(O)R^{1a}$, $-C(O)OR^{1a}$, $-C(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-C(NR^{1a})NR^{1b}R^{1c}$, $-OR^{1a}$, $-OC(O)R^{1a}$, $-OC(O)OR^{1a}$, $-OC(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-OC(=NR^{1a})NR^{1b}R^{1c}$, $-OS(O)R^{1a}$, $-OS(O)_2R^{1a}$, $-OS(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-OS(O)_2NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1a}C(O)R^{1d}$, $-NR^{1a}C(O)OR^{1d}$, $-NR^{1a}C(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1a}C(=NR^{1d})NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1a}S(O)R^{1d}$, $-NR^{1a}S(O)_2R^{1d}$, $-NR^{1a}S(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1a}S(O)_2NR^{1b}R^{1c}$, $-SR^{1a}$, $-S(O)R^{1a}$, $-S(O)_2R^{1a}$, $-S(O)NR^{1b}R^{1c}$, o $-S(O)_2NR^{1b}R^{1c}$; en donde cada R^{1a} , R^{1b} , R^{1c} , y R^{1d} es independientemente hidrógeno, alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, o heterociclilo; o R^{1a} y R^{1c} junto con los átomos de C y N a los cuales se unen forman heterociclilo; o R^{1b} y R^{1c} junto con el

20 átomo de N al cual se unen forman heterociclilo; en donde cada Q se selecciona independientemente de (a) oxo, ciano, halo, y nitro; (b) alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, y heterociclilo, cada uno de

25 los cuales adicionalmente es sustituido opcionalmente con uno

o más, en una modalidad, uno, dos, tres, o cuatro, sustituyentes Q^a ; y (c) $-C(O)R^a$, $-C(O)OR^a$, $-C(O)NR^bR^c$, $-C(NR^a)NR^bR^c$, $-OR^a$, $-OC(O)R^a$, $-OC(O)OR^a$, $-OC(O)NR^bR^c$, $-OC(=NR^a)NR^bR^c$, $-OS(O)R^a$, $-OS(O)_2R^a$, $-OS(O)NR^bR^c$, $-OS(O)_2NR^bR^c$, $-NR^bR^c$, $-NR^aC(O)R^d$, $-NR^aC(O)OR^d$, $-NR^aC(O)NR^bR^c$, $-NR^aC(=NR^d)NR^bR^c$, $-NR^aS(O)R^d$, $-NR^aS(O)_2R^d$, $-NR^aS(O)NR^bR^c$, $-NR^aS(O)_2NR^bR^c$, $-SR^a$, $-S(O)R^a$, $-S(O)_2R^a$, $-S(O)NR^bR^c$, y $-S(O)_2NR^bR^c$, en donde cada R^a , R^b , R^c , y R^d es independientemente (i) hidrógeno; (ii) alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, o heterociclilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o más, en una modalidad, uno, dos, tres, o cuatro, sustituyentes Q^a ; o (iii) R^b y R^c junto con el átomo de N al cual se unen forman heterociclilo, opcionalmente sustituido con uno o más, en una modalidad, uno, dos, tres, o cuatro, sustituyentes Q^a ; en donde cada Q^a se selecciona independientemente del grupo que consiste de (a) oxo, ciano, halo, y nitro; (b) alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, y heterociclilo; y (c) $-C(O)R^e$, $-C(O)OR^e$, $-C(O)NR^fR^g$, $-C(NR^e)NR^fR^g$, $-OR^e$, $-OC(O)R^e$, $-OC(O)OR^e$, $-OC(O)NR^fR^g$, $-OC(=NR^e)NR^fR^g$, $-OS(O)R^e$, $-OS(O)_2R^e$, $-OS(O)NR^fR^g$, $-OS(O)_2NR^fR^g$, $-NR^fR^g$, $-NR^eC(O)R^h$, $-NR^eC(O)OR^f$, $-NR^eC(O)NR^fR^g$, $-NR^eC(=NR^h)NR^fR^g$, $-NR^eS(O)R^h$, $-NR^eS(O)_2R^h$, $-NR^eS(O)NR^fR^g$, $-NR^eS(O)_2NR^fR^g$, $-SR^e$, -

S(O)R^e, -S(O)₂R^e, -S(O)NR^fR^g, y -S(O)₂NR^fR^g; en donde cada R^e, R^f, R^g, y R^h es independientemente (i) hidrógeno; (ii) alquilo de C₁₋₆, alqueno de C₂₋₆, alquino de C₂₋₆, cicloalquilo de C₃₋₇, arilo de C₆₋₁₄, aralquilo de C₇₋₁₅, heteroarilo, o
5 heterociclilo; o (iii) R^f y R^g junto con el átomo de N al cual se unen forman heterociclilo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere al diseño y producción de células y organismos que tienen capacidades de producción biosintética para alquenos. La invención, en particular, se refiere al diseño de organismo microbiano capaz de producir alqueno introduciendo uno o más ácidos
15 nucleicos que codifican una enzima de la trayectoria de alqueno.

En una modalidad, la invención utiliza modelos estequiométricos *in silico* del metabolismo de *Escherichia coli* que identifican diseños metabólicos para la producción
20 biosintética de alquenos. Los resultados descritos en la presente indican que las trayectorias metabólicas se pueden diseñar y modificar recombinantemente para lograr la biosíntesis de alquenos en *Escherichia coli* y otras células u organismos. La producción biosintética de alquenos, por
25 ejemplo, por los diseños *in silico* se puede confirmar por la

construcción de cepas que tienen el genotipo metabólico diseñado. Estas células u organismos metabólicamente modificados también se pueden someter a la evolución adaptativa para aumentar aún más la biosíntesis de alqueno, 5 incluyendo bajo condiciones que se acercan al crecimiento máximo teórico.

En ciertas modalidades, las características de la biosíntesis de alqueno de las cepas diseñadas las hacen genéticamente estables y particularmente útiles en 10 bioprocesos continuos. Las estrategias de diseño de cepas separadas se identificaron con la incorporación de diferentes capacidades de reacción no nativas o heterólogas en *E. coli* u otros organismos huéspedes que conducen a las trayectorias metabólicas que producen alqueno a partir de alcoholes que se 15 producen de manera natural o que se producen a través de ingeniería genética. Se identificaron diseños metabólicos *in silico* que resultaron en la biosíntesis de alquenos en microorganismos de este sustrato o intermediarios metabólicos.

20 Las cepas identificadas vía el componente computacional de la plataforma se pueden poner en producción real por ingeniería genética de cualquiera de las alteraciones metabólicas predichas, que conducen a la producción biosintética de alquenos u otros productos 25 intermedios y/o corriente abajo. En aún una modalidad

adicional, las cepas que exhiben producción biosintética de estos compuestos se pueden someter además a la evolución adaptativa para aumentar aún más la biosíntesis de producto. Los niveles de rendimiento de la biosíntesis de productos
5 después de la evolución adaptativa también se pueden predecir por el componente computacional del sistema.

Como se utiliza en la presente, el término "de origen no natural" cuando se utiliza en referencia a un organismo microbiano o microorganismo de la invención se
10 pretende que signifique que el organismo microbiano tiene al menos una alteración genética que no se encuentra normalmente en una cepa de origen natural de las especies referenciadas, incluyendo las cepas de tipo silvestre de la especie referenciadas. Las alteraciones genéticas incluyen, por
15 ejemplo, modificaciones introduciendo ácidos nucleicos expresables que codifican polipéptidos metabólicos, otras adiciones de ácido nucleico, supresiones de ácidos nucleicos y/u otra alteración funcional del material genético del organismo microbiano. Tales modificaciones incluyen, por
20 ejemplo, regiones codificantes y fragmentos funcionales de las mismas, para polipéptidos heterólogos, homólogos o tanto heterólogos como homólogos de las especies referenciadas. Las modificaciones adicionales incluyen, por ejemplo, regiones reguladoras no codificantes en las cuales las modificaciones
25 alteran la expresión de un gen u operón. Los polipéptidos

metabólicos ejemplares incluyen enzimas o proteínas dentro de una trayectoria biosintética de alqueno.

Una modificación metabólica se refiere a una reacción bioquímica que se altera de su estado de origen natural. Por lo tanto, los microorganismos de origen no natural pueden tener modificaciones genéticas a ácidos nucleicos que codifican polipéptidos metabólicos, o fragmentos funcionales de los mismos. En la presente se describen modificaciones metabólicas ejemplares.

10 Como se utiliza en la presente, el término "aislado" cuando se utiliza en referencia a un organismo microbiano se pretende que signifique un organismo que está sustancialmente libre de al menos un componente como el organismo microbiano referenciado se encuentra en la naturaleza. El término incluye un organismo microbiano que es
15 removido de algunos o todos los componentes como se encuentra en su ambiente natural. El término también incluye un organismo microbiano que es removido de algunos o todos los componentes como el organismo microbiano se encuentran en
20 ambientes de origen no natural. Por lo tanto, un organismo microbiano aislado se separa parcial o completamente de otras sustancias como se encuentra en la naturaleza o como se cultiva, almacena o subsiste en ambientes de origen no natural. Los ejemplos específicos de organismos microbianos
25 aislados incluyen microbios parcialmente puros, microbios

sustancialmente puros y microbios cultivados en un medio que es de origen no natural.

Como se utiliza en la presente, los términos "microbiano", "organismo microbiano", o "microorganismo" se pretende que signifiquen cualquier organismo que existe como una célula microscópica que se incluye dentro de los dominios de arqueas, bacterias o eucariotas. Por lo tanto, el término se pretende que abarque organismos o células procariotas o eucariotas que tienen un tamaño microscópico e incluye bacterias, arqueas y eubacterias de todas las especies, así como también microorganismos eucariotas tales como levaduras y hongos. El término también incluye cultivos de células de cualquier especie que pueden ser cultivadas para la producción de un bioquímico.

Como se utiliza en la presente, el término "sustancialmente anaeróbico" cuando se utiliza en referencia a una condición de cultivo o crecimiento se pretende que signifique que la cantidad de oxígeno es menor que aproximadamente 10% de la saturación de oxígeno disuelto en el medio líquido. El término también se pretende que incluya cámaras selladas de medio líquido o sólido mantenidas con una atmósfera menor que aproximadamente 1% de oxígeno.

"Exógeno", como se utiliza en la presente se pretende que signifique que la molécula referenciada o la actividad referenciada se introduce en el organismo

microbiano huésped. La molécula se puede introducir, por ejemplo, por la introducción de un ácido nucleico codificante en el material genético huésped tal como por integración en un cromosoma huésped o como material genético no cromosómico tal como un plásmido. Por lo tanto, el término como se utiliza en referencia a la expresión de un ácido nucleico codificante se refiere a la introducción del ácido nucleico codificante en una forma expresable en el organismo microbiano. Cuando se utiliza en referencia a una actividad biosintética, el término se refiere a una actividad que se introduce en el organismo referenciado huésped. 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 huésped. Por lo tanto, el término "endógeno" se refiere a una molécula o actividad referenciada que está presente en el huésped. De manera similar, el término cuando se utiliza en referencia a la expresión de un ácido nucleico codificante se refiere a la expresión de un ácido nucleico codificante contenido dentro del organismo microbiano. El término "heterólogo" se refiere a una molécula o actividad derivada de una fuente diferente de la especie referenciada mientras que "homólogo" se refiere a una molécula o actividad derivada del organismo microbiano huésped. Por consiguiente, la expresión exógena de un ácido nucleico codificante de la

invención puede utilizar cualquiera o ambos de un ácido nucleico codificante heterólogo u homólogo.

Se entiende que cuando más de un ácido nucleico exógeno se incluye en un organismo microbiano, más de un
5 ácido nucleico exógeno se refiere al ácido nucleico codificante o actividad biosintética referenciada, como se discutió anteriormente. Se entiende, además, como se describe en la presente, que tales más de un ácido nucleico exógeno se pueden introducir en el organismo microbiano huésped en
10 moléculas separadas de ácido nucleico, en moléculas de ácido nucleico policistrónico, o una combinación de los mismos, y aún se consideran como más de un ácido nucleico exógeno. Por ejemplo, como se describe en la presente un organismo microbiano se puede modificar genéticamente para expresar dos
15 o más ácidos nucleicos exógenos que codifican una trayectoria de enzima o proteína deseada. En el caso donde dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una actividad deseada se introducen en un organismo microbiano huésped, se entiende que los dos ácidos nucleicos exógenos se pueden introducir
20 como un ácido nucleico único, por ejemplo, en un plásmido único, en plásmidos separados, se pueden integrar en el cromosoma huésped en un sitio único o sitios múltiples, y aún ser considerados como dos ácidos nucleicos exógenos. De manera similar, se entiende que más de dos ácidos nucleicos
25 exógenos se pueden introducir en un organismo huésped en

cualquier combinación deseada, por ejemplo, en un plásmido único, en plásmidos separados, se pueden integrar en el cromosoma huésped en un sitio único o sitios múltiples, y aún ser considerados como dos o más ácidos nucleicos exógenos, 5 por ejemplo tres ácidos nucleicos exógenos. Por lo tanto, el número de ácidos nucleicos exógenos o actividades biosintéticas referenciadas se refiere al número de ácidos nucleicos codificantes o el número de actividades biosintéticas, no al número de ácidos nucleicos separados 10 introducidos en el organismo huésped.

Los organismos microbianos de origen no natural de la invención pueden contener alteraciones genéticas estables, que se refiere a microorganismos que se pueden cultivar durante más de cinco generaciones sin pérdida de la 15 alteración. Generalmente, las alteraciones genéticas estables incluyen modificaciones que persisten más de 10 generaciones, las modificaciones particularmente estables persistirán más de aproximadamente 25 generaciones, y más particularmente, las modificaciones genéticas estables serán mayores que 50 20 generaciones, incluyendo indefinidamente.

Los expertos en la técnica entenderán que las alteraciones genéticas, incluyendo las modificaciones metabólicas ejemplificadas en la presente, se describen con referencia a un organismo huésped adecuado tal como *E. coli* y 25 sus reacciones metabólicas correspondientes o un organismo

fuente adecuado para el material genético deseado, tales como genes de una trayectoria metabólica deseada. Sin embargo, dada la secuenciación completa del genoma de una amplia variedad de organismos y el alto nivel de habilidad en el área de la genómica, los expertos en la técnica fácilmente serán capaces de aplicar las enseñanzas y orientaciones proporcionadas en la presente para esencialmente todos los otros organismos. Por ejemplo, las alteraciones metabólicas de *E. coli* ejemplificadas en la presente se pueden aplicar fácilmente a otras especies incorporando el mismo o análogo ácido nucleico codificante de especies diferentes de las especies referenciadas. Tales alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, alteraciones genéticas de especies homólogas, en general, y, en particular, desplazamientos de genes ortólogos, parálogos o no otólogos.

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, el epóxido hidrolasa de ratón y epóxido hidrolasa humana se pueden considerar ortólogos para la función biológica de la hidrólisis de epóxidos. Los genes están relacionados por descendencia vertical cuando, por ejemplo, comparten similitud de secuencia de cantidad suficiente para indicar que son homólogos, o relacionados por evolución de un ancestro común.

Los genes también se pueden considerar ortólogos si comparten estructura tridimensional, pero no necesariamente la similitud de secuencia, de una cantidad suficiente para indicar que han evolucionado de un ancestro común en la
5 medida en que la similitud de secuencia primaria no sea identificable. Los genes que son ortólogos pueden codificar proteínas con similitud de secuencia de aproximadamente 25% a 100% de identidad de secuencia de aminoácidos. Los genes que codifican proteínas que comparten una similitud de
10 aminoácidos menor que 25% también se puede considerar que han surgido por descendencia vertical si su estructura tridimensional también muestra similitudes. Los miembros de la familia de enzimas de serina proteasa, incluyendo el activador del plasminógeno de tejido y elastasa, se considera
15 que han surgido por descendencia vertical de un ancestro común.

Los ortólogos incluyen genes o sus productos génicos codificados que a través de, por ejemplo, la evolución, se han ido distanciando en la estructura o
20 actividad general. Por ejemplo, cuando una especie codifica un producto génico que presenta dos funciones, y donde tales funciones se han separado en distintos genes en una segunda especie, los tres genes y sus correspondientes productos se consideran ortólogos. Para la producción de un producto
25 bioquímico, los expertos en la técnica entenderán que el gen

ortólogo que alberga la actividad metabólica que es introducida o alterada será elegido para la construcción del microorganismo de origen no natural. Un ejemplo de ortólogos que exhiben actividades separables es donde distintas actividades se han separado en distintos productos génicos distintos entre dos o más especies o dentro de una especie única. Un ejemplo específico es la separación de la proteólisis de elastasa y la proteólisis de plasminógeno, dos tipos de actividad de la serina proteasa, en moléculas distintas como activador de plasminógeno y elastasa. Un segundo ejemplo es la separación de la actividad de 5'-3' exonucleasa de micoplasma y ADN polimerasa III de *Drosophila*. La ADN polimerasa de la primera especie se puede considerado un ortólogo para cualquiera o ambos de la exonucleasa o la polimerasa de la segunda especie y viceversa.

En contraste, los parálogos son homólogos relacionados por, por ejemplo, la duplicación seguida por divergencia evolutiva y tienen funciones similares o comunes, pero no idénticas. Los parálogos se pueden originar o derivar de, por ejemplo, la misma especie o de una especie diferente. Por ejemplo, la epóxido hidrolasa microsómica (epóxido hidrolasa I) y epóxido hidrolasa soluble (epóxido hidrolasa II) se pueden considerar parálogos debido a que representan dos enzimas distintas, co-evolucionadas a partir de un ancestro común, que catalizan distintas reacciones y tienen

distintas funciones en la misma especie. Los parálogos son proteínas de la misma especie con similitud de secuencia significativa entre sí lo que sugiere que son homólogas, o relacionadas a través de la co-evolución de un ancestro común. Los grupos de familias de proteínas parálogas incluyen homólogos de HipA, genes de luciferasa, peptidasas, y otros.

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

Por lo tanto, en la identificación y la construcción de los organismos microbianos de origen no natural de la invención que tiene la capacidad biosintética de alqueno, los expertos en la técnica entenderán con la aplicación de la enseñanza y la orientación proporcionada en la presente para una especie particular, que la identificación de modificaciones metabólicas puede incluir la identificación y la inclusión o la inactivación de ortólogos. En la medida en que los desplazamientos de genes parálogos y/o no ortólogos estén presentes en el microorganismo referenciado que codifica una enzima que cataliza una reacción metabólica similar o sustancialmente similar, los expertos en la técnica también pueden utilizar estos genes evolutivamente relacionados.

Los desplazamientos de genes ortólogos, parálogos y no ortólogos se pueden determinar por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la inspección de secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos de dos polipéptidos revelará la identidad y similitudes de secuencia 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 por los expertos en la técnica, tales como Align, BLAST, Clustal W y

otros comparan y determinan una similitud o identidad de secuencia en bruto, y también determinan la presencia o la importancia de huecos en la secuencia que se les puede asignar un peso o puntuación. Tales algoritmos también son

5 conocidos en la técnica y son igualmente aplicables para la determinación de la similitud o identidad de secuencia de nucleótidos. Los parámetros de similitud suficiente para determinar la relación se calculan con base en los métodos bien conocidos para calcular la similitud estadística, o la

10 oportunidad de encontrar una coincidencia similar en un polipéptido aleatorio, y la importancia de la coincidencia determinada. Una comparación por computadora de dos o más secuencias también puede, si se desea, ser optimizada visualmente por los expertos en la técnica. Se puede esperar

15 que los productos génicos o proteínas relacionados tengan una alta similitud, por ejemplo, 25% a 100% de identidad de secuencia. Las proteínas que no están relacionadas pueden tener una identidad que es esencialmente la misma que la que se esperaría que ocurriera por casualidad, si una base de

20 datos de tamaño suficiente se escanea (aproximadamente 5%). Las secuencias entre 5% y 24% pueden o no pueden representar suficiente homología para concluir que las secuencias comparadas están relacionadas. El análisis estadístico adicional para determinar la importancia de tales

25 coincidencias dado el tamaño del conjunto de datos se puede

realizar para determinar la relevancia de estas secuencias.

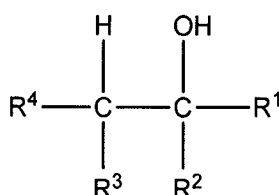
Los parámetros ejemplares para la determinación de la relación de dos o más secuencias utilizando el algoritmo BLAST, por ejemplo, pueden ser como se describe continuación.

5 En pocas palabras, las alineaciones de secuencia de aminoácidos se pueden realizar utilizando BLASTP versión 2.0.8 (Ene-05-1999) y los siguientes parámetros: Matriz: 0 BLOSUM62; hueco abierto: 11; extensión del hueco: 1; x_caída de alineamiento: 50; esperado: 10.0; tamaño de palabra: 3; 10 filtro: activado. Las alineaciones de secuencias de ácidos nucleicos se pueden realizar utilizando BLASTN versión 2.0.6 (septiembre-16-1998) y los siguientes parámetros: Coincidencia: 1; no coincidencia: -2; hueco abierto: 5; extensión del hueco: 2; x_caída de alineamiento: 50; 15 esperado: 10.0; tamaño de palabra: 11; filtro: inactivado. Los expertos en la técnica sabrán que se pueden hacer modificaciones a los parámetros anteriores ya sea para aumentar o disminuir el rigor de la comparación, por ejemplo, y determinar la relación de dos o más secuencias.

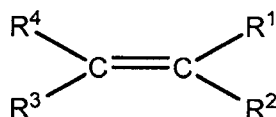
20 En algunas modalidades, la invención proporciona organismos microbianos de origen no natural que contienen una trayectoria de alqueno que tiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de alqueno expresada en una cantidad suficiente para convertir un 25 alcohol a un alqueno como se representa en la Figura 1. En

algunos aspectos de la invención, el organismo microbiano comprende una trayectoria de alqueno seleccionada de: (1) una alcohol cinasa y una fosfato liasa; (2) una difosfocinasa y una difosfato liasa; y (3) una alcohol cinasa, una alquil fosfato cinasa y una difosfato liasa. En algunos aspectos de la invención, el organismo microbiano convierte un alcohol de la Fórmula (I)

10



a un alqueno de la Fórmula (II)



15 en donde R^1 , R^2 , R^3 , y R^4 son cada uno independientemente (a) hidrógeno, ciano, halo, o nitro; (b) alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, o heterociclilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o
20 más sustituyentes Q; o (c) $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{1a}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{1a}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{1b}\text{R}^{1c}$, $-\text{C}(\text{NR}^{1a})\text{NR}^{1b}\text{R}^{1c}$, $-\text{OR}^{1a}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^{1a}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^{1a}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^{1b}\text{R}^{1c}$, $-\text{OC}(=\text{NR}^{1a})\text{NR}^{1b}\text{R}^{1c}$, $-\text{OS}(\text{O})\text{R}^{1a}$, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{R}^{1a}$, $-\text{OS}(\text{O})\text{NR}^{1b}\text{R}^{1c}$, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{NR}^{1b}\text{R}^{1c}$, $-\text{NR}^{1b}\text{R}^{1c}$, $-\text{NR}^{1a}\text{C}(\text{O})\text{R}^{1d}$, $-\text{NR}^{1a}\text{C}(\text{O})\text{OR}^{1d}$, $-\text{NR}^{1a}\text{C}(\text{O})\text{NR}^{1b}\text{R}^{1c}$, $-\text{NR}^{1a}\text{C}(=\text{NR}^{1d})\text{NR}^{1b}\text{R}^{1c}$, $-\text{NR}^{1a}\text{S}(\text{O})\text{R}^{1d}$, $-\text{NR}^{1a}\text{S}(\text{O})_2\text{R}^{1d}$,
25 $-\text{NR}^{1a}\text{S}(\text{O})\text{NR}^{1b}\text{R}^{1c}$, $-\text{NR}^{1a}\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^{1b}\text{R}^{1c}$, $-\text{SR}^{1a}$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}^{1a}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^{1a}$, -

$S(O)NR^{1b}R^{1c}$, o $-S(O)_2NR^{1b}R^{1c}$; en donde cada R^{1a} , R^{1b} , R^{1c} , y R^{1d} es independientemente hidrógeno, alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} heteroarilo, o heterociclilo; o R^{1a} y R^{1c}

5 junto con los átomos de C y N a los cuales se unen forman heterociclilo; o R^{1b} y R^{1c} junto con el átomo de N al cual se unen forman heterociclilo; en donde cada Q se selecciona independientemente de (a) oxo, ciano, halo, y nitro; (b) alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} ,

10 cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, y heterociclilo, cada uno de los cuales adicionalmente es sustituido opcionalmente con uno o más, en una modalidad, uno, dos, tres, o cuatro, sustituyentes Q^a ; y

15 (c) $-C(O)R^a$, $-C(O)OR^a$, $-C(O)NR^bR^c$, $-C(NR^a)NR^bR^c$, $-OR^a$, $-OC(O)R^a$, $-OC(O)OR^a$, $-OC(O)NR^bR^c$, $-OC(=NR^a)NR^bR^c$, $-OS(O)R^a$, $-OS(O)_2R^a$, $-OS(O)NR^bR^c$, $-OS(O)_2NR^bR^c$, $-NR^bR^c$, $-NR^aC(O)R^d$, $-NR^aC(O)OR^d$, $-NR^aC(O)NR^bR^c$, $-NR^aC(=NR^d)NR^bR^c$, $-NR^aS(O)R^d$, $-NR^aS(O)_2R^d$, $-NR^aS(O)NR^bR^c$, $-NR^aS(O)_2NR^bR^c$, $-SR^a$, $-S(O)R^a$, $-S(O)_2R^a$, $-S(O)NR^bR^c$, y $-S(O)_2NR^bR^c$, en donde cada R^a , R^b , R^c , y R^d es

20 independientemente (i) hidrógeno; (ii) alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, o heterociclilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o más, en una modalidad, uno, dos, tres, o cuatro,

25 sustituyentes Q^a ; o (iii) R^b y R^c junto con el átomo de N al

cual se unen forman heterociclilo, opcionalmente sustituido con uno o más, en una modalidad, uno, dos, tres, o cuatro, sustituyentes Q^a ; en donde cada Q^a se selecciona independientemente del grupo que consiste de (a) oxo, ciano, halo, y nitro; (b) alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, y heterociclilo; y (c) $-C(O)R^e$, $-C(O)OR^e$, $-C(O)NR^fR^g$, $-C(NR^e)NR^fR^g$, $-OR^e$, $-OC(O)R^e$, $-OC(O)OR^e$, $-OC(O)NR^fR^g$, $-OC(=NR^e)NR^fR^g$, $-OS(O)R^e$, $-OS(O)_2R^e$, $-OS(O)NR^fR^g$, $-OS(O)_2NR^fR^g$, $-NR^fR^g$, $-NR^eC(O)R^h$, $-NR^eC(O)OR^f$, $-NR^eC(O)NR^fR^g$, $-NR^eC(=NR^h)NR^fR^g$, $-NR^eS(O)R^h$, $-NR^eS(O)_2R^h$, $-NR^eS(O)NR^fR^g$, $-NR^eS(O)_2NR^fR^g$, $-SR^e$, $-S(O)R^e$, $-S(O)_2R^e$, $-S(O)NR^fR^g$, y $-S(O)_2NR^fR^g$; en donde cada R^e , R^f , R^g , y R^h es independientemente (i) hidrógeno; (ii) alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, o heterociclilo; o (iii) R^f y R^g junto con el átomo de N al cual se unen forman heterociclilo. También se entiende que R^1 , R^2 , R^3 , y R^4 son cada uno independientemente los mismos entre el alcohol y el alqueno. En otras palabras, el R^1 del alcohol es el mismo que el R^1 del alqueno, el R^2 del alcohol es el mismo que el R^2 del alqueno, el R^3 del alcohol es el mismo que el de R^3 del alqueno y el R^4 del alcohol es el mismo que el de R^4 del alqueno.

El término "alquilo" se refiere a un radical de

hidrocarburo monovalente saturado lineal o ramificado, en donde el alquilo puede ser opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Q como se describe en la presente. Por ejemplo, alquilo de C_{1-6} se refiere a un radical de 1 a 6 átomos de carbono de hidrocarburo monovalente saturado lineal o un radical de hidrocarburo monovalente saturado ramificado de 3 a 6 átomos de carbono. En ciertas modalidades, el alquilo es un radical de hidrocarburo monovalente saturado lineal que tiene 1 a 20 (C_{1-20}), 1 a 15 (C_{1-15}), 1 al 10 (C_{1-10}), o 1 a 6 (C_{1-6}) átomos de carbono, o radical de hidrocarburo monovalente saturado ramificado de 3 a 20 (C_{3-20}), 3 a 15 (C_{3-15}), 3 a 10 (C_{3-10}), o 3 a 6 (C_{3-6}) átomos de carbono. Como se utiliza en la presente, los grupos alquilo de C_{1-6} lineales y alquilo de C_{3-6} ramificados también son referidos "alquilo inferior". Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo (incluyendo todas las formas isoméricas), n-propilo, isopropilo, butilo (incluyendo todas las formas isoméricas), n-butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, pentilo (incluyendo todas las formas isoméricas), y hexilo (incluyendo todas las formas isoméricas).

El término "alquenilo" se refiere a un radical de hidrocarburo monovalente lineal o ramificado, que contiene uno o más, en una modalidad, uno a cinco, en otra modalidad, uno, enlaces dobles carbono-carbono. El alquenilo puede ser

opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Q como se describe en la presente. El término "alquenilo" abarca radicales que tienen una configuración "cis" o "trans" o una mezcla de las mismas, o, alternativamente, una configuración "Z" o "E" o una mezcla de las mismas, como se aprecia por los expertos normales en la técnica. Por ejemplo, alquenilo de C₂₋₆ se refiere a un radical de hidrocarburo monovalente insaturado lineal de 2 a 6 átomos de carbono o un radical de hidrocarburo monovalente insaturado ramificado de 3 a 6 átomos de carbono. En ciertas modalidades, el alquenilo es un radical de hidrocarburo monovalente lineal de 2 a 20 (C₂₋₂₀), 2 a 15 (C₂₋₁₅), 2 a 10 (C₂₋₁₀), o 2 a 6 (C₂₋₆) átomos de carbono, o un radical de hidrocarburo monovalente ramificado 3 a 20 (C₃₋₂₀), 3 a 15 (C₃₋₁₅), 3 a 10 (C₃₋₁₀), o 3 a 6 (C₃₋₆) átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, pero no se limitan a, etenilo, propen-1-ilo, propen-2-ilo, alilo, butenilo, y 4-metilbutenilo.

El término "alquinilo" se refiere a un radical de hidrocarburo monovalente lineal o ramificado, que contiene uno o más, en una modalidad, uno a cinco, en otra modalidad, uno, enlaces triples carbono-carbono. El alquinilo puede ser opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Q como se describe en la presente. Por ejemplo, alquinilo de C₂₋₆ se refiere a un radical de hidrocarburo monovalente insaturado lineal de 2 a 6 átomos de carbono o un radical de

hidrocarburo monovalente insaturado ramificado de 3 a 6 átomos de carbono. En ciertas modalidades, el alquinilo es un radical de hidrocarburo monovalente lineal de 2 a 20 (C_{2-20}), 2 a 15 (C_{2-15}), 2 a 10 (C_{2-10}), o 2 a 6 (C_{2-6}) átomos de carbono, o
5 un radical de hidrocarburo monovalente ramificado de 3 a 20 (C_{3-20}), 3 a 15 (C_{3-15}), 3 a 10 (C_{3-10}), o 3 a 6 (C_{3-6}) átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen, pero no se limitan a, etinilo ($-C\equiv CH$), propinilo (incluyendo todas las formas isoméricas, por ejemplo, 1-propinilo ($-C\equiv CCH_3$) y
10 propargilo ($-CH_2C\equiv CH$)), butinilo (incluyendo todas las formas isoméricas, por ejemplo, 1-butin-1-ilo y 2-butin-1-ilo), pentinilo (incluyendo todas las formas isoméricas, por ejemplo, 1-pentin-1-ilo y 1-metil-2-butin-1-ilo), y hexinilo (incluyendo todas las formas isoméricas, por ejemplo, 1-
15 hexin-1-ilo).

El término "cicloalquilo" se refiere a un radical hidrocarburo monovalente cíclico, que puede ser opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Q como se describe en la presente. En una modalidad, los grupos cicloalquilo pueden
20 ser saturados o insaturados, pero no aromáticos, y/o puenteados y/o no puenteados, y/o grupos bicíclicos fusionados. En ciertas modalidades, el cicloalquilo tiene de 3 a 20 (C_{3-20}), de 3 a 15 (C_{3-15}), de 3 a 10 (C_{3-10}), o de 3 a 7 (C_{3-7}) átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquilo
25 incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo,

ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo, cicloheptilo, cicloheptenilo, biciclo[2.1.1]hexilo, biciclo[2.2.1]heptilo, decalinilo, y adamantilo.

5 El término "arilo" se refiere a un grupo aromático monocíclico monovalente y/o un grupo aromático policíclico monovalente que contiene al menos un anillo de carbono aromático. En ciertas modalidades, el arilo tiene de 6 a 20 (C₆₋₂₀), de 6 a 15 (C₆₋₁₅), o de 6 a 10 (C₆₋₁₀) átomos en el
10 anillo. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, fluorenilo, azulenilo, antrilo, fenantrilo, pirenilo, bifenilo, y terfenilo. El arilo también se refiere a anillos de carbono bicíclicos o tricíclicos, donde uno de los anillos es aromático y los otros de los
15 cuales pueden ser saturados, parcialmente insaturados, o aromáticos, por ejemplo, dihidronaftilo, indenilo, indanilo, o tetrahidronaftilo (tetralinilo). En ciertas modalidades, el arilo puede ser opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Q como se describe en la presente.

20 El término "aralquilo" o "arilalquilo" se refiere a un grupo alquilo monovalente sustituido con uno o más grupos arilo. En ciertas modalidades, el aralquilo tiene de 7 a 30 (C₇₋₃₀), de 7 a 20 (C₇₋₂₀), o de 7 a 16 (C₇₋₁₆) átomos de carbono. Los ejemplos de grupos aralquilo incluyen, pero no
25 se limitan a, bencilo, 2-feniletilo, y 3-fenilpropilo. En

ciertas modalidades, el aralquilo es opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Q como se describe en la presente.

El término "heteroarilo" se refiere a un grupo
5 aromático monocíclico monovalente o grupo aromático
policíclico monovalente que contiene al menos un anillo
aromático, en donde al menos un anillo aromático contiene uno
o más heteroátomos seleccionados independientemente de O, S y
N en el anillo. Los grupos heteroarilo se unen al resto de
10 una molécula a través del anillo aromático. Cada anillo de un
grupo heteroarilo puede contener uno o dos átomos de O, uno o
dos átomos de S, y/o uno a cuatro átomos de N, con la
condición de que el número total de heteroátomos en cada
anillo sea cuatro o menos y cada anillo contenga al menos un
15 átomo de carbono. En ciertas modalidades, el heteroarilo
tiene de 5 a 20, de 5 a 15, o de 5 a 10 átomos en el anillo.
Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos incluyen,
pero no se limitan a, furanilo, imidazolilo, isotiazolilo,
isoxazolilo, oxadiazolilo, oxadiazolilo, oxazolilo,
20 pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridilo, pirimidinilo,
pirrolilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, tetrazolilo,
triazinilo, y triazolilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo
bicíclicos incluyen, pero no se limitan a, benzofuranilo,
bencimidazolilo, benzoisoxazolilo, benzopiranilo,
25 benzotiadiazolilo, benzotiazolilo, benzotienilo,

benzotriazolilo, benzoxazolilo, furopiridilo,
imidazopiridinilo, imidazotiazolilo, indolizininilo, indolilo,
indazolilo, isobenzofuranilo, isobenzotienilo, isoindolilo,
isoquinolinilo, isotiazolilo, naftiridinilo,
5 oxazolopiridinilo, ftalazinilo, pteridinilo, purinilo,
piridopiridilo, pirrolopiridilo, quinolinilo, quinoxalinilo,
quinazolinilo, tiadiazolopirimidilo, y tienopiridilo. Los
ejemplos de grupos heteroarilo tricíclicos incluyen, pero no
se limitan a, acridinilo, bencindolilo, carbazolilo,
10 dibenzofuranilo, perimidinilo, fenantrolinilo,
fenantridinilo, fenarsazinilo, fenazinilo, fenotiazinilo,
fenoxazinilo, y xantenilo. En ciertas modalidades, el
heteroarilo también puede ser opcionalmente sustituido con
uno o más sustituyentes Q como se describe en la presente.

15 El término "heterociclilo" o "heterocíclico" se
refiere a un sistema de anillos no aromático monocíclico
monovalente o sistema de anillos policíclico monovalente que
contiene al menos un anillo no aromático, en donde uno o más
de los átomos del anillo no aromáticos son heteroátomos
20 seleccionados independientemente de O, S y N; y los átomos
del anillo restantes son átomos de carbono. En ciertas
modalidades, el grupo heterociclilo o heterocíclico tiene de
3 a 20, de 3 a 15, de 3 a 10, de 3 a 8, de 4 a 7, o de 5 a 6
átomos en el anillo. Los grupos heterociclilo se unen al
25 resto de una molécula a través del anillo no aromático. En

ciertas modalidades, el heterociclilo es un sistema de anillos monocíclico, bicíclico, tricíclico, o tetracíclico, que puede estar fusionado o puenteado, y en el cual los átomos de nitrógeno o azufre pueden ser opcionalmente oxidados, los átomos de nitrógeno pueden ser cuaternizados opcionalmente, y algunos anillos puede ser parcial o totalmente saturados, o aromáticos. El heterociclilo puede estar unido a la estructura principal en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que resulta en la creación de un compuesto estable. Los ejemplos de tales grupos heterocíclicos incluyen, pero no se limitan a, azepinilo, benzodioxanilo, benzodioxolilo, benzofuranonilo, benzopiranonilo, benzopiraniilo, benzotetrahidrofuranilo, benzotetrahidrotienilo, benzotiopiraniilo, benzoxazinilo, β -carbolinilo, cromanilo, cromonilo, cinolinilo, cumarinilo, decahidroisoquinolinilo, dihidrobenzisotiazinilo, dihidrobenzisoxazinilo, dihidrofurilo, dihidroisoindolilo, dihidropiraniilo, dihidropirazolilo, dihidropirazinilo, dihidropiridinilo, dihidropirimidinilo, dihidropirrolilo, dioxolanilo, 1,4-ditianiilo, furanonilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, indolinilo, isobenzotetrahidrofuranilo, isobenzotetrahidrotienilo, isocromanilo, isocumarinilo, isoindolinilo, isotiazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, octahidroindolilo, octahidroisoindolilo, oxazolidinonilo, oxazolidinilo, oxiranilo, piperazinilo,

piperidinilo, 4-piperidonilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, quinuclidinilo, tetrahidrofurilo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrahidropiraniilo, tetrahidrotienilo, tiamorfolinilo, tiazolidinilo, 5 tetrahidroquinolinilo, y 1,3,5-tritiano. En ciertas modalidades, el heterocíclico también puede ser opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Q como se describe en la presente.

El término "halógeno", "haluro" o "halo" se refiere a fluoro, cloro, bromo, y/o yodo.

El término "opcionalmente sustituido" se pretende que signifique que un grupo o sustituyente, tal como un grupo alquilo, alquileo, heteroalquileo, alqueno, alqueniilo, heteroalqueniilo, alquino, alquiniilo, cicloalquilo, 15 cicloalquileo, arilo, arileo, aralquilo, heteroarilo, heteroarileo, heterociclilo, o heterocicliilo, puede ser sustituido con uno o más sustituyentes Q, cada uno de los cuales se selecciona independientemente de, por ejemplo, (a) alquilo de C₁₋₆, alqueno de C₂₋₆, alquino de C₂₋₆, 20 cicloalquilo de C₃₋₇, arilo de C₆₋₁₄, aralquilo de C₇₋₁₅, heteroarilo, y heterociclilo, cada uno de los cuales adicionalmente se sustituye opcionalmente con uno o más, en una modalidad, uno, dos, tres, o cuatro, sustituyentes Q^a; y (b) oxo (=O), halo, ciano (-CN), nitro (-NO₂), -C(O)R^a, - 25 C(O)OR^a, -C(O)NR^bR^c, -C(NR^a)NR^bR^c, -OR^a, -OC(O)R^a, -OC(O)OR^a, -

$OC(O)NR^bR^c$, $-OC(=NR^a)NR^bR^c$, $-OS(O)R^a$, $-OS(O)_2R^a$, $-OS(O)NR^bR^c$, $-OS(O)_2NR^bR^c$, $-NR^bR^c$, $-NR^aC(O)R^d$, $-NR^aC(O)OR^d$, $-NR^aC(O)NR^bR^c$, $-NR^aC(=NR^d)NR^bR^c$, $-NR^aS(O)R^d$, $-NR^aS(O)_2R^d$, $-NR^aS(O)NR^bR^c$, $-NR^aS(O)_2NR^bR^c$, $-SR^a$, $-S(O)R^a$, $-S(O)_2R^a$, $-S(O)NR^bR^c$, y $-S(O)_2NR^bR^c$,
 5 en donde cada R^a , R^b , R^c , y R^d es independientemente (i) hidrógeno; (ii) alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, o heterociclilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o más, en una modalidad, uno, dos, tres, o
 10 cuatro, sustituyentes Q^a ; o (iii) R^b y R^c junto con el átomo de N al cual se unen forman heteroarilo o heterociclilo, opcionalmente sustituido con uno o más, en una modalidad, uno, dos, tres, o cuatro, sustituyentes Q^a . Como se utiliza en la presente, todos los grupos que se pueden sustituir son
 15 "opcionalmente sustituidos", a menos que se especifique lo contrario.

En una modalidad, cada Q^a se selecciona independientemente del grupo que consiste de (a) oxo, ciano, halo, y nitro; y (b) alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, y heterociclilo; y (c) $-C(O)R^e$, $-C(O)OR^e$, $-C(O)NR^fR^g$, $-C(NR^e)NR^fR^g$, $-OR^e$, $-OC(O)R^e$, $-OC(O)OR^e$, $-OC(O)NR^fR^g$, $-OC(=NR^e)NR^fR^g$, $-OS(O)R^e$, $-OS(O)_2R^e$, $-OS(O)NR^fR^g$, $-OS(O)_2NR^fR^g$, $-NR^fR^g$, $-NR^eC(O)R^h$, $-NR^eC(O)OR^h$, $-NR^eC(O)NR^fR^g$, $-NR^eC(=NR^h)NR^fR^g$, $-NR^eS(O)R^h$, $-NR^eS(O)_2R^h$, $-$
 20
 25

NR^eS(O)NR^fR^g, -NR^eS(O)₂NR^fR^g, -SR^e, -S(O)R^e, -S(O)₂R^e, -S(O)NR^fR^g,
y -S(O)₂NR^fR^g; en donde cada R^e, R^f, R^g, y R^h es
independientemente (i) hidrógeno; (ii) alquilo de C₁₋₆,
alquenilo de C₂₋₆, alquinilo de C₂₋₆, cicloalquilo de C₃₋₇,
5 arilo de C₆₋₁₄, aralquilo de C₇₋₁₅, heteroarilo, o
heterociclilo; o (iii) R^f y R^g junto con el átomo de N al cual
se unen forman heteroarilo o heterociclilo.

La Figura 1 muestra las trayectorias para la
conversión de un alcohol a un alqueno vía un intermediario
10 fosfato o difosfato. En la etapa A, un alcohol se activa a un
fosfato de alquilo por una cinasa. El fosfato de alquilo se
activa luego adicionalmente a un difosfato de alquilo (Etapa
D) o se convierte a un alqueno por una fosfato liasa o
alqueno sintasa (etapa B). Alternativamente, el alcohol se
15 convierte directamente al intermediario difosfato de alquilo
por una difosfocinasa (etapa C). La liberación del difosfato
del difosfato de alquilo por una alqueno sintasa o difosfato
liasa produce un alqueno. Los precursores de alcohol
ejemplares y los productos de alqueno se enumeran en la tabla
20 a continuación.

<u>Alcohol</u>	<u>Alqueno</u>
Etanol	Etileno
n-Propanol	Propileno
Isopropanol	Propileno
n-Butanol	But-1-eno

5

10

15

20

<u>Alcohol</u>	<u>Alqueno</u>
Isobutanol	Isobutileno
Terc-butanol	Isobutileno
Butan-2-ol	But-1-eno o but-2-eno
Pentan-1-ol	Pent-1-eno
3-metilbutan-1-ol	3-metilbut-1-eno
Pentan-2-ol	Pent-2-eno o pent-2-eno
Pentan-3-ol	Pent-2-eno
2-Metilbutan-1-ol	2-metilbut-1-eno
3-Metilbutan-2-ol	3-Metilbut-1-eno
2-Metilbutan-2-ol	2-Metilbut-1-eno o 2-Metilbut-2-eno
3-Metilbut-3-en-1-ol	Isopreno
2-Metilbut-3-en-2-ol	Isopreno
2-Metilbut-3-en-2-ol	3-Metilbuta-1,2-dieno
2-Metilbut-3-en-1-ol	Isopreno
3-Metilbut-3-en-2-ol	Isopreno
But-3-en-1-ol	1,3-Butadieno
But-3-en-2-ol	1,3-Butadieno
1-Feniletanol	Estireno
2-Feniletanol	Estireno
Alcohol dimetilalílico	Isopreno
But-2-en-1-ol	1,3-Butadieno

Por consiguiente, en algunos aspectos, la invención proporciona un organismo microbiano de origen no natural que contiene una trayectoria de alqueno que tiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de alqueno expresada en una cantidad suficiente

para convertir un alcohol a un alqueno como se muestra en la
tabla anterior. En algunos aspectos de la invención, el
organismo microbiano comprende una trayectoria de alqueno
seleccionada de: (1) una alcohol cinasa y una fosfato liasa;
5 (2) una difosfocinasa y una difosfato liasa; y (3) una
alcohol cinasa, una alquil fosfato cinasa y una difosfato
liasa. En algunos aspectos, el organismo microbiano de la
invención convierte el etanol a etileno, n-propanol a
propileno, isopropanol a propileno, n-butanol a but-1-eno,
10 isobutanol a isobutileno, terc-butanol a isobutileno, butan-
2-ol a but-1-eno o but-2-eno, pentan-1-ol a pent-1-eno, 3-
metilbutan-1-ol a 3-metilbut-1-eno, pentan-2-ol a pent-2-eno,
pental-3-ol a pent-2-eno, 2-metilbutan-1-ol a 2-metilbut-1-
eno, 3-metilbutan-2-ol a 3-metilbut-1-eno, 2-metilbutan-2-ol
15 a 2-metilbut-1-eno o 2-metilbut-2-eno, 3-metilbut-3-en-1-ol a
isopreno, 2-metilbut-3-en-2-ol a isopreno, 2-metilbut-3-en-2-
ol a 3-metilbuta-1,2-dieno, 2-metilbut-3-en-1-ol a isopreno,
3-metilbut-3-en-2-ol a isopreno, but-3-en-1-ol a 1,3-
butadieno, but-3-en-2-ol a 1,3-butadieno, 1-feniletanol a
20 estireno, 2-feniletanol a estireno, alcohol dimetilalílico a
isopreno, o but-2-en-1-ol a 1,3-butadieno.

En algunas modalidades de la invención, el
organismo microbiano de origen no natural comprende dos o
tres ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una
25 enzima de la trayectoria de alqueno. Por ejemplo, dos ácidos

nucleicos exógenos pueden codificar una alcohol cinasa y una fosfato liasa, o alternativamente una difosfocinasa y una difosfato liasa. En algunos aspectos de la invención, el organismo microbiano de origen no natural puede incluir tres
5 ácidos nucleicos exógenos que codifican una alcohol cinasa, una alquil fosfato cinasa y una difosfato liasa. La invención también proporciona que al menos un ácido nucleico exógeno puede ser un ácido nucleico heterólogo. La invención proporciona, además, que el organismo microbiano de origen no
10 natural puede estar en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

En una modalidad adicional, la invención proporciona un organismo microbiano de origen no natural que tiene una trayectoria de alqueno, en donde el organismo
15 microbiano de origen no natural comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima o proteína que convierte un sustrato a un producto seleccionado del grupo que consiste de un alcohol a un fosfato de alquilo, un alcohol a un difosfato de alquilo, un fosfato de alquilo a un
20 difosfato de alquilo, un fosfato de alquilo a un alqueno o un difosfato de alquilo a un alqueno. Un experto en la técnica entenderá que estos solamente son ejemplares y que cualquiera de los pares de sustrato-producto descritos en la presente adecuados para producir un producto deseado y para los cuales
25 una actividad adecuada está disponible para la conversión del

sustrato al producto, se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica con base en las enseñanzas en la presente. Por lo tanto, la invención proporciona un organismo microbiano de origen no natural que contiene al menos un
 5 ácido nucleico exógeno que codifica una enzima o proteína, donde la enzima o proteína convierte los sustratos y productos de una trayectoria de alqueno, tal como la que se muestra en la Figura 1.

Mientras que generalmente se describe en la
 10 presente como un organismo microbiano que contiene una trayectoria de alqueno, se entiende que la invención proporciona adicionalmente un organismo microbiano de origen no natural que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de alqueno
 15 expresada en una cantidad suficiente para producir un intermedio de una trayectoria de alqueno. Por ejemplo, como se describe en la presente, una trayectoria de alqueno se ejemplifica en la Figura 1. Por lo tanto, además de un organismo microbiano que contiene una trayectoria de alqueno
 20 que produce alqueno, la invención proporciona adicionalmente un organismo microbiano de origen no natural que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de alqueno, donde el organismo microbiano produce un intermediario de la trayectoria de alqueno, por ejemplo,
 25 un fosfato de alquilo o un difosfato de alquilo.

Se entiende que cualquiera de las trayectorias descritas en la presente, como se describe en los Ejemplos y se ejemplifica en las figuras, incluyendo las trayectorias de la Figura 1, se puede utilizar para generar un organismo microbiano de origen no natural que produce cualquier intermediario o producto de trayectoria, como se desee. Como se describe en la presente, tal organismo microbiano que produce un intermediario se puede utilizar en combinación con otro organismo microbiano que expresa enzimas de trayectoria corriente abajo para producir un producto deseado. Sin embargo, se entiende que un organismo microbiano de origen no natural que produce un intermediario de la trayectoria de alqueno 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 de la misma, o con referencia específica a uno o más ácidos nucleicos o genes que codifican una enzima asociada con o catalizadora, o una proteína asociada con, la reacción metabólica, reactivo o producto referenciado. A menos que se indique expresamente lo contrario en la presente, los expertos en la técnica entenderán que la referencia a una reacción constituye también la referencia a los reactivos y productos de la reacción. De manera similar, a menos que indique expresamente lo contrario en la presente, la

referencia a un reactivo o producto, también hace referencia a la reacción, y la referencia a cualquiera de estos componentes metabólicos también hace referencia al gen o genes que codifican las enzimas que catalizan o proteínas implicadas en la reacción, reactivo o producto referenciado. Asimismo, dado los campos bien conocidos de la bioquímica metabólica, enzimología y genómica, la referencia en la presente a un gen o ácido nucleico codificante constituye también una referencia a la enzima codificada correspondiente y la reacción que cataliza o una proteína asociada con la reacción así como también los reactivos y productos de la reacción.

Los organismos microbianos de origen no natural 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 alqueno. Dependiendo del organismo microbiano huésped elegido para la biosíntesis, se pueden expresar ácidos nucleicos para algunas o todas de una trayectoria biosintética de alqueno particular. Por ejemplo, si un huésped elegido es deficiente de una o más enzimas o proteínas para una trayectoria biosintética deseada, entonces los ácidos nucleicos expresables para las enzimas o proteínas deficientes se introducen en el huésped para la expresión exógena posterior. Alternativamente, si el huésped elegido

exhibe expresión endógena de algunos genes de la trayectoria, pero es deficiente en otros, entonces se necesita un ácido nucleico codificante para que las enzimas o proteínas deficientes logren la biosíntesis de alqueno. Por lo tanto, un organismo microbiano de origen no natural de la invención se puede producir introduciendo actividades de enzimas o proteínas exógenas para obtener una trayectoria biosintética deseada o se puede obtener una trayectoria biosintética deseada introduciendo una o más actividades de enzimas o proteínas exógenas que, junto con una o más enzimas o proteínas endógenas, produce un producto deseado, tal como alqueno.

Los organismos microbianos huéspedes se pueden seleccionar de, y los organismos microbianos de origen no natural se generan en, por ejemplo, bacterias, levadura, hongo o cualquiera 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 oxydans*, *Zymomonas mobilis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptomyces coelicolor*, *Clostridium acetobutylicum*, *Pseudomonas fluorescens*, y *Pseudomonas putida*. Las levaduras

y hongos ejemplares incluyen especies seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizobus oryzae*, *Yarrowia lipolytica*, y similares. *E. coli* es un organismo huésped particularmente útil puesto que es un organismo microbiano bien caracterizado adecuado para la modificación genética. Otros organismos huéspedes particularmente útiles incluyen levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae*. Se entiende que cualquier organismo huésped microbiano adecuado se puede utilizar para introducir modificaciones metabólicas y/o genéticas para producir un producto deseado.

Dependiendo de los constituyentes de la trayectoria biosintética de alqueno de un organismo microbiano huésped seleccionado, los organismos microbianos de origen no natural de la invención incluirán al menos un ácido nucleico que codifica la trayectoria de alqueno exógenamente expresado y hasta todos los ácidos nucleicos codificantes para una o más trayectorias biosintéticas de alqueno. Por ejemplo, la biosíntesis de alqueno se puede establecer en un huésped deficiente en una enzima o proteína de la trayectoria a través de la expresión exógena del ácido nucleico codificante correspondiente. En un huésped deficiente de todas las enzimas o proteínas de una trayectoria de alqueno, se puede

incluir la expresión exógena de todas las enzimas o proteínas en la trayectoria, aunque se entiende que todas las enzimas o proteínas de una trayectoria se pueden expresar incluso si el huésped contiene al menos una de las enzimas o proteínas de la trayectoria. Por ejemplo, se puede incluir la expresión exógena de todas las enzimas o proteínas en una trayectoria para la producción de alqueno, tal como una alcohol cinasa y una fosfato liasa, o alternativamente una difosfocinasa y una difosfato liasa, o, alternativamente, una alcohol cinasa, una alquil fosfato cinasa y una difosfato liasa.

Dadas las enseñanzas y orientaciones proporcionadas en la presente, los expertos en la técnica entenderán que el número de ácidos nucleicos codificantes para introducir en una forma expresable será, al menos, en paralelo a las deficiencias de la trayectoria de alqueno del organismo microbiano huésped seleccionado. Por lo tanto, un organismo microbiano de origen no natural de la invención puede tener uno, dos o tres de todos los ácidos nucleicos que codifican las enzimas o proteínas que constituyen una trayectoria biosintética de alqueno descrita en la presente. En algunas modalidades, los organismos microbianos de origen no natural también pueden incluir otras modificaciones genéticas que facilitan u optimizan la biosíntesis de alqueno o que confieren otras funciones útiles en el organismo microbiano huésped. Tal otra funcionalidad puede incluir, por ejemplo,

el aumento de la síntesis de uno o más de los precursores de la trayectoria de alqueno tal como un alcohol descrito en la presente.

Generalmente, se selecciona un organismo microbiano huésped de modo que produce el precursor de una trayectoria de alqueno, ya sea como una molécula producida naturalmente o como un producto modificado genéticamente que ya sea proporciona producción *de novo* de un precursor deseado o producción aumentada de un precursor producido naturalmente por el organismo microbiano huésped. Por ejemplo, el etanol se produce naturalmente en un organismo huésped tal como *E. coli*. Un organismo huésped se puede modificar genéticamente para aumentar la producción de un precursor, como se describe en la presente. Además, un organismo microbiano que se ha modificado genéticamente para producir un precursor deseado se puede utilizar como un organismo huésped y adicionalmente modificar genéticamente para expresar enzimas o proteínas de una trayectoria de alqueno.

En algunas modalidades, un organismo microbiano de origen no natural de la invención se genera a partir de un huésped que contiene la capacidad enzimática para sintetizar el alqueno. En esta modalidad específica que puede ser útil para aumentar la síntesis o acumulación de un producto de trayectoria de alqueno, por ejemplo, para conducir las reacciones de la trayectoria de alqueno hacia la producción

de alqueno. La síntesis o acumulación aumentada se puede realizar, por ejemplo, por sobreexpresión de ácidos nucleicos que codifican una o más de las enzimas o proteínas de la trayectoria de alqueno descritas anteriormente. La
5 sobreexpresión de la enzima o enzimas y/o proteína o proteínas de la trayectoria de alqueno puede ocurrir, por ejemplo, a través de la expresión exógena del gen endógeno o genes, o por medio de la expresión exógena del gen o genes heterólogos. Por lo tanto, los organismos de origen natural
10 se pueden generar fácilmente para que sean organismos microbianos de origen no natural de la invención, por ejemplo, para producir alqueno, a través de la sobreexpresión de uno, dos, o tres, es decir, hasta todos los ácidos nucleicos que codifican las enzimas o proteínas de la
15 trayectoria biosintética de alqueno. Además, un organismo de origen no natural se puede generar por mutagénesis de un gen endógeno que resulta en un aumento en la actividad de una enzima en la trayectoria biosintética de alqueno.

En modalidades particularmente útiles, se emplea la
20 expresión exógena de los ácidos nucleicos codificantes. La expresión exógena confiere la capacidad de personalizar a la medida los elementos reguladores y/o expresión para el huésped y aplicación para lograr un nivel de expresión deseado que se controla por el usuario. Sin embargo, la
25 expresión endógena también se puede utilizar en otras

modalidades, tal como por la remoción de un efector regulador negativo o inducción del promotor del gen cuando se enlaza a un promotor inducible u otro elemento regulador. Por lo tanto, un gen endógeno que tiene un promotor inducible de
5 origen natural puede ser sobre-regulado proporcionando el agente inductor apropiado, o la región reguladora de un gen endógeno se puede modificar genéticamente para incorporar un elemento regulador inducible, permitiendo la regulación de la expresión aumentada de un gen endógeno en el momento deseado.
10 De manera similar, un promotor inducible se puede incluir como un elemento regulador de un gen exógeno introducido en un organismo microbiano de origen no natural.

Se entiende que, en los métodos de la invención, cualquiera de uno o más ácidos nucleicos exógenos se puede
15 introducir en un organismo microbiano para producir un organismo microbiano de origen no natural de la invención. Los ácidos nucleicos se pueden introducir para conferir, por ejemplo, una trayectoria biosintética de alqueno en el organismo microbiano. Alternativamente, los ácidos nucleicos
20 codificantes se pueden introducir para producir un organismo microbiano intermediario que tiene la capacidad biosintética para catalizar algunas de las reacciones requeridas para conferir la capacidad biosintética de alqueno. Por ejemplo, un organismo microbiano de origen no natural que tiene una
25 trayectoria biosintética de alqueno puede comprender al menos

dos ácidos nucleicos exógenos que codifican las enzimas o proteínas deseadas, tal como la combinación de una alcohol cinasa y una fosfato liasa, o alternativamente, una difosfocinasa y una difosfato liasa, y similares. Por lo tanto, se entiende que cualquier combinación de dos o más enzimas o proteínas de una trayectoria biosintética se puede incluir en un organismo microbiano de origen no natural de la invención. De manera similar, se entiende que cualquier combinación de tres o más enzimas o proteínas de una trayectoria biosintética se puede incluir en un organismo microbiano de origen no natural de la invención, por ejemplo, una alcohol cinasa, una alquil fosfato cinasa y una difosfato liasa, y así sucesivamente, como se desee, siempre y cuando la combinación de enzimas y/o proteínas de los resultados de la trayectoria biosintética deseados en la producción del producto deseado correspondiente.

Además de la biosíntesis de alqueno como se describe en la presente, los organismos microbianos de origen no natural y los métodos de la invención también se pueden utilizar en diversas combinaciones entre sí y con otros organismos microbianos y métodos bien conocidos en la técnica para lograr la biosíntesis de producto por otras rutas. Por ejemplo, una alternativa para producir alqueno diferente del uso de los productores de alqueno es a través de la adición de otro organismo microbiano capaz de convertir un

intermediario de la trayectoria de alqueno a alqueno. Tal procedimiento incluye, por ejemplo, la fermentación de un organismo microbiano que produce un intermediario de la trayectoria de alqueno. El intermediario de la trayectoria de alqueno entonces se puede utilizar como un sustrato para un segundo organismo microbiano que convierte el intermediario de la trayectoria de alqueno a alqueno. El intermediario de la trayectoria de alqueno se puede añadir directamente a otro cultivo del segundo organismo o el cultivo original de los productores de intermediarios de la trayectoria alqueno se puede agotar de estos organismos microbianos, por ejemplo, por separación celular, y luego se puede utilizar la adición subsecuente del segundo organismo al caldo de fermentación para producir el producto final sin etapas de purificación intermediarias.

En otras modalidades, los organismos microbianos de origen no natural y los métodos de la invención se pueden montar en una amplia variedad de sub-trayectorias para lograr la biosíntesis de, por ejemplo, alqueno. En estas modalidades, las trayectorias biosintéticas para un producto deseado de la invención se pueden segregar en diferentes organismos microbianos, y los diferentes organismos microbianos se pueden co-cultivar para producir el producto final. En tal esquema de biosíntesis, el producto de un organismo microbiano es el sustrato para un segundo organismo

microbiano hasta que se sintetiza el producto final. Por ejemplo, la biosíntesis de alqueno se puede realizar construyendo un organismo microbiano que contiene trayectorias biosintéticas para la conversión de un
5 intermediario de la trayectoria a otro intermediario de la trayectoria o el producto. Alternativamente, el alqueno también se puede producir biosintéticamente a partir de organismos microbianos a través del co-cultivo o co-fermentación utilizando dos organismos en el mismo
10 recipiente, donde el primer organismo microbiano produce un intermediario de fosfato de alquilo o difosfato de alquilo y el segundo organismo microbiano convierte el intermediario a alqueno.

Dadas las enseñanzas y orientaciones proporcionadas
15 en la presente, los expertos en la técnica entenderán que existe una amplia variedad de combinaciones y permutaciones para los organismos microbianos de origen no natural y métodos de la invención junto con otros organismos microbianos, con el co- cultivo de otros organismos
20 microbianos de origen no natural que tiene sub-trayectorias y con combinaciones de otros procedimientos químicos y/o bioquímicos bien conocidos en la técnica para producir alqueno.

Las fuentes de ácidos nucleicos codificantes para
25 una enzima o proteína de la trayectoria de alqueno pueden

incluir, por ejemplo, cualquier especie donde el producto
génico codificado es capaz de catalizar la reacción
referenciada. Tales especies incluyen organismos tanto
procariotas como eucariotas incluyendo, pero no limitado a,
5 bacterias, incluyendo arqueas y eubacterias, y eucariotas,
incluyendo levaduras, plantas, insectos, animales, y
mamífero, incluyendo el ser humano. Las especies ejemplares
para tales fuentes incluyen, por ejemplo, *Escherichia coli*,
Abies grandis, *Acetobacter pasteurians*, *Acinetobacter* sp.
10 cepa M-1, *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis thaliana* col,
Aspergillus terreus NIH2624, *Bacillus amyloliquefaciens*,
Bacillus cereus, *Bos Taurus*, *Bradyrhizobium japonicum*
USDA110, *Burkholderia phymatum*, *Burkholderia xenovorans*,
Clostridium acetobutylicum, *Clostridium beijerinckii*,
15 *Clostridium beijerinckii* NRRL B593, *Clostridium botulinum*,
Clostridium kluyveri DSM 555, *Clostridium*
saccharoperbutylacetonicum, *Comamonas* sp. CNB-1, *Cucumis*
sativus, *Cupriavidus taiwanensis*, *Enterococcus faecalis*,
Escherichia coli C, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* W,
20 *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Homo sapiens*, *Klebsiella*
pneumonia, *Kluyveromyces lactis*, *Lactococcus lactis*, *Malus x*
domestica, *Mesorhizobium loti*, *Metanocaldococcus jannaschii*,
Metanosarcina mazei, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma*
pneumoniae M129, *Neurospora crassa*, *Oryctolagus cuniculus*,
25 *Picea abies*, *Populus alba*, *Populus tremula x Populus alba*,

Pseudomonas aeruginosa, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* sp. CF600, *Pueraria Montana*, *Pyrococcus furiosus*, *Ralstonia eutropha*, *Ralstonia eutropha* H16, *Ralstonia metallidurans*, *Rattus norvegicus*, *Rhodococcus ruber*, *Saccharomyces*
5 *cerevisiae*, *Salmonella enteric*, *Solanum lycopersicum*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptomyces* sp. ACT-1, *Thermoanaerobacter brockii* HTD4, *Thermotoga maritime* MSB8, *Thermus thermophilus*, *Zea mays*, *Zoogloea ramigera*, *Zymomonas mobilis*, así como también otras especies
10 ejemplares descritas en la presente o disponibles como organismos fuente para los genes correspondientes. Sin embargo, con la secuencia completa del genoma disponible para ahora más de 550 especies (con más de la mitad de estas disponibles en las bases de datos públicas, tal como el
15 NCBI), incluyendo 395 genomas de microorganismos y una variedad de levaduras, hongos, plantas, y genomas de mamíferos, la identificación de genes que codifican la actividad biosintética de alqueno requerida para uno o más genes en especies relacionadas o distantes, incluyendo, por
20 ejemplo, desplazamientos de genes homólogos, ortólogos, parálogos y no ortólogos de genes conocidos, y el intercambio de alteraciones genéticas entre los organismos es de rutina y bien conocido en la técnica. En consecuencia, las alteraciones metabólicas que permiten la biosíntesis de
25 alqueno descrita en la presente con referencia a un organismo

particular, tal como *E. coli*, se pueden aplicar fácilmente a otros microorganismos, incluyendo los organismos procariotas y eucariotas por igual. Dadas las enseñanzas y orientaciones proporcionadas en la presente, los expertos en la técnica
5 sabrán que una alteración metabólica ejemplificada en un organismo se puede aplicar igualmente a otros organismos.

En algunos casos, tal como cuando existe una trayectoria biosintética de alqueno alternativa en una especie no relacionada, la biosíntesis de alqueno puede ser
10 conferida a las especies huéspedes mediante, por ejemplo, la expresión exógena de un parálogo o parálogos de las especies no relacionadas que cataliza una reacción metabólica similar todavía no idéntica para reemplazar la reacción referenciada. Debido a que existen ciertas diferencias entre las redes
15 metabólicas entre diferentes organismos, los expertos en la técnica entenderán que puede diferir el uso de genes actual entre diferentes organismos. Sin embargo, dadas las enseñanzas y orientaciones proporcionadas en la presente, los expertos en la técnica también entenderán que las enseñanzas
20 y métodos de la invención se pueden aplicar a todos los organismos microbianos utilizando las alteraciones metabólicas afines a las ejemplificadas en la presente para construir un organismo microbiano en una especie de interés que sintetizará el alqueno.

25 Los métodos para construir y probar los niveles de

expresión de un huésped productor de alqueno de origen no natural se pueden realizar, por ejemplo, por métodos recombinantes y de detección bien conocidos en la técnica. Tales métodos se pueden encontrar descritos, por ejemplo, en
5 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001); y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999).

Las secuencias de ácido nucleico exógeno implicadas
10 en una trayectoria para la producción de alqueno se pueden introducir estable o transitoriamente en una célula huésped utilizando técnicas bien conocidas en la técnica incluyendo, pero no limitado a, conjugación, electroporación, transformación química, transducción, transfección, y
15 transformación por ultrasonido. Para la expresión exógena en *E. coli* u otras células procariotas, algunas secuencias de ácidos nucleicos en los genes o ADNc de ácidos nucleicos eucariotas pueden codificar señales de objetivo, tal como una señal mitocondrial N-terminal u otra señal de objetivo, que
20 se pueden remover antes de la transformación en células huéspedes procariotas, si se desea. Por ejemplo, la remoción de una secuencia líder mitocondrial condujo a la expresión aumentada en *E. coli* (Hoffmeister et al., *J. Biol. Chem.* 280:4329-4338 (2005)). Para la expresión exógena en levaduras
25 u otras células eucariotas, los genes se pueden expresar en

el citosol sin la adición de la secuencia líder, o se pueden dirigir a mitocondrias u otros orgánulos, o dirigir para la secreción, por la adición de una secuencia de objetivo adecuada, tal como una señal de secreción o de objetivo
5 mitocondrial adecuada para las células huéspedes. Por lo tanto, se entiende que las modificaciones apropiadas a una secuencia de ácido nucleico para remover o incluir una secuencia de objetivo se pueden incorporar en una secuencia de ácido nucleico exógeno para impartir propiedades
10 deseables. Además, los genes se pueden someter a optimización de codones con técnicas bien conocidas en la técnica para lograr la expresión optimizada de las proteínas.

Se puede construir un vector o vectores de expresión para incluir uno o más ácidos nucleicos que
15 codifican la trayectoria biosintética de alqueno como se ejemplifica en la presente operativamente enlazados a secuencias de control de expresión funcionales en el organismo huésped. Los vectores de expresión aplicables para su uso en los organismos huéspedes microbianos de la
20 invención incluyen, por ejemplo, plásmidos, vectores de fagos, vectores virales, episomas y cromosomas artificiales, incluyendo vectores y secuencias de selección o marcadores operables para la integración estable en un cromosoma huésped. Adicionalmente, los vectores de expresión pueden
25 incluir uno o más genes marcadores seleccionables y

secuencias de control de expresión apropiadas. También se pueden incluir genes marcadores seleccionables que, por ejemplo, proporcionan resistencia a antibióticos o toxinas, complementan las deficiencias auxotróficas, o suministran

5 nutrientes críticos no en los medios de cultivo. Las secuencias de control de expresión pueden incluir promotores constitutivos e inducibles, mejoradores de la transcripción, terminadores de la transcripción, y similares que son bien conocidos en la técnica. Cuando dos o más ácidos nucleicos

10 codificantes exógenos serán co-expresados, ambos ácidos nucleicos se pueden insertar, por ejemplo, en un vector de expresión único o en vectores de expresión separados. Para la expresión de vector único, los ácidos nucleicos codificantes se pueden enlazar operativamente a una secuencia de control

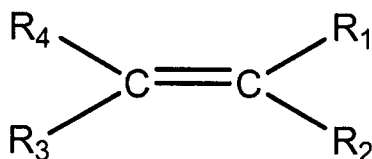
15 de expresión común o enlazar a diferentes secuencias de control de expresión, tal como un promotor inducible y un promotor constitutivo. La transformación de secuencias de ácidos nucleicos exógenos implicadas en una trayectoria metabólica o sintética se puede confirmar utilizando métodos

20 bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, por ejemplo, análisis de ácidos nucleicos tales como análisis Northern blot o amplificación de ARNm por reacción en cadena de polimerasa (PCR), o inmunotransferencia para la expresión de productos génicos, u otros métodos analíticos adecuados

25 para analizar la expresión de una secuencia de ácido nucleico

introducida o su producto génico correspondiente. Se entiende por los expertos en la técnica que el ácido nucleico exógeno se expresa en una cantidad suficiente para producir el producto deseado, y se entiende, además, que los niveles de expresión se pueden optimizar para obtener expresión suficiente utilizando métodos bien conocidos en la técnica y como se describe en la presente.

La invención proporciona adicionalmente métodos de uso de los organismos microbianos descritos en la presente para producir un alqueno, cultivando un organismo microbiano de origen no natural que contiene una trayectoria de alqueno como se describe en la presente bajo condiciones y durante un período de tiempo suficiente para producir un alqueno. En algunos aspectos del método, el organismo microbiano utilizado en el método puede producir un alqueno, en el que el alqueno es un compuesto de Fórmula (II)



en donde R^1 , R^2 , R^3 , y R^4 son cada uno independientemente (a) hidrógeno, ciano, halo, o nitro; (b) alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, o heterociclilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Q; o (c) $-C(O)R^{1a}$, -

$C(O)OR^{1a}$, $-C(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-C(NR^{1a})NR^{1b}R^{1c}$, $-OR^{1a}$, $-OC(O)R^{1a}$, $-OC(O)OR^{1a}$,
 $-OC(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-OC(=NR^{1a})NR^{1b}R^{1c}$, $-OS(O)R^{1a}$, $-OS(O)_2R^{1a}$, $-OS(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-OS(O)_2NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1a}C(O)R^{1d}$, $-NR^{1a}C(O)OR^{1d}$,
5 $-NR^{1a}C(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1a}C(=NR^{1d})NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1a}S(O)R^{1d}$, $-NR^{1a}S(O)_2R^{1d}$, $-NR^{1a}S(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1a}S(O)_2NR^{1b}R^{1c}$, $-SR^{1a}$, $-S(O)R^{1a}$, $-S(O)_2R^{1a}$, $-S(O)NR^{1b}R^{1c}$, o $-S(O)_2NR^{1b}R^{1c}$; en donde cada R^{1a} , R^{1b} , R^{1c} , y R^{1d} es
independientemente hidrógeno, alquilo de C_{1-6} , alqueno de C_{2-6} , alquino de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} ,
10 aralquilo de C_{7-15} heteroarilo, o heterociclilo; o R^{1a} y R^{1c} junto con los átomos de C y N a los cuales se unen forman heterociclilo; o R^{1b} y R^{1c} junto con el átomo de N al cual se unen forman heterociclilo; en donde cada Q se selecciona independientemente de (a) oxo, ciano, halo, y nitro; (b)
15 alquilo de C_{1-6} , alqueno de C_{2-6} , alquino de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, y heterociclilo, cada uno de los cuales adicionalmente se sustituye opcionalmente con uno o más, en una modalidad, uno, dos, tres, o cuatro, sustituyentes Q^a ; y
20 (c) $-C(O)R^a$, $-C(O)OR^a$, $-C(O)NR^bR^c$, $-C(NR^a)NR^bR^c$, $-OR^a$, $-OC(O)R^a$, $-OC(O)OR^a$, $-OC(O)NR^bR^c$, $-OC(=NR^a)NR^bR^c$, $-OS(O)R^a$, $-OS(O)_2R^a$, $-OS(O)NR^bR^c$, $-OS(O)_2NR^bR^c$, $-NR^bR^c$, $-NR^aC(O)R^d$, $-NR^aC(O)OR^d$, $-NR^aC(O)NR^bR^c$, $-NR^aC(=NR^d)NR^bR^c$, $-NR^aS(O)R^d$, $-NR^aS(O)_2R^d$, $-NR^aS(O)NR^bR^c$, $-NR^aS(O)_2NR^bR^c$, $-SR^a$, $-S(O)R^a$, $-S(O)_2R^a$, $-S(O)NR^bR^c$,
25 y $-S(O)_2NR^bR^c$, en donde cada R^a , R^b , R^c , y R^d es

independientemente (i) hidrógeno; (ii) alquilo de C_{1-6} , alqueniilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, o heterociclilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o
5 más, en una modalidad, uno, dos, tres, o cuatro, sustituyentes Q^a ; o (iii) R^b y R^c junto con el átomo de N al cual se unen forman heterociclilo, opcionalmente sustituido con uno o más, en una modalidad, uno, dos, tres, o cuatro, sustituyentes Q^a ; en donde cada Q^a se selecciona
10 independientemente del grupo que consiste de (a) oxo, ciano, halo, y nitro; (b) alquilo de C_{1-6} , alqueniilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, y heterociclilo; y (c) -
 $C(O)R^e$, $-C(O)OR^e$, $-C(O)NR^fR^g$, $-C(NR^e)NR^fR^g$, $-OR^e$, $-OC(O)R^e$, $-$
15 $OC(O)OR^e$, $-OC(O)NR^fR^g$, $-OC(=NR^e)NR^fR^g$, $-OS(O)R^e$, $-OS(O)_2R^e$, $-$
 $OS(O)NR^fR^g$, $-OS(O)_2NR^fR^g$, $-NR^fR^g$, $-NR^eC(O)R^h$, $-NR^eC(O)OR^f$, $-$
 $NR^eC(O)NR^fR^g$,
 $-NR^eC(=NR^h)NR^fR^g$, $-NR^eS(O)R^h$, $-NR^eS(O)_2R^h$, $-NR^eS(O)NR^fR^g$, $-$
 $NR^eS(O)_2NR^fR^g$, $-SR^e$, $-S(O)R^e$, $-S(O)_2R^e$, $-S(O)NR^fR^g$, y $-S(O)_2NR^fR^g$;
20 en donde cada R^e , R^f , R^g , y R^h es independientemente (i) hidrógeno; (ii) alquilo de C_{1-6} , alqueniilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, o heterociclilo; o (iii) R^f y R^g junto con el átomo de N al cual se unen forman heterociclilo.

25 En algunos aspectos, el organismo microbiano

utilizado en el método descrito en la presente puede producir un alqueno, en donde el alqueno es un compuesto seleccionado de, pero no se limita a, etileno, propileno, propileno, bute-1-eno, isobutileno, isobutileno, but-1-eno, but-2-eno, pent-1-eno, 3-metilbut-1-eno, pent-2-eno, 2-metilbut-1-eno, 3-metilbut-1-eno, 2-metilbut-1-eno, 2-metilbut-2-eno, isopreno, 3-metilbuta-1,2-dieno, 1,3-butadieno y estireno.

En algunas modalidades, el producto alqueno es gaseoso y tiene una solubilidad limitada en el caldo de cultivo bajo las condiciones del proceso. Esto es ventajoso, ya que la remoción del gas del recipiente de reacción puede impulsar las reacciones de la trayectoria formadora de alqueno en la dirección hacia adelante.

Las temperaturas elevadas pueden limitar aún más la solubilidad de los productos de alqueno. Una propiedad deseable del microorganismo que contiene la trayectoria que produce alqueno es la capacidad de crecer a temperaturas elevadas. Los organismos termófilos y tolerantes al calor ejemplares incluyen *Thermus aquaticus*, las bacterias del género *Clostridium* y microorganismos de los géneros *Thermotoga* y *Aquifex*. Una propiedad deseada de las enzimas de la trayectoria que produce de alqueno es la capacidad de catalizar las reacciones deseadas a temperaturas elevadas. Tales enzimas se pueden aislar de organismos termófilos o se pueden obtener por mutagénesis de las enzimas disponibles y

detección o selección para la actividad aumentada bajo condiciones de temperatura aumentadas.

La purificación y/o ensayos adecuados para analizar la producción de un alqueno se pueden realizar utilizando métodos bien conocidos. Las repeticiones adecuadas tales como cultivos por triplicado se pueden cultivar para cada cepa modificada genéticamente que es analizada. Por ejemplo, se puede monitorear la formación del producto y subproducto en el huésped de producción genéticamente modificado. El producto final e intermediarios, y otros compuestos orgánicos, se pueden analizar por métodos tales como HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), GC-MS (cromatografía de gases-espectroscopia de masas) y LC-MS (cromatografía líquida-espectroscopia de masas) u otros métodos analíticos adecuados utilizando procedimientos de rutina bien conocidos en la técnica. La liberación del producto en el caldo de fermentación también se puede analizar con el sobrenadante del cultivo. Los subproductos y glucosa residual se pueden cuantificar por HPLC utilizando, por ejemplo, un detector de índice de refracción para la glucosa y alcoholes, y un detector de UV para ácidos orgánicos (Lin et al., *Biotechnol. Bioeng.* 90:775-779 (2005)), u otros métodos de ensayo y detección adecuados bien conocidos en la técnica. Las actividades de la enzima o proteína individuales de las secuencias de ADN exógeno

también se pueden someter a ensayo utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Las muestras gaseosas se pueden analizar por cromatografía de gases (GC) acoplada con un detector de ionización de llama, y además por GC-MS.

5 El alqueno se puede separar de otros componentes en el cultivo utilizando 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 la extracción continua líquido-líquido, 10 pervaporación, filtración en membrana, separación de membrana, ósmosis inversa, electrodiálisis, destilación, cristalización, centrifugación, filtración extractiva, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de adsorción, y 15 ultrafiltración. Todos los métodos anteriores son bien conocidos en la técnica.

Cualquiera de los organismos microbianos de origen no natural descrito en la presente se puede cultivar para producir y/o segregar los productos biosintéticos de la 20 invención. Por ejemplo, los productores de alqueno se pueden cultivar para la producción biosintética de alqueno.

Para la producción de alqueno, las cepas recombinantes se cultivan en un medio con fuente de carbono y otros nutrientes esenciales. A veces es deseable y puede ser 25 muy deseable para mantener las condiciones anaeróbicas en el

fermentador para reducir el costo del proceso global. Tales condiciones se pueden obtener, por ejemplo, primero burbujeando el medio con nitrógeno y luego sellando los matraces con un septo y tapa de rosca. Para las cepas donde
5 el crecimiento no se observa anaeróbicamente, se pueden aplicar condiciones microaeróbicas o sustancialmente anaeróbicas perforando el septo con un pequeño agujero para la aireación limitada. Las condiciones anaeróbicas ejemplares se han descrito anteriormente y son bien conocidas en la
10 técnica. Las condiciones aeróbicas y anaeróbicas ejemplares se describen, por ejemplo, en la publicación de Estados Estado 2009/0047719, presentada el 10 de agosto de 2007. Las fermentaciones se pueden realizar en una manera por lote, alimentación por lotes o continua, como se describe en la
15 presente.

Si se desea, el pH del medio se puede mantener a un pH deseado, en particular pH neutro, tal como un pH de alrededor de 7 por adición de una base, tal como NaOH u otras bases, o ácido, como sea necesario para mantener el medio de
20 cultivo a un pH deseable. La tasa de crecimiento se puede determinar midiendo la densidad óptica utilizando un espectrofotómetro (600 nm), y la tasa de absorción de glucosa monitoreando el agotamiento de la fuente de carbono con el tiempo.

25 El medio de crecimiento puede incluir, por ejemplo,

cualquier fuente de carbohidratos que puede suministrar una fuente de carbono para el microorganismo de origen no natural. Tales fuentes incluyen, por ejemplo, azúcares tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fructosa, 5 sacarosa y almidón. Otras fuentes de carbohidratos incluyen, por ejemplo, materias primas renovables y biomasa. Los tipos ejemplares de biomasa que se pueden utilizar como materias primas en los métodos de la invención incluyen materias primas o partes de materias primas de biomasa celulósica, 10 biomasa de hemicelulosa y lignina. Tales materias primas de biomasa contienen, por ejemplo, sustratos de carbohidratos útiles como fuentes de carbono tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fructosa y almidón. Dadas las enseñanzas y orientaciones proporcionadas en la presente, los 15 expertos en la técnica entenderán que la biomasa y materias primas renovables que no sean las ejemplificadas anteriormente también pueden usarse para el cultivo de los organismos microbianos de la invención para la producción de alqueno.

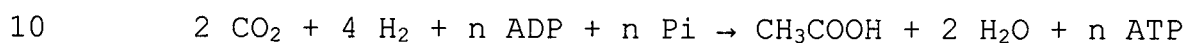
20 Además de materias primas renovables tales como aquellas ejemplificadas anteriormente, los organismos microbianos de alqueno de la invención también pueden modificarse para el crecimiento en gas de síntesis como su fuente de carbono. En esta modalidad específica, una o más 25 proteínas o enzimas se expresan en los organismos de

producción de alqueno para proporcionar una trayectoria metabólica para la utilización de gas de síntesis u otra fuente de carbono gaseosa.

El gas de síntesis, también conocido como gas de
5 síntesis o gas pobre, es el principal producto de la
gasificación de carbón y de materiales carbonosos, tales como
materiales de biomasa, incluidos los residuos y cultivos
agrícolas. El gas de síntesis es una mezcla principalmente de
H₂ y CO y puede obtenerse a partir de la gasificación de
10 cualquier materia prima orgánica, incluyendo, pero sin estar
limitado a, carbón, petróleo carbón, gas natural, biomasa, y
materia orgánica de residuos. La gasificación se lleva a cabo
en general bajo una alta relación de combustible a oxígeno.
Aunque en gran parte incluyen H₂ y CO, el gas de síntesis
15 también puede incluir CO₂ y otros gases en cantidades más
pequeñas. Por lo tanto, el gas de síntesis proporciona una
fuente rentable de carbono gaseoso tal como CO y,
adicionalmente, CO₂.

La vía de Wood-Ljungdahl cataliza la conversión de
20 CO y H₂ a acetil-CoA y otros productos tales como el acetato.
Los organismos capaces de utilizar el CO y el gas de síntesis
también tienen generalmente la capacidad de utilizar CO₂ y
mezclas de CO₂/H₂ a través del mismo conjunto básico de
enzimas y transformaciones abarcadas por la trayectoria de
25 Wood-Ljungdahl. La conversión dependiente de H₂ de CO₂ a

acetato por microorganismos fue reconocido mucho antes de que se revelara que el CO también podría ser utilizado por los mismos organismos, y que las mismas trayectorias estaban involucradas. Se ha demostrado que muchos acetógenos crecen
 5 en presencia de CO₂ y producen compuestos tales como acetato, siempre y cuando el hidrógeno esté presente para suministrar los equivalentes reductores necesarios (véase, por ejemplo, Drake, Acetogénesis, pp. 3-60 Chapman and Hall, New York, (1994)). Esto se puede resumir por la siguiente ecuación:



Por lo tanto, los microorganismos de origen no natural que poseen la trayectoria Wood-Ljungdahl pueden utilizar mezclas de CO₂ y H₂ como también para la producción de acetil-CoA y otros productos deseados.

15 La trayectoria de Wood-Ljungdahl es bien conocida en la técnica y se compone de 12 reacciones que se pueden separar en dos ramificaciones: (1) la ramificación de metilo y (2) la ramificación de carbonilo. La ramificación de metilo convierte el gas de síntesis a metil-tetrahidrofolato (metil-
 20 THF), mientras que la ramificación de carbonilo convierte metil-THF a acetil-CoA. Las reacciones en la ramificación de metilo se catalizan en orden por las siguientes enzimas o proteínas: ferredoxina oxidorreductasa, formiato deshidrogenasa, formiltetrahidrofolato sintetasa,
 25 meteniltetrahidrofolato ciclodeshidratasa,

metilentetrahidrofolato deshidrogenasa y metilentetrahidrofolato reductasa. Las reacciones en la ramificación de carbonilo se catalizan en orden por las siguientes enzimas o proteínas:

5 metiltetrahidrofolato:proteína corrinoide metiltransferasa (por ejemplo, AcsE), proteína hierro-azufre corrinoide, proteína de ensamblaje de proteínas de níquel (por ejemplo, AcsF), ferredoxina, acetil-CoA sintasa, monóxido de carbono deshidrogenasa y proteína de ensamblaje de la proteína de níquel (por ejemplo, CooC). Siguiendo las enseñanzas y orientaciones proporcionadas en la presente para la introducción de un número suficiente de ácidos nucleicos codificantes para generar una trayectoria de alqueno, los expertos en la técnica entenderán que el mismo diseño de ingeniería también se puede realizar con respecto a la introducción de al menos los ácidos nucleicos que codifican la enzimas o proteínas de Wood-Ljungdahl ausentes en el organismo huésped. Por lo tanto, la introducción de uno o más ácidos nucleicos codificantes en los organismos microbianos de la invención de tal manera que el organismo modificado contenga la trayectoria completa de Wood-Ljungdahl, conferirá la capacidad de utilización de gas de síntesis.

Además, el ciclo reductivo (inverso) del ácido tricarboxílico acoplado con monóxido de carbono deshidrogenasa y/o actividades de hidrogenasa también puede

ser utilizado para la conversión de CO, CO₂ y/o H₂ a acetil-CoA y otros productos tales como acetato. Los organismos capaces de fijar carbono a través de la trayectoria del TCA reductora pueden utilizar uno o más de las siguientes

5 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, monóxido

10 de carbono deshidrogenasa, e hidrogenasa. Específicamente, los equivalentes reductores extraídos de CO y/o H₂ por monóxido de carbono deshidrogenasa e hidrogenasa se utilizan para fijar CO₂ a través del ciclo de TCA reductivo en acetil-CoA o acetato. El acetato se puede convertir a acetil-CoA

15 por enzimas tales como la acetil-CoA transferasa, acetato cinasa/fosfotransacetilasa, y acetil-CoA sintetasa. Se puede convertir acetil-CoA a los precursores de alqueno, gliceraldehído-3-fosfato, fosfoenolpiruvato y piruvato, por piruvato:ferredoxina oxidorreductasa y las enzimas de la

20 gluconeogénesis. Siguiendo las enseñanzas y orientaciones proporcionadas en la presente para la introducción de un número suficiente de ácidos nucleicos codificantes para generar una trayectoria de alqueno, los expertos en la técnica entenderán que el mismo diseño de ingeniería también

25 se puede realizar con respecto a la introducción de al menos

los ácidos nucleicos que codifican las enzimas o proteínas de la trayectoria de TCA reductora, ausentes en el organismo huésped. Por lo tanto, la introducción de uno o más ácidos nucleicos codificantes en los organismos microbianos de la invención de tal manera que el organismo modificado contenga una trayectoria de TCA reductora, puede conferir la capacidad de utilización de gas de síntesis.

Por consiguiente, dadas las enseñanzas y orientaciones proporcionadas en la presente, los expertos en la técnica entenderán que un organismo microbiano de origen no natural puede ser producido que segrega los compuestos biosintetizados de la invención cuando crece en una fuente de carbono tal como un carbohidrato. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, alqueno y cualquiera de los metabolitos intermedios en la trayectoria de alqueno. Todo lo que se requiere es modificar genéticamente en una o más de las actividades de la enzima o proteína requerida para lograr la biosíntesis del compuesto deseado o intermedio incluyendo, por ejemplo, la inclusión de algunas o todas las trayectorias biosintéticas del alqueno. Por consiguiente, la invención proporciona un organismo microbiano de origen no natural que produce y/o secreta alqueno cuando crece en un carbohidrato u otra fuente de carbono y produce y/o secreta cualquiera de los metabolitos intermediarios mostrados en la trayectoria de alqueno cuando crece en un carbohidrato u otra fuente de

carbono. Los organismos microbianos que producen alqueno de la invención, pueden iniciar la síntesis de un intermediario, por ejemplo, un fosfato de alquilo o un difosfato de alquilo.

Los organismos microbianos de origen no natural de la invención se construyen utilizando métodos bien conocidos en la técnica como se ejemplifica en la presente para expresar de manera exógena al menos un ácido nucleico que codifica una enzima o proteína de la trayectoria alqueno en cantidades suficientes para producir alqueno. Se entiende que los organismos microbianos de la invención son cultivados bajo condiciones suficientes para producir alqueno. Siguiendo las enseñanzas y orientaciones proporcionadas en la presente, los organismos microbianos de origen no natural de la invención pueden conseguir la biosíntesis de alqueno resultante en concentraciones intracelulares entre aproximadamente 0.1-200 mM o más. Generalmente, la concentración intracelular de alqueno está entre aproximadamente 3-150 mM, en particular entre aproximadamente 5-125 mM y más particularmente entre aproximadamente 8-100 mM, incluyendo aproximadamente 10 mM, 20 mM, 50 mM, 80 mM, o más. Las concentraciones intracelulares entre y por arriba de cada uno de estos intervalos a modo de ejemplo también se pueden lograr a partir de los organismos microbianos de origen no natural de la invención.

En algunas modalidades, las condiciones de cultivo

incluyen condiciones anaeróbicas o de mantenimiento o crecimiento sustancialmente anaeróbicas. Las condiciones anaeróbicas ejemplares se han descrito anteriormente y son bien conocidas en la técnica. Las condiciones anaeróbicas ejemplares para procesos de fermentación se describen en la presente y se describen, por ejemplo, en la publicación de EE.UU. 2009/0047719, presentada el 10 de agosto de 2007. Cualquiera de estas condiciones se puede emplear con los organismos microbianos de origen no natural, así como otras condiciones anaeróbicas bien conocidos en la técnica. Bajo tales condiciones anaeróbicas o sustancialmente anaeróbicas, los productores de alqueno pueden sintetizar alqueno a concentraciones intracelulares de 5-10 mM o más, así como otras concentraciones ejemplificadas en la presente. Se entiende que, a pesar de que la descripción anterior se refiere a las concentraciones intracelulares, los organismos microbianos productores de alqueno pueden producir intracelularmente alqueno 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 alqueno puede incluir la adición de un agente osmoprotector a las condiciones de cultivo. En ciertas modalidades, los organismos microbianos de origen no natural de la invención se pueden mantener, cultivar o

fermentar como se describe en la presente en presencia de un 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

5 estrés osmótico. Los osmoprotectores incluyen, pero no se limitan a, betaínas, aminoácidos, y el azúcar trehalosa. Los ejemplos no limitativos de tales son glicina betaína, prolina betaína, dimetiltetina, dimetilsulfoniopropionato, 3-dimetilsulfonio-2-metilpropionato, ácido pipecólico,

10 dimetilsulfonioacetato, colina, L-carnitina y ectoína. En un aspecto, el osmoprotector es glicina betaína. Se entiende por un experto normal en la técnica que la cantidad y tipo de osmoprotector adecuado para la protección de un organismo microbiano descrito en la presente, del estrés osmótico

15 dependerán del organismo microbiano utilizado. La cantidad de osmoprotector en las condiciones de cultivo 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

20 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 10 mM, no más de aproximadamente 50 mM, no más de aproximadamente 100 mM o no más de aproximadamente 500 mM.

25 En algunas modalidades, la materia prima de carbono

y otras fuentes de captación celular, tales como fosfato, amonio, sulfato, cloruro y otros halógenos pueden elegirse para alterar la distribución isotópica de los átomos presentes en un alqueno o cualquier intermediario de la trayectoria de alqueno. Las diferentes 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 trayectoria de alqueno o producto alqueno, o para productos secundarios generados en las reacciones que divergen lejos de una trayectoria de alqueno. El enriquecimiento isotópico se puede lograr por cualquier átomo objetivo incluyendo, por ejemplo, carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, cloruro u otros halógenos.

En algunas modalidades, las fuentes de absorción se pueden seleccionar para alterar las relaciones de carbono-12, carbono-13 y carbono-14. En algunas modalidades, se pueden seleccionar las fuentes de absorción para alterar las relaciones de oxígeno-16, oxígeno-17, y oxígeno-18. En algunas modalidades, las fuentes de absorción se pueden seleccionar para alterar las relaciones de hidrógeno, deuterio, y tritio. En algunas modalidades, las fuentes de absorción se pueden seleccionar para alterar las relaciones

de nitrógeno-14 y nitrógeno-15. En algunas modalidades, las fuentes de absorción se pueden seleccionar para alterar las relaciones de azufre-32, azufre-33, azufre-34, y azufre-35. En algunas modalidades, las fuentes de absorción se pueden
5 seleccionar para alterar las relaciones de fósforo-31, fósforo-32, y fósforo-33. En algunas modalidades, las fuentes de absorción se pueden seleccionar para alterar las relaciones de cloro-35, cloro-36, y cloro-37.

En algunas modalidades, se puede variar la relación
10 isotópica de un átomo objetivo a una relación deseada por la selección de una o más fuentes de absorción. Una fuente de absorción se puede derivar de una fuente natural, tal como se encuentra en la naturaleza, o a partir de una fuente artificial, y un experto en la técnica puede seleccionar una
15 fuente natural, una fuente artificial, o una combinación de los mismos, para lograr una relación isotópica deseada de un átomo destino. Un ejemplo de una fuente de absorción de hecho por el hombre incluye, por ejemplo, una fuente de absorción que se deriva al menos parcialmente de una reacción de
20 síntesis química. Tales fuentes de absorción isotópicamente enriquecidas se pueden comprar comercialmente o se preparan en el laboratorio y/u opcionalmente mezcladas con una fuente natural de la fuente de absorción para conseguir una proporción isotópica deseada. En algunas modalidades, una
25 relación isotópica del átomo objetivo de una fuente de

absorción se puede lograr seleccionando un origen deseado de la fuente de absorción tal como se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, como se describe en la presente, una fuente natural puede ser una base biológica derivada de o
5 sintetizada por un organismo biológico o una fuente tal como productos a base de petróleo o la atmósfera. En algunas de tales modalidades, una fuente de carbono, por ejemplo, se puede seleccionar a partir de una fuente de carbono derivada de combustible fósil, que puede estar relativamente agotado
10 de carbono-14, o una fuente de carbono ambiental o atmosférico, tal como CO_2 , que puede poseer una mayor cantidad de carbono-14 que su contraparte derivada del petróleo.

El isótopo de carbono inestable carbono-14 o radiocarbono compensa aproximadamente 1 en 10^{12} átomos de
15 carbono en la atmósfera de la tierra y tiene una vida media de unos 5700 años. La reserva de carbono se repone en la atmósfera superior por una reacción nuclear que involucra rayos cósmicos y el nitrógeno ordinario (^{14}N). Los combustibles fósiles no contienen carbono-14, ya que decaió
20 hace mucho tiempo. La quema de combustibles fósiles disminuye la fracción atmosférica de carbono-14, el así denominado "efecto Suess".

Los métodos para determinar las relaciones isotópicas de los átomos en un compuesto son bien conocidos
25 para los expertos en la técnica. El enriquecimiento isotópico

se evalúa fácilmente por espectrometría de masas utilizando técnicas conocidas en el arte, tales como la espectrometría de masa acelerada (AMS), la Espectrometría de Masas de Relaciones de Isótopos Estables (SIRMS) y Fraccionamiento Isotópico Natural de Sitio Específico por Resonancia Magnética Nuclear (SNIF-NMR). Tales técnicas espectrales de masas se pueden integrar con técnicas de separación tales como la cromatografía líquida (LC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y/o cromatografía de gas, y similares.

En el caso del carbono, se desarrolló ASTM D6866 en los Estados Unidos como un método analítico estandarizado para determinar el contenido de base biológica de muestras sólidas, líquidas y gaseosas utilizando la datación por radiocarbono por la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales Internacionales (ASTM). La norma se basa en el uso de la datación por radiocarbono para la determinación de un contenido de base biológica de un producto. El ASTM D6866 se publicó por primera vez en 2004, y la versión activa actual de la norma es ASTM D6866-11 (efectiva el 1 de abril de 2011). Las técnicas de datación por radiocarbono son bien conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en la presente.

El contenido de base biológica de un compuesto se calcula por la relación de carbono-14 (^{14}C) a carbono-12 (^{12}C).

Específicamente, la Fracción moderna (Fm) se calcula a partir de la expresión: $Fm = (S-B)/(M-B)$, donde B, S y M representan las relaciones $^{14}C/^{12}C$ de la solución testigo, la muestra y la referencia moderna, respectivamente. La Fracción moderna es una medida de la desviación de la relación $^{14}C/^{12}C$ de una muestra de "Moderna." Moderna se define como el 95% de la concentración de radiocarbono (en AD 1950) de la Oficina Nacional de Estándares (NBS) Ácido oxálico I (es decir, materiales de referencia estándar (SRM) 4990b) normalizado a $\delta^{13}C_{VPDB} = -19$ por mil (Olsson, *The use of Oxalic acid as a Standard*. en, Radiocarbon Variations and Absolute Chronology, Nobel Symposium, 12th Proc., John Wiley & Sons, New York (1970)). Los resultados de espectrometría de masas, por ejemplo, medida por ASM, se calculan utilizando el acuerdo internacional sobre definición de 0.95 veces la actividad específica del NBS Ácido oxálico I (SRM 4990b) normalizado a $\delta^{13}C_{VPDB} = -19$ por mil. Esto es equivalente a una relación absoluta (AD 1950) $^{14}C/^{12}C$ de $1.176 \pm 0.010 \times 10^{-12}$ (Karlen et al, *Arkiv Geofysik*, 4:465-471 (1968)). Los cálculos estándares toman en cuenta la absorción diferencial de un isótopo con respecto a otro, por ejemplo, la absorción preferencial en los sistemas biológicos de C^{12} sobre C^{13} sobre C^{14} , y estas correcciones se muestra en un Fm corregido para δ^{13} .

Un estándar de ácido oxálico (SRM 4990b o HOx 1) se

hizo a partir de un cultivo de la remolacha azucarera 1955. Aunque hubo 1000 libras hechas, este estándar de ácido oxálico ya no está disponible comercialmente. El estándar de ácido oxálico II (HOx 2; designación de N.I.S.T de SRM 4990

5 C) se hizo a partir de un cultivo de 1977 melazas de remolacha Francesa. En la década de 1980, un grupo de 12 laboratorios midió las relaciones de los dos estándares. La relación de la actividad del ácido oxálico II a 1 es 1.2933 ± 0.001 (la media ponderada). La relación isotópica de HOx II

10 es -17.8 por mil. ASTM D6866-11 sugiere el uso del estándar SRM 4990 C de Ácido oxálico II (Hox2) disponible para el estándar moderno (véase el análisis de estándares de ácido oxálico original contra disponibles en la actualidad en Mann, Radiocarbon, 25 (2):519-527 (1983)). Una $F_m = 0\%$ representa

15 toda la falta de átomos de carbono-14 átomos en un material, lo que indica una fuente de carbono fósil (por ejemplo, a base de petróleo). Una $F_m = 100\%$, después de la corrección para la inyección post-1950 del carbono-14 en la atmósfera a partir de las pruebas de bombas nucleares, indica una fuente

20 de carbono totalmente moderna. Tal como se describe en la presente, una fuente "moderna" incluye las fuentes de base biológica.

Tal como se describe en ASTM D6866, el carbono moderno por ciento (pMC) puede ser superior al 100%, debido a

25 la continuación pero disminuyendo los efectos de los

programas de pruebas nucleares de 1950, que resultó en un enriquecimiento considerable de carbono-14 en la atmósfera como describe en ASTM D6866-11. Debido a que se hace referencia a todas las actividades de carbono-14 de la

5 muestras para un estándar de "pre-bomba", y porque casi todos los nuevos productos de base biológica se producen en un ambiente post-bomba, todos los valores de pMC (después de la corrección para la fracción isotópica) deben multiplicarse por 0.95 (a partir de 2010) para reflejar mejor el verdadero

10 contenido de base biológica de la muestra. Un contenido de base biológica que es mayor que 103% indica que ya sea se ha producido un error analítico, o que la fuente de carbono de base biológica es muchos más vieja.

La ASTM D6866 cuantifica el contenido de base

15 biológica con relación al contenido orgánico total del material y no tiene en consideración el carbono inorgánico y otras sustancias presentes que no contienen carbono. Por ejemplo, un producto que es 50% de material a base de almidón y 50% agua se considera que tiene un contenido de Base

20 Biológica = 100% (50% de contenido orgánico que es 100% de base biológica) basado en ASTM D6866. En otro ejemplo, un producto que es 50% material a base de almidón, 25% a base de petróleo, y 25% agua tendría un Contenido de Base Biológica =

25 es de base biológica). En otro ejemplo, un producto que es

50% de carbono orgánico y es un producto a base de petróleo se considera que tiene un Contenido de Base Biológica = 0% (50% de carbono orgánico, pero a partir de fuentes fósiles). Por lo tanto, sobre la base de los métodos bien conocidos y estándares conocidos para determinar el contenido de base biológica de un compuesto o material, un experto en la técnica puede determinar fácilmente el contenido de base biológica y/o productos derivados preparados que utiliza la invención que tienen un contenido de base biológica deseada.

10 Las aplicaciones de técnicas de datación por carbono-14 para cuantificar el contenido de base biológica de los materiales son conocidos en la técnica (Currie et al., Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 172:281-287 (2000)). Por ejemplo, la datación por carbono-14
15 se ha utilizado para cuantificar el contenido de base biológica en los materiales que contienen tereftalato (Colonna et al., Green Chemistry, 13:2543-2548 (2011)). En particular, los polímeros de tereftalato de polipropileno (PPT) derivados de ácido tereftálico derivado del petróleo y
20 1,3-propanodiol renovable resultaron en valores de Fm cerca de 30% (es decir, desde 3/11 de los derivados de carbono polimérico de 1,3-propanodiol renovable y 8/11 a partir del ácido tereftálico del miembro de extremo fósil) (Currie et al., supra, 2000). En contraste, el polímero de tereftalato
25 de polibutileno derivado de tanto el 1,4-butanodiol renovable

como el ácido tereftálico renovable resultó en el contenido de base biológica superior a 90% (Colonna et al, supra, 2011).

En consecuencia, en algunas modalidades, la
5 presente invención proporciona un alqueno o un intermediario de la trayectoria de alqueno que tiene una relación de carbono-12, carbono-13 y carbono-14 que refleja un carbono atmosférico, también referido como carbono del medio ambiente, fuente de absorción. Por ejemplo, en algunos
10 aspectos el alqueno o intermediario de la trayectoria de alqueno puede tener un valor Fm de al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos
15 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o tanto como 100%). En algunas de tales modalidades, la fuente de absorción es CO₂. En algunas modalidades, la presente invención proporciona un alqueno o un intermediario de la trayectoria de alqueno que tiene una relación de carbono-12,
20 carbono-13 y carbono-14 que refleja la fuente de absorción de carbono a base de petróleo. En este aspecto, el alqueno o intermediario de la trayectoria de alqueno puede tener un valor Fm menor que 95%, menor que 90%, menor que 85%, menor que 80%, menor que 75%, menor que 70%, menor que 65%, menor
25 que 60%, menor que 55%, menor que 50%, menor que 45%, menor

que 40%, menor que 35%, menor que 30%, menor que 25%, menor que 20%, menor que 15%, menor que 10%, menor que 5%, menor que 2% o menos de 1%. En algunas modalidades, la presente invención proporciona un alqueno o un intermediario de la

5 trayectoria de alqueno 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. El uso de una combinación de fuentes de absorción es una forma por la cual se pueden

10 variar las relaciones de carbono-12, carbono-13 y carbono-14, y las relaciones respectivas reflejarían las proporciones de las fuentes de absorción.

Además, la presente invención se refiere al alqueno o intermediario de la trayectoria de alqueno producido

15 biológicamente como se describe en la presente, y a los productos derivados de los mismos, en donde el alqueno o intermediario de la trayectoria de alqueno tiene una relación isotópica de carbono-12, carbono-13 y carbono-14 de aproximadamente el mismo valor que el CO_2 que se produce en el

20 medio ambiente. Por ejemplo, en algunos aspectos la invención proporciona alqueno bioderivado o un intermediario de alqueno bioderivado que tiene una relación de carbono-12 contra carbono- 13 contra carbono-14 de aproximadamente el mismo valor que el CO_2 que se produce en el medio ambiente, o

25 cualquiera de las otras relaciones descritas en la presente.

Se entiende, como se describe en la presente, que un producto puede tener una relación isotópica de carbono-12 contra carbono-13 contra carbono-14 de aproximadamente el mismo valor que el CO₂ que se produce en el medio ambiente, o
5 cualquiera de las relaciones descritas en la presente, en donde el producto se genera a partir de un alqueno bioderivado o un intermediario de la trayectoria de alqueno bioderivado como se describe en la presente, en donde el producto bioderivado se modifica químicamente para generar un
10 producto final. Los métodos para la modificación química de un producto bioderivado de alqueno, o un intermediario del mismo, para generar un producto deseado, son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, como se describe en la presente. La invención proporciona además un plástico, un
15 polímero, un copolímero, un intermediario polimérico, una resina, un caucho, o una fibra que tiene una relación isotópica de carbono-12 contra carbono-13 contra carbono-14 de aproximadamente el mismo valor que el CO₂ que se produce en el medio ambiente, en donde un plástico, un polímero, un
20 copolímero, un intermedio polimérico, una resina, un caucho, o una fibra se generan directamente de o en combinación con alqueno bioderivado o un intermediario de la trayectoria de alqueno bioderivado como se describe en la presente.

Los alquenos incluyen una variedad de productos
25 químicos como se describe en la presente, que se pueden

utilizar en aplicaciones comerciales e industriales. Por ejemplo, los alquenos descritos en la presente se pueden utilizar como materia prima en la producción de una amplia gama de productos, incluyendo plásticos, polímeros, 5 copolímeros, intermediarios poliméricos, resinas, cauchos, o fibras. Por consiguiente, en algunas modalidades, la invención proporciona plásticos de base biológica, polímeros, copolímeros, intermediarios poliméricos, resinas, cauchos, o fibras que comprenden uno o más alquenos bioderivados o 10 intermediario de la trayectoria de alqueno bioderivado producido por un microorganismo de origen no natural de la invención o producido utilizando un método descrito en la presente.

Como se utiliza aquí, el término "bioderivado" 15 significa derivado de o sintetizado por un organismo biológico y se puede considerar un recurso renovable ya que puede ser generado por un organismo biológico. Un organismo biológico, en particular los organismos microbianos de la invención descrita en la presente, se puede utilizar como 20 materia prima o biomasa, tales como, azúcares o carbohidratos obtenidos a partir de una fuente agrícola, vegetal, bacteriana, o animal. Alternativamente, el organismo biológico puede utilizar carbono atmosférico. Como se utiliza aquí, el término "base biológica", significa un producto como 25 el descrito anteriormente que está compuesto, en su totalidad

o en parte, de un compuesto bioderivado de la invención. Un producto de base biológica o bioderivado está en contraste con un producto derivado del petróleo, en donde un producto de este tipo se deriva de o sintetiza a partir de petróleo o
5 una materia prima de petroquímica.

En algunas modalidades, la invención proporciona un plástico, un polímero, un copolímero, un intermediario polimérico, una resina, un caucho, o una fibra que comprende un alqueno bioderivado o un intermediario de la trayectoria
10 de alqueno bioderivado, en donde el alqueno bioderivado o intermediario de la trayectoria de alqueno bioderivado incluye la totalidad o parte del alqueno o intermediario de la trayectoria de alqueno utilizado en la producción del plástico, polímero, copolímero, intermediario polimérico,
15 resina, caucho, o de fibra. Por consiguiente, en algunos aspectos, la invención proporciona un plástico de base biológica, polímero, copolímero, intermediario polimérico, resina, caucho, o fibra que comprende al menos 2%, al menos 3%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al
20 menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o 100% alqueno bioderivado o intermediario de la trayectoria de alqueno bioderivado como se describe en la presente. Adicionalmente, en algunos
25 aspectos, la invención proporciona un plástico de base

biológica, polímero, copolímero, intermediario polimérico, resina, caucho, o fibra en donde el alqueno o intermediario de la trayectoria de alqueno utilizado en su producción es una combinación de alqueno derivado de petróleo y bioderivado o intermediario de la trayectoria de alqueno. Por ejemplo, un plástico de base biológica, polímero, copolímero, intermediario polimérico, resina, caucho, o fibra puede producirse utilizando 50% de alqueno bioderivado y 50% de alqueno derivado de petróleo u otras relaciones deseadas tales como 60%/40%, 70%/30%, 80%/20%, 90%/10%, 95%/5%, 100%/0%, 40%/60%, 30%/70%, 20%/80%, 10%/90% de precursores bioderivados/derivados del petróleo, siempre y cuando al menos una porción del producto comprenda un producto bioderivado producido por los organismos microbianos descritos en la presente. Se entiende que los métodos para la producción de plástico, polímero, copolímero, intermediario polimérico, resina, caucho, o fibra utilizando el alqueno bioderivado o intermediario de la trayectoria de alqueno bioderivado de la invención son bien conocidos en la técnica.

Las condiciones de cultivo pueden incluir, por ejemplo, procedimientos de cultivo líquido, así como la fermentación y otros procedimientos de cultivo a gran escala. Como se describe en la presente, los rendimientos particularmente útiles de los productos biosintéticos de la invención, se pueden obtener bajo condiciones de cultivo

anaeróbicas o sustancialmente anaeróbicas.

Como se describe en la presente, una condición de crecimiento a modo de ejemplo para lograr la biosíntesis de alqueno incluye condiciones de cultivo o fermentación anaeróbicas. En ciertas modalidades, los organismos microbianos de origen no natural de la invención se pueden mantener, cultivar o fermentar bajo condiciones anaeróbicas o sustancialmente anaeróbicas. Brevemente, las condiciones anaeróbicas se refieren a un medio ambiente carente de oxígeno. Las condiciones sustancialmente anaerobias incluyen, por ejemplo, un cultivo, la fermentación por lotes o fermentación continua de tal manera que la concentración de oxígeno disuelto en el medio se mantiene entre 0 y 10% de saturación. Las condiciones sustancialmente anaeróbicas también incluye células de crecimiento o en reposo en medio líquido o sobre agar sólido dentro de una cámara sellada mantenida con una atmósfera de menos de 1% de oxígeno. El porcentaje de oxígeno se puede mantener, por ejemplo, por burbujeo del cultivo con una mezcla de N_2/CO_2 u otros gases o gas sin oxígeno adecuados.

Las condiciones de cultivo descritas en la presente se pueden ampliar y desarrollar de forma continua para la manufactura de alqueno. Los procedimientos de crecimiento ejemplares incluyen, por ejemplo, fermentación por alimentación por lote y separación por lotes; la fermentación

por alimentación por lotes y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Todos estos procedimientos son bien conocidos en la técnica. Los procedimientos de fermentación son particularmente útiles
5 para la producción biosintética de cantidades comerciales de alqueno. En general, y como con los procedimientos de cultivo no continuos, la producción continua y/o casi continua de alqueno incluirá el cultivo de un organismo que produce alqueno de origen no natural de la invención en nutrientes y
10 medio suficientes para mantener y/o casi sostener el crecimiento en una fase exponencial. El cultivo continuo bajo tales condiciones puede incluir, por ejemplo, el crecimiento de 1 día, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días o más. Además, el cultivo continuo puede incluir períodos más largos de tiempo de 1
15 semana, 2, 3, 4 o 5 o más semanas y hasta varios meses. Alternativamente, los 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
20 intervalos de tiempo entre estos períodos ejemplares. Se entiende, además, que el tiempo de cultivo del organismo microbiano de la invención es por un período de tiempo suficiente para producir una cantidad suficiente de producto para un propósito deseado.

25 Los procedimientos de fermentación son bien

conocidos en la técnica. Brevemente, la fermentación para la producción biosintética de alqueno se puede utilizar en, por ejemplo, fermentación por alimentación por lotes y separación por lotes; fermentación por alimentación por lotes y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Los ejemplos de procedimientos de fermentación por lotes y continua son bien conocidos en la técnica.

Además de los procedimientos de fermentación anteriores utilizando los productores de alqueno de la invención para la producción continua de cantidades sustanciales de alqueno, los productores de alqueno también pueden ser sometidos simultáneamente, por ejemplo, a los procedimientos de síntesis química para convertir el producto a otros compuestos o el producto se puede separar del cultivo de fermentación y secuencialmente someter a conversión química o enzimática para convertir el producto en otros compuestos, si se desea.

Para generar mejores productores, el modelado metabólico se puede utilizar para optimizar las condiciones de crecimiento. El modelado también se puede utilizar para diseñar desactivaciones génicas que optimizan, además, la utilización de la trayectoria (véase, por ejemplo, publicaciones de patentes de Estados Unidos US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 y US 2004/0009466, y la patente

de Estados Unidos N° 7,127,379). Los análisis de modelado permiten predicciones fiables de los efectos sobre el crecimiento celular de cambiar el metabolismo hacia una producción más eficiente de alqueno.

5 Un método computacional para la identificación y el diseño de las alteraciones metabólicas que favorecen la biosíntesis de un producto deseado es la estructura computacional OptKnock (Burgard et al, Biotechnol. Bioeng. 84:647-657 (2003)). La OptKnock es un programa de simulación
10 y de modelado metabólico que sugiere estrategias de alteración o supresión de genes que producen los microorganismos genéticamente estables que sobreproducen el producto objetivo. Específicamente, la estructura examina la red bioquímica y/o metabólica completa de un microorganismo
15 para sugerir las manipulaciones genéticas que fuerzan la bioquímica deseada para convertirse en un subproducto obligatorio de crecimiento celular. Por el acoplamiento de la producción bioquímica con el crecimiento celular a través de las supresiones de genes colocados estratégicamente u otra
20 interrupción del gen funcional, las presiones de selección de crecimiento impuestas en las cepas modificadas genéticamente después de largos períodos de tiempo en un biorreactor conducen a mejoras en el rendimiento como un resultado de la producción bioquímica acoplada al crecimiento obligatorio.
25 Por último, cuando se construyen las supresiones de genes

existe una posibilidad insignificante de que las cepas diseñadas vuelvan a sus estados de tipo silvestre debido a que los genes seleccionados por OptKnock serán retirados completamente del genoma. Por lo tanto, esta metodología computacional se puede utilizar para identificar trayectorias alternativas que conducen a la biosíntesis de un producto deseado o utilizado en relación con los organismos microbianos de origen no natural para una mayor optimización de la biosíntesis de un producto deseado.

En resumen, 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 una estructura de modelos y métodos que incorporan restricciones particulares en modelos de análisis de balance de flujos (FBA). Estas restricciones incluyen, por ejemplo, la información cualitativa cinética, información normativa cualitativa y/o datos experimentales de microarreglo de ADN. La OptKnock también calcula soluciones a varios problemas metabólicos, por ejemplo, el endurecimiento de los límites de flujo derivados a través de modelos de balance de flujo y, posteriormente, el sondeo de los límites de rendimiento de redes metabólicas en la presencia de adiciones o supresiones de genes. La estructura computacional OptKnock permite la construcción de formulaciones de modelo que permiten una consulta efectiva de los límites de rendimiento de las redes

metabólicas y proporciona métodos para la solución de los problemas de programación lineal entera mixta, resultantes. Los métodos de simulación y modelado metabólicos referidos en la presente como OptKnock se describen en, por ejemplo, la
5 publicación de Estados Unidos 2002/0168654, presentada el 10 de enero de 2002, en la patente internacional No. PCT/US02/00660, presentada el 10 de enero de 2002, y la publicación de Estados Unidos 2009/0047719, presentada el 10 de agosto de 2007.

10 Otro método computacional para la identificación y el diseño de las alteraciones metabólicas que favorecen la producción biosintética de un producto es un sistema de simulación y modelado metabólico denominado SimPheny®. Este método y sistema computacional se describe en, por ejemplo,
15 la publicación de Estados Unidos 2003/0233218, presentada el 14 de junio de 2002, y en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US03/18838, presentada el 13 de junio de 2003. SimPheny® es un sistema computacional que se puede utilizar para producir un modelo de red in silico y para
20 simular el flujo de masa, energía o carga a través de las reacciones químicas de un sistema biológico para definir un espacio de la solución que contiene cualquiera y todas las posibles funcionalidades de las reacciones químicas en el sistema, determinando de ese modo una gama de actividades
25 permitidas para el sistema biológico. Este enfoque se conoce

como el modelado basado en restricciones debido a que el espacio de la solución se define por las restricciones tales como la estequiometría conocida de las reacciones incluidas, así como las restricciones de capacidad y termodinámicas de reacción asociadas con los flujos máximos a través de 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 las realidades biológicas a causa de que los sistemas biológicos son flexibles y pueden alcanzar el mismo resultado de muchas maneras diferentes. Los sistemas biológicos están diseñados a través de los mecanismos evolutivos que han sido restringidas por las restricciones fundamentales que todos los sistemas vivos deben afrontar. Por lo tanto, la estrategia de modelado basado en restricciones incluye estas realidades generales. Además, la capacidad para imponer continuamente restricciones adicionales en un modelo de red a través del endurecimiento de las restricciones resulta en una reducción en el tamaño del espacio de soluciones, mejorando así la precisión con la que el rendimiento fisiológico o fenotipo se pueden predecir.

En vista de las enseñanzas y orientaciones proporcionadas en la presente, aquellos expertos en la

técnica serán capaces de aplicar varias estructuras computacionales para el modelado y simulación metabólica para diseñar y poner en práctica la biosíntesis de un compuesto deseado en organismos microbianos huésped. Tales métodos de
5 modelado y simulación metabólicos incluyen, por ejemplo, los sistemas computacionales ejemplificados anteriormente como SimPheny® y OptKnock. Para la ilustración de la invención, algunos de los métodos se describen en la presente con referencia a la estructura computacional OptKnock para el
10 modelado y la simulación. Aquellos expertos en la técnica sabrán cómo aplicar la identificación, diseño y ejecución de las alteraciones metabólicas que utilizan OptKnock a cualquiera de otras estructuras computacionales de modelado y simulación metabólicas y métodos bien conocidos en la
15 técnica.

Los métodos descritos anteriormente proporcionarán un conjunto de reacciones metabólicas para interrumpir. La eliminación de cada reacción dentro del conjunto o modificación metabólica puede resultar en un producto deseado
20 como un producto obligatorio durante la fase de crecimiento del organismo. Debido a que las reacciones son conocidas, una solución para el problema de OptKnock de dos niveles también proporcionará el gen asociado o genes que codifican una o más enzimas que catalizan cada reacción dentro del conjunto de
25 reacciones. La identificación de un conjunto de reacciones y

sus genes correspondientes que codifican las enzimas que participan en cada reacción es generalmente un proceso automatizado, logrado a través de la correlación de las reacciones con una base de datos de reacción que tiene una
5 relación entre las enzimas y los genes codificantes.

Una vez identificado, el conjunto de reacciones que serán interrumpidas con el fin de lograr la producción de un producto deseado se implementan en la célula u organismo objetivo por interrupción funcional de al menos un gen que
10 codifica cada reacción metabólica dentro del conjunto. Un medio particularmente útil para lograr la interrupción funcional del conjunto de reacciones es por eliminación de cada gen de codificación. Sin embargo, en algunos casos, puede ser beneficioso interrumpir la reacción por otras
15 aberraciones genéticas que incluyen, por ejemplo, mutación, supresión de regiones reguladoras, tales como promotores o sitios de unión de cis para factores reguladores, o por truncamiento de la secuencia de codificación en cualquiera de un número de localizaciones. Estas últimas aberraciones, que
20 resultan en menos de la supresión total del conjunto de genes pueden ser útiles, por ejemplo, cuando se desean evaluaciones rápidas del acoplamiento de un producto o cuando es menos probable que se produzca la reversión genética.

Para identificar soluciones productivas adicionales
25 al problema de OptKnock de dos niveles descrito anteriormente

que conducen a conjuntos adicionales de reacciones para interrumpir o modificaciones metabólicas que pueden resultar en la biosíntesis, incluyendo la biosíntesis de crecimiento emparejado de un producto deseado, se puede implementar un

5 método de optimización, denominado cortes de número entero. Este método procede resolviendo iterativamente el problema OptKnock ejemplificado anteriormente con la incorporación de una restricción adicional referida como un corte de número entero en cada iteración. Las restricciones de corte de

10 números enteros impiden efectivamente el procedimiento de solución de elegir exactamente el mismo conjunto de reacciones identificadas en cualquier iteración anterior que obligatoriamente empareja la biosíntesis del producto al crecimiento. Por ejemplo, si una modificación metabólica de

15 crecimiento emparejado previamente identificado especifica las reacciones 1, 2, y 3 para la interrupción, entonces la siguiente restricción previene que las mismas reacciones sean consideradas simultáneamente en soluciones posteriores. El método de corte de número entero es bien conocido en la

20 técnica y se puede encontrar descrito en, por ejemplo, Burgard et al, Biotechnol. Prog. 17:791-797 (2001). Al igual que con todos los métodos descritos en la presente con referencia a su uso en combinación con la estructura computacional OptKnock para modelación metabólica y

25 simulación, el método de corte de número entero de reducción

de la redundancia en el análisis computacional iterativo también se puede aplicar con otras estructuras computacionales bien conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, SimPheny®.

5 Los métodos ejemplificados en la presente permiten la construcción de células y organismos que producen biosintéticamente un producto deseado, incluyendo el acoplamiento obligatorio de la producción de un producto bioquímico objetivo para el crecimiento de la célula u
10 organismo modificado genéticamente para albergar las alteraciones genéticas identificadas. Por lo tanto, los métodos computacionales descritos en la presente permiten la identificación e implementación de las modificaciones metabólicas que se identifican por un método in silico
15 seleccionado de OptKnock o SimPheny®. El conjunto de modificaciones metabólicas puede incluir, por ejemplo, la adición de una o más enzimas de la trayectoria de biosíntesis y/o alteración funcional de una o más reacciones metabólicas incluyendo, por ejemplo, alteración por supresión del gen.

20 Como se discutió anteriormente, la metodología OptKnock se desarrolló en la premisa de que las redes microbianas mutantes pueden evolucionar hacia sus fenotipos de máximo crecimiento computacionalmente predichos cuando se someten a largos periodos de selección de crecimiento. En
25 otras palabras, el procedimiento aprovecha la capacidad de un

organismo para auto-optimizarse bajo presiones selectivas. La estructura OptKnock permite la enumeración exhaustiva de las combinaciones de supresión de genes que obligan a un acoplamiento entre la producción bioquímica y el crecimiento celular basado en la estequiometría de la red. La identificación de desactivaciones génicas/de reacción óptimas requiere la solución de un problema de optimización de dos niveles que elige el conjunto de reacciones activas de tal manera que una solución óptima de crecimiento para la red resultante sobreproduce la bioquímica de interés (Burgard et al., *Biotechnol. Bioeng.* 84:647-657 (2003)).

Un modelo estequiométrico *in silico* del metabolismo de *E. coli* se puede emplear para identificar los genes esenciales para las trayectorias metabólicas como se ejemplificó anteriormente y se describe, por ejemplo, en las publicaciones de patente de Estados Unidos 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 de Estados Unidos No. 7,127,379. Como se describe en la presente, la estructura matemática OptKnock se puede aplicar para identificar las supresiones de genes que conducen a la producción acoplada al crecimiento de un producto deseado. Además, la solución del problema de OptKnock de dos niveles proporciona solamente un conjunto de supresiones. Para enumerar todas las soluciones

significativas, es decir, todos los conjuntos de desactivaciones que conducen a la formación de la producción acoplada al crecimiento, se puede implementar una técnica de optimización, llamada cortes de números enteros. Esto implica
5 resolver de manera iterativa el problema de OptKnock con la incorporación de una restricción adicional referida como un corte de número entero en cada iteración, como se discutió anteriormente.

Como se describe en la presente, un ácido nucleico
10 que codifica una actividad deseada de una trayectoria de alqueno se puede introducir en un organismo huésped. En algunos casos, puede ser deseable modificar una actividad de una proteína o enzima de la trayectoria de alqueno para aumentar la producción de alqueno. Por ejemplo, las
15 mutaciones conocidas que incrementan la actividad de una proteína o enzima se pueden introducir en una molécula de ácido nucleico codificante. Además, se pueden aplicar métodos de optimización para aumentar la actividad de una enzima o proteína y/o disminuir una actividad inhibidora, por ejemplo,
20 disminuir la actividad de un regulador negativo.

Tal método de optimización es evolución dirigida. La evolución dirigida es un procedimiento poderoso que implica la introducción de mutaciones dirigidas a un gen específico para mejorar y/o alterar las propiedades de una
25 enzima. Las enzimas mejoradas y/o alteradas se pueden

identificar a través del desarrollo e implementación de ensayos de selección de alto rendimiento sensibles que permiten la selección automatizada de muchas variantes de la enzima (por ejemplo, $>10^4$). Las rondas iterativas de mutagénesis y selección típicamente se realizan para proporcionar una enzima con propiedades optimizadas. Los algoritmos computacionales que pueden ayudar a identificar las áreas del gen para la mutagénesis también se han desarrollado y pueden reducir significativamente el número de variantes de la enzima que necesitan ser generadas y seleccionadas. Se han desarrollado numerosas tecnologías de evolución dirigida (para revisiones, ver Hibbert et al., *Biomol. Eng* 22:11-19 (2005); Huisman y 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 de variantes, y estos métodos se han aplicado con éxito a la mejora de un amplio rango de propiedades a través de muchas clases de enzimas. Las características de enzimas que se han mejorado y/o alterado por las tecnologías de evolución dirigida incluyen, por ejemplo: selectividad/especificidad, para la conversión de sustratos no naturales; estabilidad de temperatura, para sólido procesamiento de alta temperatura; estabilidad de pH,

para bioprocesamiento bajo condiciones de pH inferiores o mayores; tolerancia al producto o sustrato, de modo que se pueden lograr altos títulos de productos; unión (K_m), incluyendo ampliación de unión de sustrato para incluir
5 sustratos no naturales; inhibición (K_i), para remover la inhibición por productos, sustratos, o intermediarios claves; actividad (kcat), para aumentar las velocidades de reacción enzimática para lograr el flujo deseado; niveles de expresión, para aumentar los rendimientos de proteína y el
10 flujo de trayectoria total; estabilidad de oxígeno, para la operación de enzimas sensibles al aire bajo condiciones aeróbicas; y actividad anaeróbica, para la operación de una enzima aeróbica en la ausencia de oxígeno.

Se ha desarrollado Un número de métodos ejemplares
15 para la mutagénesis y diversificación de los genes para dirigir las propiedades deseadas de enzimas específicas. Tales métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Cualquiera de estos se pueden utilizar para alterar y/u optimizar la actividad de una enzima o proteína de la
20 trayectoria de alqueno. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a EpPCR, que introduce mutaciones puntuales aleatorias reduciendo la fidelidad de la ADN polimerasa en reacciones de PCR (Pritchard et al., *J Theor. Biol* 234:497-509 (2005)); Amplificación por Círculo Rodante Propensa a
25 Errores (epRCA), que es similar a epPCR excepto que se

utiliza un plásmido circular completo como la plantilla y se utilizan 6-mers aleatorias con enlaces de tiofosfato resistentes a la exonucleasa en los últimos 2 nucleótidos para amplificar el plásmido seguido por transformación en
5 células en las cuales el plásmido se re-circulariza en repeticiones en tándem (Fujii et al., *Nucleic Acids Res.* 32:e145 (2004); y Fujii et al., *Nat. Protoc.* 1:2493-2497 (2006)); Transposición de ADN o de Familia de genes, que generalmente implica la digestión de dos o más genes
10 variantes con nucleasas tales como Dnasa I o Endov para generar un conjunto de fragmentos aleatorios que se vuelven a ensamblar por los ciclos de hibridación y extensión en presencia de la ADN polimerasa para crear una biblioteca de genes quiméricos (Stemmer, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10747-
15 10751 (1994); y Stemmer, *Nature* 370:389-391 (1994)); Extensión Escalonada (StEP), que implica cebado de plantilla seguido por ciclos repetidos de PCR de 2 etapas con desnaturalización y duración muy corta de hibridación/extensión (tan corta como 5 seg) (Zhao et al.,
20 *Nat. Biotechnol.* 16:258-261 (1998)); Recombinación de Cebado Aleatorio (RPR), en el que los cebadores de secuencia aleatorios se utilizan para generar fragmentos de ADN muy cortos complementarios para diferentes segmentos de la plantilla (Shao et al., *Nucleic Acids Res* 26:681-683 (1998)).
25 Los métodos adicionales incluyen Recombinación

Heterodúplex, en la cual el plásmido de ADN linealizado se utiliza para formar heterodúplex que se reparan por reparación no coincidente (Volkov et al., *Nucleic Acids Res.* 27:e18 (1999), y Volkov et al., *Methods Enzymol.* 328:456-463 (2000)); Quimeragénesis Aleatoria en Plantillas Transitorias (RACHITT), que emplea la fragmentación de Dnasa I y fraccionamiento de tamaño de ADN de hebra única (ssADN) (Coco et al., *Nat. Biotechnol.* 19:354-359 (2001)); Extensión Recombinada en plantillas Truncadas (RETT), que implica el cambio de plantilla de hebras que crecen unidireccionalmente de cebadores en la presencia de fragmentos de ssADN unidireccionales como un grupo de plantillas (Lee et al., *J. Molec. Catalysis* 26:119-129 (2003)); Transposición de Genes de Oligonucleótidos Degenerados (DOGS), en la que se utilizan cebadores degenerados para controlar la recombinación entre las moléculas; (Bergquist and Gibbs, *Methods Mol. Biol* 352:191-204 (2007); Bergquist et al., *Biomol. Eng* 22:63-72 (2005); Gibbs et al., *Gene* 271:13-20 (2001)); Truncamiento Gradual para la Creación de Enzimas Híbridas (ITCHY), que crea una biblioteca combinatoria con supresiones de 1 par de base de un gen o fragmento de gen de interés (Ostermeier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3562-3567 (1999), y Ostermeier et al., *Nat. Biotechnol.* 17:1205-1209 (1999)); Truncamiento Tio-Gradual para la Creación de Enzimas Híbridas (THIO-ITCHY), que es similar a ITCHY excepto que se utilizan

fosfotioato dNTP para generar truncamientos (Lutz et al.,
Nucleic Acids Res 29: E16 (2001)); SCRATCHY, que combina dos
métodos para recombinar genes, ITCHY y Tranposición de ADN
(Lutz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11248-11253
5 (2001)); Mutagénesis de Deriva Aleatoria (RNDM), en la cual
las mutaciones realizadas vía epPCR son seguidas por
detección/selección para aquellas que retienen actividad
usable (Bergquist et al., *Biomol. Eng.* 22:63-72 (2005));
Mutagénesis de Saturación de Secuencia (SeSaM), un método de
10 mutagénesis aleatoria que genera un conjunto de fragmentos de
longitud aleatoria utilizando la incorporación aleatoria de
un nucleótido de fosfotioato y escisión, que se utiliza como
una plantilla para extenderse en la presencia de bases
"universales" tal como inosina, y la replicación de un
15 complemento que contiene inosina produce la incorporación de
base aleatoria y, en consecuencia, la 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, que utiliza
20 oligonucleótidos superpuestos diseñados para codificar "toda
la diversidad genética en los objetivos" y permite una
diversidad muy alta de la progenie transpuesta (Ness et al.,
Nat. Biotechnol. 20: 1251-1255 (2002)); Tecnología de
Excisión e Intercambio de Nucleótidos NextT, que aprovecha una
25 combinación de incorporación de dUTP seguido por tratamiento

con uracil ADN glicosilasa y luego piperidina para realizar la fragmentación de ADN de punto final (Muller et al., *Nucleic Acids Res.* 33:e117 (2005)).

Los métodos adicionales incluyen Recombinación de
5 Proteína Independiente de la Homología de Secuencia (SHIPREC), en la cual se utiliza un enlazante para facilitar la fusión entre dos genes lejanamente relacionados o no relacionados, y se genera un rango de quimeras entre los dos genes, que resulta en bibliotecas de híbridos de
10 entrecruzamiento único (Sieber et al., *Nat. Biotechnol.* 19:456-460 (2001)); Mutagénesis de Saturación de Sitio de GenesTM (GSSMTM), en la cual los materiales de partida incluyen un plásmido de ADN de doble hebra superenrollado (dsADN) que contiene un inserto y dos cebadores que se degeneran en el
15 sitio deseado de las mutaciones (Kretz et al., *Methods Enzymol.* 388:3-11 (2004)); Mutagénesis de Casete Combinatoria (CCM), que implica el uso de casetes de oligonucleótidos cortos para reemplazar regiones limitadas con un gran número de posibles alteraciones de secuencias de aminoácidos
20 (Reidhaar-Olson et al., *Methods Enzymol* 208:564-586 (1991); y Reidhaar-Olson et al., *Science* 241:53-57 (1988)); Mutagénesis de Casetes Múltiples Combinatoria (CMCM), que es esencialmente similar a CCM y utiliza epPCR a alta tasa de mutación para identificar puntos calientes y regiones
25 calientes y luego 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, que utilizan el gen *mutD5*, que codifica una subunidad mutante de ADN polimerasa III, para permitir aumentos de 20 a 4000-X en la frecuencia de mutación aleatoria y natural durante la selección y acumulación de bloque de mutaciones deletéreas cuando no se requiere la selección (Selifonova et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3645-3649 (2001)); Low et al., *J. Mol. Biol.* 260:359-3680 (1996)).

Los métodos ejemplares adicionales incluyen Mutagénesis Look-Through (LTM), que es un método de mutagénesis multidimensional que evalúa y optimiza las mutaciones combinatorias de aminoácidos seleccionados (Rajpal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:8466-8471 (2005)); Reensamblaje de Genes, que es un método de transposición de ADN que se puede aplicar a múltiples genes al mismo tiempo o para crear una gran biblioteca de quimeras (múltiples mutaciones) de un gen único (Tunable GeneReassembly™ (TGR™) Tecnología suministrada por Verenium Corporation), Automatización de Diseño de Proteína *in Silico* (PDA), que es un algoritmo de optimización que ancla el esqueleto de la proteína estructuralmente definida que posee un pliegue particular, y busca espacio de secuencia para las

sustituciones de aminoácidos que pueden estabilizar el pliegue y la energética de proteínas total, y generalmente funciona más efectivamente en proteínas con estructuras tridimensionales conocidas (Hayes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:15926-15931 (2002)); y Mutagénesis de Saturación Iterativa (ISM), que implica utilizar el conocimiento de la estructura/función para elegir un sitio probable para la mejora de la enzima, realizando mutagénesis de saturación en el sitio elegido utilizando un método de mutagénesis como Stratagene QuikChange (Stratagene; San Diego CA), detección/selección para propiedades deseadas y, utilizando clones mejorados, iniciando en otro sitio y continuando la repetición 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 mencionados anteriormente para la mutagénesis se pueden utilizar solos o en cualquier combinación. Además, cualquiera o una combinación de los métodos de evolución dirigida se pueden utilizar en conjunción con las técnicas de evolución adaptativa, como se describe en la presente.

Se entiende que las modificaciones que no afectan sustancialmente la actividad de las diversas modalidades de esta invención también se proporcionan dentro de la definición de la invención proporcionada en la presente. En

20

15

10

5

Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima	Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima	Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima
2.7.1.1	hexocinasa	2.7.1.48	uridina cinasa	2.7.1.94	acilglicerol cinasa
2.7.1.2	glucocinasa	2.7.1.49	hidroximetilpirimidina cinasa	2.7.1.95	canamicina cinasa
2.7.1.3	cetohexocinasa	2.7.1.50	hidroxietiltiazol cinasa	2.7.1.100	S-metil-5-tiorribosa cinasa
2.7.1.4	fructocinasa	2.7.1.51	L-fuculocinasa	2.7.1.101	tagatosa cinasa
2.7.1.5	ramnulocinasa	2.7.1.52	fucocinasa	2.7.1.102	hamamelosa cinasa
2.7.1.6	galactocinasa	2.7.1.53	L-xilulocinasa	2.7.1.103	viomicina cinasa
2.7.1.7	manocinasa	2.7.1.54	D-arabinocinasa	2.7.1.105	6-fosfofructo-2-cinasa
2.7.1.8	glucosamina cinasa	2.7.1.55	alosa cinasa	2.7.1.106	glucosa-1,6-bisfosfato sintasa
2.7.1.10	fosfogluocinasa	2.7.1.56	1-fosfofructocinasa	2.7.1.107	diacilglicerol cinasa
2.7.1.11	6-fosfofructocinasa	2.7.1.58	2-deshidro-3- desoxigalactonocinasa	2.7.1.108	dolicol cinasa
2.7.1.12	gluconocinasa	2.7.1.59	N-acetilglucosamina cinasa	2.7.1.113	desoxiguanosina cinasa
2.7.1.13	deshidrogluconocinasa	2.7.1.60	N-acilmanosamina cinasa	2.7.1.114	AMP-timidina cinasa
2.7.1.14	sedoheptulocinasa	2.7.1.61	acil-fosfato-hexosa fosfotransferasa	2.7.1.118	ADP-timidina cinasa
2.7.1.15	ribocinasa	2.7.1.62	fosforamidato-hexosa fosfotransferasa	2.7.1.119	higromicina-B 7"-O- cinasa
2.7.1.16	ribulocinasa	2.7.1.63	polifosfato-glucosa fosfotransferasa	2.7.1.121	fosfoenolpiruvato- glicerona fosfotransferasa
2.7.1.17	xilulocinasa	2.7.1.64	inositol 3-cinasa	2.7.1.122	xilitol cinasa

110

20

15

10

5

Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima	Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima	Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima
2.7.1.18	fosforibocinasa	2.7.1.65	escilo-inosamina 4-cinasa	2.7.1.127	inositol-trisfosfato 3-cinasa
2.7.1.19	fosforribulocinasa	2.7.1.66	undecaprenol cinasa	2.7.1.130	tetraacildisacárido 4'-cinasa
2.7.1.20	adenosina cinasa	2.7.1.67	1-fosfatidilinositol 4-cinasa	2.7.1.134	inositol-tetrakisfosfato 1-cinasa
2.7.1.21	timidina cinasa	2.7.1.68	1-fosfatidilinositol-4-fosfato 5-cinasa	2.7.1.136	macrólido 2'-cinasa
2.7.1.22	ribosilnicotinamida cinasa	2.7.1.69	proteína-Np-fosfohistidina-azúcar fosfotransferasa	2.7.1.137	fosfatidilinositol 3-cinasa
2.7.1.23	NAD ⁺ cinasa	2.7.1.70	idéntico a EC 2.7.1.37.	2.7.1.138	ceramida cinasa
2.7.1.24	defosfo-CoA cinasa	2.7.1.71	siquimato cinasa	2.7.1.140	inositol-tetrakisfosfato 5-cinasa
2.7.1.25	adenilil-sulfato cinasa	2.7.1.72	estreptomicina 6-cinasa	2.7.1.142	glicerol-3-fosfato-glucosa fosfotransferasa
2.7.1.26	riboflavina cinasa	2.7.1.73	inosina cinasa	2.7.1.143	difosfato-purina nucleósido cinasa
2.7.1.27	eritritol cinasa	2.7.1.74	desoxicitidina cinasa	2.7.1.144	tagatosa-6-fosfato cinasa
2.7.1.28	triocinasa	2.7.1.76	desoxiadenosina cinasa	2.7.1.145	desoxinucleósido cinasa
2.7.1.29	glicerona cinasa	2.7.1.77	nucleósido fosfotransferasa	2.7.1.146	fosfofructocinasa dependiente de ADP
2.7.1.30	glicerol cinasa	2.7.1.78	polinucleótido 5'-hidroxil-cinasa	2.7.1.147	glucocinasa dependiente de ADP

111

117

20

15

10

5

Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima	Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima	Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima
2.7.1.31	glicerato cinasa	2.7.1.79	difosfato-glicerol fosfotransferasa	2.7.1.148	4-(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol cinasa
2.7.1.32	colina cinasa	2.7.1.80	difosfato-serina fosfotransferasa	2.7.1.149	1-fosfatidilinositol-5-fosfato 4-cinasa
2.7.1.33	pantotenato cinasa	2.7.1.81	hidroxilisina cinasa	2.7.1.150	1-fosfatidilinositol-3-fosfato 5-cinasa
2.7.1.34	pantoteína cinasa	2.7.1.82	etanolamina cinasa	2.7.1.151	inositol-polifosfato multicinasa
2.7.1.35	piridoxal cinasa	2.7.1.83	pseudouridina cinasa	2.7.1.153	fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa
2.7.1.36	mevalonato cinasa	2.7.1.84	alquilglicerona cinasa	2.7.1.154	fosfatidilinositol-4-fosfato 3-cinasa
2.7.1.39	homoserina cinasa	2.7.1.85	β -glucósido cinasa	2.7.1.156	adenosilcobinamida cinasa
2.7.1.40	piruvato cinasa	2.7.1.86	NADH cinasa	2.7.1.157	N-acetilgalactosamina cinasa
2.7.1.41	glucosa-1-fosfato fosfodismutasa	2.7.1.87	estreptomicina 3"-cinasa	2.7.1.158	inositol-pentakisfosfato 2-cinasa
2.7.1.42	riboflavina fosfotransferasa	2.7.1.88	dihidroestreptomicina-6-fosfato 3'a-cinasa	2.7.1.159	inositol-1,3,4-trisfosfato 5/6-cinasa
2.7.1.43	glucuronocinasa	2.7.1.89	tiamina cinasa	2.7.1.160	2'-fosfotransferasa
2.7.1.44	galacturonocinasa	2.7.1.90	difosfato-fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa	2.7.1.161	riboflavina cinasa dependiente de CTP

112

117

20

15

10

5

Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima	Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima	Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima
2.7.1.45	2-deshidro-3- desoxigluconocinasa	2.7.1.91	esfinganina cinasa	2.7.1.162	N-acetilhexosamina 1- cinasa
2.7.1.46	L-arabinocinasa	2.7.1.92	5-deshidro-2- desoxigluconocinasa	2.7.1.163	higromicina B 4-O-cinasa
2.7.1.47	D-ribulocinasa	2.7.1.93	alquilglicerol cinasa	2.7.1.164	O-fosfoseril-tRNA ^{Sec} cinasa

La mevalonato cinasa (EC 2.7.1.36) fosforila el grupo hidroxilo terminal del mevalonato. Los genes candidatos para esta etapa incluyen *erg12* de *S. cerevisiae*, *mvk* de *Methanocaldococcus jannaschi*, *MVK* de *Homo sapeins* y *mvk* de *Arabidopsis thaliana* col. Las mevalonato cinasas candidatas adicionales incluyen la mevalonato cinasa resistente a la realimentación de la arquea *Methanosarcina mazei* (Primak et al., *AEM*, en imprenta (2011)) y la proteína *Mvk* de *Streptococcus pneumoniae* (Andreassi et al., *Protein Sci.*, 16:983-9 (2007)). Las proteínas *Mvk* de *S. cerevisiae*, *S. pneumoniae* y *M. mazei* se expresaron de forma heteróloga y se caracterizaron en *E. coli* (Primak et al., *supra*). La mevalonato cinasa de *S. pneumoniae* fue activa en varios sustratos alternativos incluyendo ciclopropilmevalonato, vinilmevalonato y etinilmevalonato (Kudoh et al., *Bioorg Med Chem.* 18:1124-1134 (2010)), y un estudio subsecuente determinó que el sitio de unión de ligando es selectivo para los sustituyentes C(3) compactos ricos en electrones (Lefurgy et al., *J Biol Chem* 285:20654-63 (2010)).

Proteína	ID de GenBank	Número de GI	Organismo
<i>erg12</i>	CAA39359.1	3684	<i>Sachharomyces cerevisiae</i>
<i>mvk</i>	Q58487.1	2497517	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>
<i>mvk</i>	AAH16140.1	16359371	<i>Homo sapiens</i>
<i>mvk</i>	NP_851084.1	30690651	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>mvk</i>	NP_633786.1	21227864	<i>Methanosarcina mazei</i>
<i>mvk</i>	NP_357932.1	15902382	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

La glicerol cinasa también fosforila el grupo hidroxilo terminal en glicerol para formar glicerol-3-fosfato. Esta reacción ocurre en varias especies, incluyendo *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, y *Thermotoga* 5 *maritima*. Se ha mostrado que la glicerol cinasa de *E. coli* acepta sustratos alternativos tales como dihidroxiacetona y gliceraldehído (Hayashi et al., *J Biol. Chem.* 242:1030-1035 (1967)). *T. maritime* tiene dos glicerol cinasas (Nelson et al., *Nature* 399:323-329 (1999)). Se ha mostrado que las 10 glicerol cinasas tienen un amplio rango de especificidad de sustrato. Crans and Whiteside estudiaron las glicerol cinasas de cuatro organismos diferentes (*Escherichia coli*, *S. cerevisiae*, *Bacillus stearothermophilus*, y *Candida mycoderma*) (Crans et al., *J. Am. Chem. Soc.* 107:7008-7018 (2010); Nelson et al., *supra*, (1999)). Estudiaron 66 análogos diferentes de 15 glicerol y concluyeron que la enzima podría aceptar una gama de sustituyentes en lugar de un grupo hidroxilo terminal y que el átomo de hidrógeno en C2 podría ser remplazado por un grupo metilo. De manera interesante, las constantes cinéticas 20 de la enzima de todos los cuatro organismos fueron muy similares.

25

Proteína	ID de GenBank	Número de GI	Organismo
glpK	AP_003883.1	89110103	<i>Escherichia coli</i> K12
glpK1	NP_228760.1	15642775	<i>Thermotoga maritime</i> MSB8
glpK2	NP_229230.1	15642775	<i>Thermotoga maritime</i> MSB8
Gut1	NP_011831.1	82795252	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

La homoserina cinasa es otro posible candidato. Esta enzima también está presente en un número de organismos incluyendo *E. coli*, *Streptomyces sp*, y *S. cerevisiae*. Se ha
5 mostrado que la homoserina cinasa de *E. coli* tiene actividad en numerosos sustratos, incluyendo, L-2-amino, 1,4-butanodiol, aspartato semialdehído, y 2-amino-5-hidroxivalerato (Huo et al., *Biochemistry* 35:16180-16185 (1996); Huo et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 330:373-379
10 (1996)). Esta enzima puede actuar sobre sustratos donde el grupo carboxilo en la posición alfa se ha reemplazado por un éster o por un grupo hidroximetilo. Los genes candidatos son:

Proteína	ID de GenBank	Número de GI	Organismo
thrB	BAB96580.2	85674277	<i>Escherichia coli</i> K12
SACT1DRAFT_4809	ZP_06280784.1	282871792	<i>Streptomyces sp.</i> ACT-1
Thr1	AAA35154.1	172978	<i>Saccharomyces serevisiae</i>

Fosfato liasa (Figura 1, Etapa B)

Las enzimas fosfato liasa catalizan la conversión de fosfatos de alquilo a alquenos. Las liasas de carbono-
20 oxígeno que operan en los fosfatos se encuentran en la clase de enzima EC 4.2.3. La tabla a continuación lista varias enzimas relevantes en la clase EC 4.2.3.

Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima
4.2.3.5	Corismato sintasa

Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima
4.2.3.15	Mirceno sintasa
4.2.3.26	Linalool sintasa
4.2.3.27	Isopreno sintasa
4.2.3.36	Terpentrieno sintasa
4.2.3.46	(E,E)-alfa-Farneseno sintasa
4.2.3.47	Beta-Farneseno sintasa
4.2.3.49	Nerolidol sintasa

La corismato sintasa (EC 4.2.3.5) participa en la trayectoria de siquimato, que cataliza la desfosforilación de 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato a corismato. La enzima requiere mononucleótido de flavina reducido (FMN) como un cofactor, aunque la reacción neta de la enzima no implica un cambio redox. En contraste con la enzima encontrada en plantas y bacterias, la corismato sintasa en los hongos también es capaz de reducir el FMN a expensas de NADPH (Macheroux et al., *Planta* 207:325-334 (1999)). Las enzimas monofuncionales representativas se codifican 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)). Las 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	No. de Acceso de GenBank	No. de GI	Organismo
aroC	NP_416832.1	16130264	<i>Escherichia coli</i>
aroC	ACH47980.1	197205483	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
U25818.1:19..1317	AAC49056.1	976375	<i>Neurospora crassa</i>
ARO2	CAA42745.1	3387	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

5

10

15

20

La isopreno sintasa cataliza naturalmente la conversi3n de difosfato de dimetilalilo a isopreno, pero tambi3n puede catalizar la s3ntesis de 1,3-butadieno a partir de 2-butenil-4-difosfato. Las isopreno sintasas se pueden encontrar en varios organismos incluyendo *Populus alba* (Sasaki et al., FEBS Letters, 2005, 579 (11), 2514-2518), *Pueraria montana* (Lindberg et al., *Metabolic Eng.*, 12(1):70-79 (2010); Sharkey et al., *Plant Physiol.*, 137(2):700-712 (2005)), y *Populus tremula* x *Populus alba*, tambi3n llamada *Populus canescens* (Miller et al., *Planta*, 2001, 213 (3), 483-487). Se determin3 la estructura cristalina de la isopreno sintasa de *Populus canescens* (Koksal et al., *J Mol Biol.* 402:363-373 (2010)). Las enzimas isopreno sintasa adicionales se describen en (Chotani et al., WO/2010/031079, Systems Using Cell Culture for Production of Isoprene; Cervin et al., Solicitud de Patente de Estados Unidos 20100003716, Isoprene Sintasa Variants for Improved Microbial Production of Isoprene).

25

Prote3na	ID de GenBank	N3mero de GI	Organismo
ispS	BAD98243.1	63108310	<i>Populus alba</i>

Proteína	ID de GenBank	Número de GI	Organismo
ispS	AAQ84170.1	35187004	<i>Pueraria montana</i>
ispS	CAC35696.1	13539551	<i>Populus tremula x Populus alba</i>

Las enzimas mirceno sintasa catalizan la
5 desfosforilación de difosfato de geranilo a beta-mirceno (EC
4.2.3.15). Las mirceno sintasas ejemplares se codifican por
MST2 de *Solanum lycopersicum* (van Schie et al., Plant Mol
Biol 64:D473-79 (2007)), TPS-Myr de *Picea abies* (Martin et
al., Plant Physiol 135:1908-27 (2004)) g-myr de *Abies grandis*
10 (Bohlmann et al., J. Biol. Chem. 272:21784-92 (1997)) y TPS10
de *Arabidopsis thaliana* (Bohlmann et al., Arch Biochem
Biophys 375:261-9 (2000)). Estas enzimas se expresaron de
forma heteróloga en *E. coli*.

Proteína	ID de GenBank	Número de GI	Organismo
MST2	ACN58229.1	224579303	<i>Solanum lycopersicum</i>
TPS-Myr	AAS47690.2	77546864	<i>Picea abies</i>
G-myr	O24474.1	17367921	<i>Abies grandis</i>
TPS10	EC07543.1	330252449	<i>Arabidopsis thaliana</i>

El difosfato de farnesilo se convierte a alfa-
20 farneseno y beta-farneseno por la alfa-farneseno sintasa y
beta-farneseno sintasa, respectivamente. Las enzimas alfa-
farneseno sintasa ejemplares incluyen TPS03 y TPS02 de
Arabidopsis thaliana (Faldt et al., Planta 216:745-51 (2003);
Huang et al., Plant Physiol 153:1293-310 (2010)), afs de
25 *Cucumis sativus* (Mercke et al., Plant Physiol 135:2012-14

(2004), eafar de *Malus x domestica* (Green et al., Phytochem 68: 176-88 (2007)) y TPS-Far de *Picea abies* (Martin, supra). Una enzima beta-farneseno sintasa ejemplar se codifica por TPS1 de *Zea mays* (Schnee et al., Plant Physiol 130:2049-60 (2002)).

Proteína	ID de GenBank	Número de GI	Organismo
TPS03	A4FVP2.1	205829248	<i>Arabidopsis thaliana</i>
TPS02	P0CJ43.1	317411866	<i>Arabidopsis thaliana</i>
TPS-Far	AAS47697.1	44804601	<i>Picea abies</i>
afs	AAU05951.1	51537953	<i>Cucumis sativus</i>
eafar	Q84LB2.2	75241161	<i>Malus x domestica</i>
TPS1	Q84ZW8.1	75149279	<i>Zea mays</i>

Difosfocinasa (Figura 1, Etapa C)

Las enzimas difosfocinasa catalizan la transferencia de un grupo difosfato a un grupo alcohol. Las enzimas descritas a continuación naturalmente poseen tal actividad. Las cinasas que catalizan la transferencia de un grupo difosfato son miembros de la clase de enzima EC 2.7.6. La tabla a continuación lista varias enzimas cinasa útiles en la clase de enzima EC 2.7.6.

No. de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima
2.7.6.1	ribosa-fosfato difosfocinasa
2.7.6.2	tiamina difosfocinasa
2.7.6.3	2-amino-4-hidroxi-6-hidroxi metildihidropteridina

No. de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima
	difosfocinasa
2.7.6.4	nucleótido difosfocinasa
2.7.6.5	GTP difosfocinasa

5 De interés particular son las enzimas ribosa-
fosfato difosfocinasa, las cuales se han identificado en
Escherichia coli (Hove-Jenson et al., *J. Biol. Chem.*, 1986,
261 (15); 6765-71) y *Mycoplasma pneumoniae* M129 (McElwain et
al., *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1988,
10 38:417-423), así como también las enzimas tiamina
difosfocinasa. Las enzimas tiamina difosfocinasa ejemplares
se encuentran en *Arabidopsis thaliana* (Ajjawi, *Plant Mol*
Biol, 2007, 65(1-2); 151-62).

15

Proteína	ID de GenBank	Número de GI	Organismo
prs	NP_415725.1	16129170	<i>Escherichia coli</i>
prsA	NP_109761.1	13507812	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> M129
TPK1	BAH19964.1	222424006	<i>Arabidopsis thaliana</i> col
TPK2	BAH57065.1	227204427	<i>Arabidopsis thaliana</i> col

Alquil fosfato cinasa (Figura 1, Etapa D)

20

Las enzimas alquil fosfato cinasa catalizan la
transferencia de un grupo fosfato al grupo fosfato de un
fosfato de alquilo. Las enzimas descritas a continuación
naturalmente poseen tal actividad o se pueden modificar
genéticamente para exhibir esta actividad. Las cinasas que
25 catalizan la transferencia de un grupo fosfato a otro grupo

fosfato son miembros de la clase de enzima EC 2.7.4. La tabla a continuación lista varias enzimas cinasa útiles en la clase de enzima EC 2.7.4.

	No. de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima
5	2.7.4.1	polifosfato cinasa
	2.7.4.2	fosfomevalonato cinasa
	2.7.4.3	adenilato cinasa
	2.7.4.4	nucleósido-fosfato cinasa
	2.7.4.6	nucleósido-difosfato cinasa
	2.7.4.7	fosfometilpirimidina cinasa
10	2.7.4.8	guanilato cinasa
	2.7.4.9	dTMP cinasa
	2.7.4.10	nucleósido-trifosfato-adenilato cinasa
	2.7.4.11	(desoxi)adenilato cinasa
15	2.7.4.12	desoxinucleótido cinasa inducida por T2
	2.7.4.13	(desoxi)nucleósido-fosfato cinasa
	2.7.4.14	citidilato cinasa
	2.7.4.15	tiamina-difosfato cinasa
	2.7.4.16	tiamina-fosfato cinasa
20	2.7.4.17	3-fosfoglicerol-fosfato-polifosfato fosfotransferasa
	2.7.4.18	farnesil-difosfato cinasa
	2.7.4.19	5-metildesoxicitidina-5'-fosfato cinasa
25	2.7.4.20	doliquil-difosfato-

No. de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima
	polifosfato fosfotransferasa
2.7.4.21	inositol-hexakisfosfato cinasa
2.7.4.22	UMP cinasa
2.7.4.23	ribosa 1,5-bisfosfato fosfocinasa
2.7.4.24	difosfoinositol- pentakisfosfato cinasa
2.7.4.-	Farnesil monofosfato cinasa
2.7.4.-	Geranil-geranil monofosfato cinasa
2.7.4.-	Fitol-fosfato cinasa

Las enzimas fosfomevalonato cinasa son de interés particular. La fosfomevalonato cinasa (EC 2.7.4.2) cataliza la fosforilación del fosfomevalonato. Esta enzima se codifica por *erg8* en *Saccharomyces cerevisiae* (Tsay et al., *Mol. Cell Biol.* 11:620-631 (1991)) y *mvaK2* en *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* (Doun et al., *Protein Sci.* 14:1134-1139 (2005); Wilding et al., *J Bacteriol* 182:4319-4327 (2000)). Las enzimas de *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus faecalis* se clonaron y caracterizaron en *E. coli* (Pilloff et al., *J Biol. Chem.* 278:4510-4515 (2003); Doun et al., *Protein Sci.* 14:1134-1139 (2005)). La fosfomevalonato cinasa de *S. pneumoniae* fue

activa en varios sustratos alternativos incluyendo fosfato de ciclopropilmevalonato, fosfato de vinilmevalonato y fosfato de etinilmevalonato (Kudoh et al., *Bioorg Med Chem.* 18:1124-34 (2010)).

5	Proteína	ID de GenBank	Número de GI	Organismo
	<i>Erg8</i>	AAA34596.1	171479	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>mvaK2</i>	AAG02426.1	9937366	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>mvaK2</i>	AAG02457.1	9937409	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>mvaK2</i>	AAG02442.1	9937388	<i>Enterococcus faecalis</i>

10 Las enzimas farnesil monofosfato cinasa catalizan la fosforilación dependiente de CTP de monofosfato de farnesilo a difosfato de farnesilo. De manera similar, geranilgeranil fosfato cinasa cataliza la fosforilación dependiente de CTP. Las enzimas con estas actividades se
15 identificaron en la fracción microsómica de *Nicotiana tabacum* cultivada (Thai et al., PNAS 96: 13080-5 (1999)). Sin embargo, los genes asociados no se han identificado hasta la fecha.

20 **Difosfato liasa (Figura 1, Etapa E)**

Las enzimas difosfato liasa catalizan la conversión de difosfatos de alquilo a alquenos. Las liasas de carbono-oxígeno que operan en los fosfatos se encuentran en la clase de enzima EC 4.2.3. La tabla a continuación lista varias
25 enzimas útiles en la clase EC 4.2.3. Las enzimas candidatas

ejemplares se describieron a continuación (ver sección de fosfato liasa).

No. de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima
4.2.3.5	Corismato sintasa
4.2.3.15	Mirceno sintasa
4.2.3.27	Isopreno sintasa
4.2.3.36	Terpentrieno sintasa
4.2.3.46	(E,E)-alfa-Farneseno sintasa
4.2.3.47	Beta-Farneseno sintasa

EJEMPLO II

Preparación de un Organismo Microbiano Que Produce Isobutileno

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir isobutileno a partir de isobutanol, en un organismo modificado genéticamente para tener una trayectoria de isobutileno.

Una cepa de *Escherichia coli* sobre-productora de isobutanol se utilizó como un organismo objetivo para modificar genéticamente una trayectoria productora de isobutileno. Las trayectorias para convertir eficientemente los intermediarios metabólicos centrales a isobutanol se conocen en la técnica (por ejemplo: US 8017375; PCT/US2006/041602; PCT/US2008/053514; PCT/US2006/041602;

Dickinson et al., JBC 273:25751-56 (1998)) y se han desarrollado cepas de *E. coli* sobre-productoras de isobutanol (por ejemplo, Atsumi et al., Appl Microbiol Biotech 85:651-57 (2010)).

5 Para generar una cepa de *E. coli* modificada genéticamente para producir isobutileno a partir de isobutanol, los ácidos nucleicos que codifican las enzimas utilizadas en la trayectoria de la Figura 1 se expresan en *E. coli* utilizando técnicas de biología molecular bien conocidas
10 (ver, por ejemplo, Sambrook, *supra*, 2001; Ausubel *supra*, 1999; Roberts et al., *supra*, 1989). En particular, los genes *mvk* (NP_357932.1), *mvaK2* (AAG02457.1) y, *ispS* (CAC35696.1) genes que codifican la alquil fosfato cinasa, alquil difosfato cinasa e isobutileno sintetasa, respectivamente, se
15 clonaron en el vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania), bajo el control del promotor PA1/lacO. Este plásmido luego se transformó en una cepa huésped que contiene *lacI*^q, que permite la expresión inducible por adición de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

20 El organismo modificado genéticamente resultante se cultivó en medio que contiene glucosa siguiendo los procedimientos bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook et al., *supra*, 2001). La expresión de genes de la trayectoria de isobutileno se corroboró utilizando
25 métodos bien conocidos en la técnica para determinar la

expresión del polipéptido o actividad enzimática, incluyendo, por ejemplo, Análisis Northern blot, amplificación por PCR de ARNm e inmunotransferencia. Las actividades enzimáticas de las enzimas expresadas se confirmaron utilizando ensayos
5 específicos para las actividades individualmente. La capacidad de la cepa de *E. coli* modificada genéticamente para producir isobutileno se confirmó utilizando HPLC, cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) o cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS).

10 Las cepas microbianas modificadas genéticamente para tener una trayectoria de síntesis de isobutileno funcional se aumentaron aún más por la optimización para la utilización eficiente de la trayectoria. Brevemente, la cepa modificada genéticamente se evaluó para determinar si
15 cualquiera de los genes exógenos se expresó a un nivel limitante de la velocidad. La expresión se aumentó para cualquiera de las enzimas expresadas a niveles bajos que pueden limitar el flujo a través de la trayectoria, por ejemplo, la introducción de números de copias de genes
20 adicionales. Las estrategias también se aplicaron para mejorar la producción del precursor de isobutileno isobutanoilo-fosfato, tales como mutagénesis, la clonación y/o supresión de genes nativos implicados en la formación de subproductos.

25 Para generar mejores productores, se utilizó el

modelado metabólico para optimizar las condiciones de crecimiento. El modelado también se utilizó para diseñar inactivaciones génicas que optimizan adicionalmente la utilización de la trayectoria (ver, por ejemplo, las

5 publicaciones de patente de Estados Unidos 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 de Estados Unidos No. 7.127.379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos en el

10 crecimiento celular del cambio del metabolismo hacia la producción más eficiente de isobutileno. Un método de modelado es el procedimiento de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard et al., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), el cual se aplica para seleccionar inactivaciones

15 génicas que colectivamente resultan en mejor producción de isobutileno. La evolución adaptativa también se puede utilizar para generar mejores productores, por ejemplo, del intermediario isobutanoil-fosfato o el producto isobutileno. La evolución adaptativa se realizó para mejorar el

20 crecimiento y características de producción (Fong y Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et al., *Science* 314:1565-1568 (2006)). Con base en los resultados, las rondas subsiguientes de modelado, ingeniería genética y evolución adaptativa se pueden aplicar al productor de isobutileno para

25 aumentar aún más la producción.

Para la producción a gran escala de isobutileno, el organismo que contiene la trayectoria de isobutileno anterior se cultivó en un fermentador utilizando un medio conocido en la técnica para apoyar el crecimiento del organismo bajo condiciones anaeróbicas. Las fermentaciones se realizaron ya sea en una manera por lote, alimentación por lotes o continua. Las condiciones anaeróbicas se mantuvieron primero burbujeando el medio con nitrógeno y luego sellando el recipiente de cultivo (por ejemplo, los matraces se pueden sellar con un septo y tapa de rosca). Las condiciones microaeróbicas también se pueden utilizar por proporcionar un pequeño agujero para la aireación limitada. El pH del medio se mantuvo a un pH de 7 por adición de un ácido, tal como H₂SO₄. La tasa de crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica utilizando un espectrofotómetro (600 nm), y la tasa de absorción de glucosa monitoreando el agotamiento de la fuente de carbono con el tiempo. Los subproductos tales como alcoholes, ácidos orgánicos, y glucosa residual indeseables se pueden cuantificar por HPLC (Shimadzu) con una columna HPX-087 (BioRad), utilizando un detector de índice de refracción para la glucosa y alcoholes, y un detector de UV para los ácidos orgánicos, Lin et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 775-779 (2005).

**Trayectorias para la formación del precursor de butadieno 3-
buten-1-ol (but-3-en-1-ol) a partir de piruvato y
acetaldehído**

Este ejemplo describe las trayectorias para
5 convertir piruvato y acetaldehído a 3-buten-1-ol, y
adicionalmente a butadieno. La conversión del piruvato y
acetaldehído a 3-buten-1-ol se realiza en cuatro etapas
enzimáticas. El piruvato y acetaldehído primero se condensan
a 4-hidroxi-2-oxovalerato por 4-hidroxi-2-cetovalerato
10 aldolasa. El producto 4-hidroxi-2-oxovalerato posteriormente
se deshidrata al 2-oxopentenoato. La descarboxilación de 2-
oxopentenoat produce el 3-buten-1-al, el cual se reduce
adicionalmente a 3-buten-1-ol por una alcohol deshidrogenasa.

Las enzimas y genes candidatos para catalizar las
15 reacciones de la trayectoria de but-3-en-1-ol se describen
con detalle adicional a continuación.

La condensación de piruvato y acetaldehído a 4-
hidroxi-2-oxovalerato se cataliza por 4-hidroxi-2-oxovalerato
aldolasa (EC 4.1.3.39). Esta enzima participa en las
20 trayectorias para la degradación de fenoles, cresoles y
catecoles. La enzima de *E. coli*, codificada por *mhpE*, es
altamente específica para el acetaldehído como un aceptor
pero acepta la sustratos alternativos 2-cetobutirato o
fenilpiruvato como donantes (Pollard et al., *Appl Environ*
25 *Microbiol* 64:4093-4094 (1998)). Las enzimas similares se

codifican 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 un heterodímero de aldolasa-deshidrogenasa bifuncional codificado por *dmpFG* (Manjasetty et al., Acta Crystallogr. D. Biol Crystallogr. 57:582-585 (2001)). La funcionalidad de deshidrogenasa interconvierte el acetaldehído y acetil-CoA, proporcionando la ventaja de concentraciones celulares reducidas de acetaldehído, tóxicos para algunas células.

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

La deshidratación de 4-hidroxi-2-oxovalerato a 2-oxopentenoato se cataliza por 4-hidroxi-2-oxovalerato hidratasa (EC 4.2.1.80). Esta enzima participa en las trayectorias de degradación aromática y típicamente se co-transcriben con un gen que codifica una enzima con actividad de 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa. Los productos génicos ejemplares se codifican 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 estrechamente relacionada, 2-oxohepta-4-eno-1,7-dioato hidratasa, participa en la degradación del ácido 4-hidroxifenilacético, donde convierte el 2-oxo-hept-4-eno-1,7-dioato (OHED) a 2-oxo-4-hidroxi-hepta-1,7-dioato utilizando magnesio como un cofactor (Burks et al., J. Am. Chem. Soc. 120:(1998)). Las enzimas OHED hidratasa candidatas 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 secuencias revela homólogos en un amplio rango de bacterias, plantas y animales. Las enzimas con secuencias altamente similares están contenidas en *Klebsiella pneumonia* (91% de identidad, eval = 2e-138) y *Salmonella enterica* (91% de identidad, eval = 4e-138), entre otras.

Proteína	No. de Acceso de GenBank	No. de GI	Organismo
<i>mhpD</i>	AAC73453.2	87081722	<i>Escherichia coli</i>
<i>cmtF</i>	AAB62293.1	1263188	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>todG</i>	AAA61942.1	485738	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>cnbE</i>	YP_001967714.1	190572008	<i>Comamonas</i> sp. CNB-1
<i>mhpD</i>	Q13VU0	123358582	<i>Burkholderia xenovorans</i>
<i>hpcG</i>	CAA57202.1	556840	<i>Escherichia coli</i> C

<i>hpaH</i>	CAA86044.1	757830	<i>Escherichia coli W</i>
<i>hpaH</i>	ABR80130.1	150958100	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Sari_01896</i>	ABX21779.1	160865156	<i>Salmonella enterica</i>

La descarboxilación de 4-hidroxi-2-oxovalerato se cataliza por una ceto-ácido descarboxilasa. Las enzimas candidatas adecuadas incluyen piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1), benzoilformiato descarboxilasa (EC 4.1.1.7), alfa-cetoglutarato descarboxilasa y alfa-cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada. La piruvato descarboxilasa (PDC), también denominado ceto-ácido descarboxilasa, es una enzima clave en la fermentación alcohólica, que cataliza la descarboxilación de piruvato a acetaldehído. La enzima de *Saccharomyces cerevisiae* tiene un ampli rango de sustratos para ácidos 2-ceto alifáticos incluyendo 2-cetobutirato, 2-cetovalerato, 3-hidroxipiruvato y 2-fenilpiruvato (22). Esta enzima se ha estudiado ampliamente, modificado genéticamente para la actividad alterada, y funcionalmente expresada en *E. coli* (Killenberg-Jabs, et al., *Eur. J. Biochem* 268:1698-1704 (2001); Li et al., *Biochemistry*. 38:10004 a 10012 (1999); ter Schure et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1303-1307 (1998)). El PDC de *Zymomonas mobilis*, codificada por *pdc*, también tiene un amplio rango de sustratos y ha sido objeto de estudios de ingeniería genética dirigidos a alterar la afinidad por diferentes sustratos (Siegert et al., *Protein Eng Des Sel* 18:345-357 (2005)). La estructura cristalina de

esta enzima está disponible (Killenberg-Jabs, et al., *Eur. J. Biochem.* 268:1698-1704 (2001)). Otras PDC candidatas bien caracterizados incluyen las enzimas de *Acetobacter pasteurians* (Chandra et al., 176:443-451 (2001)) y

5 *Kluyveromyces lactis* (Krieger et al., 269:3256-3263 (2002)).

Proteína	ID de GenBank	Número de GI	Organismo
<i>pdg</i>	P06672.1	118391	<i>Zymomonas mobilis</i>
<i>pdcl</i>	P06169	30923172	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>pdg</i>	Q8L388	20385191	<i>Acetobacter pasteurians</i>
<i>pdcl</i>	Q12629	52788279	<i>Kluyveromyces lactis</i>

10

Igual que la PDC, la benzoilformiato descarboxilasa (EC 4.1.1.7) tiene un amplio rango de sustratos y ha sido objeto de estudios de ingeniería genética de enzimas. La enzima de *Pseudomonas putida* se ha estudiado ampliamente y

15 las estructuras cristalinas de esta enzima están disponibles (Polovnikova et al., 42:1820-1830 (2003); Hasson et al., 37:9918-9930 (1998)). La mutagénesis dirigida al sitio de dos residuos en el sitio activo de la enzima de *Pseudomonas putida* alteró la afinidad (Km) de sustratos de origen natural

20 y no natural (Siegert et al., *Protein Eng Des Sel* 18:345-357 (2005)). Las propiedades de esta enzima se han modificado adicionalmente por ingeniería genética dirigida (Lingen et al., *Chembiochem.* 4:721-726 (2003); Lingen et al., *Protein Eng* 15:585-593 (2002)). La enzima de *Pseudomonas aeruginosa*,

25 codificada por *mdlC*, también se ha caracterizado

experimentalmente (Barrowman et al., 34:57-60 (1986)). Los genes candidatos adicionales de *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens* y otros organismos se pueden inferir por homología de secuencia o identificar utilizando un sistema de selección de crecimiento desarrollado en *Pseudomonas putida* (Henning et al., Appl. Environ. Microbiol. 72:7510-7517 (2006)).

Proteína	ID de GenBank	Número de GI	Organismo
mdlC	P20906.2	3915757	<i>Pseudomonas putida</i>
mdlC	Q9HUR2.1	81539678	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
dpgB	ABN80423.1	126202187	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
ilvB-1	YP_260581.1	70730840	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Una tercera enzima capaz de descarboxilar los 2-oxoácidos es la alfa-cetoglutarato descarboxilasa (KGD). El rango de sustratos de esta clase de enzimas no se ha estudiado hasta la fecha. Una KDC ejemplar se codifica por *kad* en *Mycobacterium tuberculosis* (Tian et al., PNAS 102: 10670-10675 (2005)). La actividad de la enzima KDC también se ha detectado en varias especies de rizobios incluyendo *Bradyrhizobium japonicum* y *Mesorhizobium loti* (Green et al., J Bacteriol 182:2838-2844 (2000)). Aunque los genes codificantes de KDC no se han aislado en estos organismos, las secuencias del genoma están disponibles y varios genes en cada genoma se anotan como KDC putativas. También se ha caracterizado una KDC de *Euglena gracilis*, pero el gen

asociado con esta actividad no se ha identificado hasta la fecha (Shigeoka et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 288:22-28 (1991)). Se secuenciaron Los primeros veinte aminoácidos iniciando desde el N-término MTYKAPVKDVKFLLDKVFKV (SEC ID NO.) (Shigeoka and Nakano, *Arch. Biochem. Biophys.* 288:22-28 (1991)). El gen podría ser identificado analizando los genes candidatos que contengan esta secuencia N-terminal para la actividad de KDC.

Proteína	ID de GenBank	Número de GI	Organismo
kgd	O50463.4	160395583	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
kgd	NP_767092.1	27375563	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110
kgd	NP_105204.1	13473636	<i>Mesorhizobium loti</i>

Una cuarta enzima candidata para catalizar esta reacción es la alfa-cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada (BCKA). Se ha mostrado que esta clase de enzima actúa en una variedad de compuestos que varían en longitud de cadena de 3 a 6 carbonos (Oku et al., *J. Biol. Chem.* 263: 18386-18396 (1988); Stmt et al., *Appl Environ Microbiol* 71:303-311 (2005)). La enzima en *Lactococcus lactis* se ha caracterizado en una variedad de sustratos ramificados y lineales incluyendo 2-oxobutanoato, 2-oxohexanoato, 2-oxopentanoato, 3-metil-2-oxobutanoato, 4-metil-2-oxobutanoato e isocaproato (Smit et al., *Appl Environ Microbiol* 71:303-311 (2005)). La enzima se ha caracterizado estructuralmente (Berg

et al., *Science* 318:1782-1786 (2007)). Los alineamientos de
secuencias entre la enzima de *Lactococcus lactis* y la
piruvato descarboxilasa de *Zymomonas mobilis* indican que los
residuos de reconocimiento de sustrato y catalíticos son casi
5 idénticos (Siegert et al., *Protein Eng Des Sel* 18:345-357
(2005)), de modo que esta enzima sería un candidato
prometedor para la ingeniería genética dirigida. Se detectó
la descarboxilación de alfa-cetoglutarato por una BCKA en
Bacillus subtilis; sin embargo, esta actividad fue baja (5%)
10 con respecto a la actividad en otros sustratos de cadena
ramificada (Oku and Kaneda, *J Biol Chem.* 263:. 18386-18396
(1988)) y el gen que codifica esta enzima no se ha
identificado hasta la fecha. Los genes de BCKA candidatos
adicionales se pueden identificar por homología con la
15 secuencia de la proteína de *Lactococcus lactis*. Muchos de los
aciertos de BLASTp de alta puntuación para esta enzima son
anotados como indolpiruvato descarboxilasas (EC 4.1.1.74). La
indolpiruvato descarboxilasa (IPDA) es una enzima que
cataliza la descarboxilación de indolpiruvato a
20 indolacetaldehído en plantas y bacterias de plantas. Las
enzimas alfa-ceto ácido descarboxilasa de cadena ramificada
recombinantes derivadas de los subunidades E1 del complejo de
ceto ácido deshidrogenasa de cadena ramificada mitocondrial
de *Homo sapiens* y *Bos taurus* se han clonado y expresado
25 funcionalmente en *E. coli* (Davie et al., *J. Biol. Chem.* 267:

16601-16606 (1992); Wynn et al., *J. Biol. Chem.* 267: 12400-12403 (1992); Wynn et al., *J. Biol. Chem.* 267:1881-1887 (1992)). En estos estudios, los autores encontraron que la co-expresión de las caperoninas GroEL y GroES mejoró la actividad específica de la descarboxilasa por 500 veces (Wynn et al., *J. Biol. Chem.* 267:12400-12403 (1992)). Estas enzimas se componen de dos subunidades alfa y dos subunidades beta.

10

Proteína	ID de GenBank	Número de GI	Organismo
kdcA	AAS49166.1	44921617	<i>Lactococcus lactis</i>
BCKDHB	NP_898871.1	34101272	<i>Homo sapiens</i>
BCKDHA	NP_000700.1	11386135	<i>Homo sapiens</i>
BCKDHB	P21839	115502434	<i>Bos taurus</i>
BCKDHA	P11178	129030	<i>Bos taurus</i>

15

20

25

La reducción de 3-buten-1-al a 3-buten-1-ol se cataliza por una aldehído reductasa o alcohol deshidrogenasa. Los genes 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 *bdhI* y *bdhII* de *C. acetobutylicum* que convierte el butirialdehído en butanol (Walter et al., 174:7149-7158 (1992)). *YqhD* cataliza la reducción de un amplio rango de aldehídos utilizando NADPH como cofactor, con

una preferencia por longitudes de cadena más largas que C(3) (Sulzenbacher et al., 342:489-502 (2004); Perez et al., *J Biol. Chem.* 283:7346-7353 (2008)). Se ha demostrado que el producto génico *adhA* de *Zymomonas mobilis* tiene actividad en un número de aldehídos, incluyendo formaldehído, acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, y acroleína (Kinoshita et al., *Appl Microbiol Biotechnol* 22:249-254 (1985)). Las aldehído reductasas candidatas adicionales se codifican por *bdh* en *C. saccharoperbutylacetonicum* y *Cbei_1722*, *Cbei_2181* y *Cbei_2421* en *C. Beijerinckii*. Los genes de aldehído reductasa candidatos adicionales 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)). Las enzimas candidatas descritas anteriormente para catalizar la reducción de metilglioxal a acetol o lactaldehído también son enzimas lactaldehído reductasa adecuadas candidatas.

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
alrA	BAB12273.1	9967138	<i>Acinetobacter</i> sp. cepa M-1
ADH2	NP_014032.1	6323961	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
yqhD	NP_417484.1	16130909	<i>Escherichia coli</i>
fucO	NP_417279.1	16130706	<i>Escherichia coli</i>
bdh I	NP_349892.1	15896543	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
bdh II	NP_349891.1	15896542	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
adhA	YP_162971.1	56552132	<i>Zymomonas mobilis</i>
bdh	BAF45463.1	124221917	<i>Clostridium</i> <i>saccharoperbutylacetonicum</i>

5

10

15

20

25

Cbei_1722	YP_001308850	150016596	<i>Clostridium beijerinckii</i>
Cbei_2181	YP_001309304	150017050	<i>Clostridium beijerinckii</i>
Cbei_2421	YP_001309535	150017281	<i>Clostridium beijerinckii</i>
GRE3	P38715.1	731691	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ALD2	CAA89806.1	825575	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ALD3	NP_013892.1	6323821	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ALD4	NP_015019.1	6324950	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ALD5	NP_010996.2	330443526	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ALD6	ABX39192.1	160415767	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
HFD1	Q04458.1	2494079	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GOR1	NP_014125.1	6324055	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
YPL113C	AAB68248.1	1163100	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GCY1	CAA99318.1	1420317	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Las enzimas que exhiben actividad de 4-hidroxi-
butirato deshidrogenasa (EC 1.1.1.61) y glutarato
semialdehído reductasa también caen en esta categoría. Las
enzimas 4-hidroxi-
butirato deshidrogenasa se han caracterizado
en *Ralstonia eutropha* (Bravo et al., *J Forens Sci*, 49:379-387
(2004)) y *Clostridium kluyveri* (Wolff et al., *Protein Expr.
Purif.* 6:206-212 (1995)). Aún otro gen es la alcohol
deshidrogenasa *adhI* de *Geobacillus thermoglucosidasius* (Jeon
et al., *J Biotechnol* 135:127-133 (2008)). Las enzimas
glutarato semialdehído reductasa incluyen el producto génico
ATEG_00539 de *Aspergillus terreus* y 4-hidroxi-
butirato deshidrogenasa de *Arabidopsis thaliana*, codificada por *4hbd*
(WO 2010/068953 A2). La enzima de *A. thaliana* se clonó y
caracterizó en levadura (Breitkreuz et al., *J. Biol. Chem.*
278:41552-41556 (2003)).

PROTEÍNA	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
4hbd	YP_726053.1	113867564	<i>Ralstonia eutropha</i> H16
4hbd	L21902.1	146348486	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555
adhI	AAR91477.1	40795502	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>
ATEG_00539	XP_001210625.1	115491995	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624
4hbd	AAK94781.1	15375068	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Otra aldehído reductasa ejemplar es la metilmalonato semialdehído reductasa, también conocida como 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa (EC 1.1.1.31). Esta enzima participa en la degradación de la valina, leucina e isoleucina y se ha identificado en bacterias, eucariotas, y mamíferos. La enzima codificada por P84067 de *Thermus thermophilus* HB8 se ha caracterizado estructuralmente (Lokanath et al., *J Mol Biol*, 352:905-17 (2005)). La reversibilidad de la 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa humana se demostró utilizando sustrato marcado isotópicamente (Manning et al., *Biochem J*, 231:481-4 (1985)). Los genes adicionales que codifican esta enzima incluyen *3hidh* en *Homo sapiens* (Hawes et al., *Methods 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 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa se han caracterizado en la dirección reductiva, incluyendo *mmsB* de *Pseudomonas* 5 *aeruginosa* (Gokarn et al., Patente de Estados Unidos 739676, (2008)) y *mmsB* de *Pseudomonas putida*.

10

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

EJEMPLO IV

15

Preparación de Organismo Microbiano Que Produce Butadieno con una Trayectoria de But-3-en-1-ol

20

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir butadieno a partir de piruvato vía un intermediario but-3-en-1-ol, en un organismo modificado genéticamente para tener una trayectoria de butadieno.

25

Escherichia coli se utilizó como un organismo objetivo para modificar genéticamente una trayectoria productora de butadieno. *E. coli* proporciona un buen huésped para generar un microorganismo de origen no natural capaz de

producir butadieno. *E. coli* es susceptible a la manipulación genética y se sabe que es capaz de producir diversos productos, incluyendo etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, y ácido succínico, efectivamente bajo
5 condiciones anaeróbicas o microaeróbicas.

Para generar una cepa de *E. coli* modificada genéticamente para producir el precursor de trayectoria de butadieno, but-3-en-1-ol, unos ácidos nucleicos funcionales que codifican los enzimas utilizadas en la trayectoria
10 descrita en el Ejemplo III, se expresan en *E. coli* utilizando técnicas de biología molecular bien conocidas (ver, por ejemplo, Sambrook, *supra*, 2001; Ausubel *supra*, 1999; Roberts et al., *supra*, 1989).

En particular, una cepa de *E. coli* se modifica
15 genéticamente para producir but-3-en-1-ol a partir de piruvato vía la ruta descrita en el Ejemplo 3. Para la primera etapa de construcción de la trayectoria, los genes que codifican las enzimas para transformar el piruvato a but-3-en-1-ol se ensamblaron en un vector. Los genes mhpE
20 (AAC73455.1), mhpD (AAC73453.2), kdcA (AAS49166.1), adhA (YP_162971.1) que codifican la 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa, 4-hidroxi-2-oxovalerato deshidratasa, 2-oxopentenoato descarboxilasa y 3-buten-1-al reductasa, respectivamente, se clonaron en el vector pZE13 (Expressys,
25 Ruelzheim, Alemania), bajo el control del promotor PA1/lacO.

Los genes *mvk* (NP_357932.1), *mvaK2* (AAG02457.1) e *ispS* (CAC35696.1) que codifican la alquil fosfato cinasa, alquil difosfato cinasa y butadieno sintetasa, respectivamente, se clonaron en el vector pZA33 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el promotor PA1/lacO. Los dos plásmidos se transformaron en la cepa huésped de *E. coli* que contiene *lacI*⁰, que permite la expresión inducible por adición de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

El organismo modificado genéticamente resultante se cultivó en medio que contiene glucosa siguiendo los procedimientos bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook et al., *supra*, 2001). La expresión de genes de la trayectoria de butadieno se corroboró utilizando métodos bien conocidos en la técnica para determinar la expresión del polipéptido o actividad enzimática, incluyendo, por ejemplo, análisis Northern blot, amplificación por PCR de ARNm e inmunotransferencia. Las actividades enzimáticas de las enzimas expresadas se confirmaron utilizando ensayos específicos para las actividades individualmente. La capacidad de la cepa de *E. coli* modificada genéticamente para producir butadieno se confirmó utilizando HPLC, cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) o cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS).

Las cepas microbianas modificadas genéticamente para tener una trayectoria de síntesis de butadieno funcional

se aumentan adicionalmente por la optimización para la utilización eficiente de la trayectoria. Brevemente, la cepa modificada genéticamente se evaluó para determinar si cualquiera de los genes exógenos se expresaron a un nivel limitante de la velocidad. La expresión se aumentó para cualquiera de las enzimas expresadas a niveles bajos que pueden limitar el flujo a través de la trayectoria, por ejemplo, por la introducción de números de copias de genes adicionales. Las estrategias también se aplicaron para mejorar la producción del precursor de butadieno but-3-en-1-ol, tales como mutagénesis, clonación y/o supresión de genes nativos implicados en la formación de subproducto.

Para generar mejores productores de butadieno, se utilizó modelado metabólico para optimizar las condiciones de crecimiento. El modelado también se utilizó para diseñar desactivaciones génicas que adicionalmente optimizan la utilización de la trayectoria (ver, por ejemplo, publicaciones de patente de Estados Unidos 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 de Estados Unidos No. 7,127,379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos en el crecimiento celular del cambio del metabolismo hacia la producción más eficiente de butadieno. Un método de modelado es el procedimiento de optimización de dos niveles, OptKnock

(Burgard et al., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar desactivaciones génicas que colectivamente resultan en mejor producción de butadieno. La evolución adaptativa también se puede utilizar para generar
5 mejores productores, por ejemplo, del intermediario but-3-en-1-ol o el producto butadieno. La evolución adaptativa se realizó para mejorar tanto el crecimiento como las características de producción (Fong and Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et al., *Science* 314:1565-1568
10 (2006)). Con base en los resultados, se pueden aplicar rondas subsiguientes de modelado, ingeniería genética y evolución adaptativa al productor de butadieno para aumentar adicionalmente la producción.

Para la producción a gran escala de butadieno, el
15 organismo que contiene la trayectoria de butadieno anterior se cultivó en un fermentador utilizando un medio conocido en la técnica para apoyar el crecimiento del organismo bajo condiciones anaeróbicas. Las fermentaciones se realizaron ya sea en una manera por lote, alimentación por lotes o
20 continua. Las condiciones anaeróbicas se mantuvieron primero burbujeando el medio con nitrógeno y luego sellado el recipiente de cultivo (por ejemplo, los matraces se pueden sellar con un septo y tapa de rosca). También se pueden utilizar condiciones microaeróbicas proporcionando un pequeño
25 agujero para la aireación limitada. El pH del medio se

mantuvo a un pH de 7 por adición de un ácido, tal como H₂SO₄. La tasa de crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica utilizando un espectrofotómetro (600 nm), y la tasa de absorción de glucosa monitoreando el agotamiento de la fuente
5 de carbono con el tiempo. Los subproductos tales como alcoholes, ácidos orgánicos, y glucosa residual indeseables se pueden cuantificar por HPLC (Shimadzu) con una columna HPX-087 (BioRad), utilizando un detector de índice de refracción para la glucosa y alcoholes, y un detector de UV
10 para los ácidos orgánicos, Lin et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 775-779 (2005).

EJEMPLO V

Trayectoria para la formación del precursor de butadieno 3- 15 buten-2-ol (but-2-en-1-ol) a partir de acrilil-CoA

Este ejemplo describe las trayectorias para convertir la acrilil-CoA a 3-buten-2-ol, y adicionalmente a butadieno. La conversión de acrilil-CoA a 3-buten-2-ol se realiza en cuatro etapas enzimáticas. La acrilil-CoA y
20 acetil-CoA primero se condensan a 3-oxopent-4-enoil-CoA por una beta-cetotiolasa. El producto 3-oxopent-4-enoil-CoA posteriormente se hidroliza a 3-oxopent-4-enoato por una CoA hidrolasa, transferasa o sintetasa. La descarboxilación del intermediario 3-cetoácido produce 3-buten-2-al, que se reduce
25 adicionalmente a 3-buten-2-ol por una alcohol deshidrogenasa

o cetona reductasa.

Las enzimas y genes candidatos para catalizar las reacciones de la trayectoria de but-3-en-2-ol se describen con detalle adicional a continuación.

5 La acrilil-CoA y acetil-CoA se condensan para formar la 3-oxopent-4-enoil-CoA por una beta-cetotiolasa (EC 2.3.1.16). Las enzimas beta-cetotiolasa que catalizan la formación de beta-cetovalerato a partir de acetil-CoA y propionil-CoA reductasa son buenos candidatos para catalizar
10 la formación de 3-oxopen-4-enoil-CoA. *Zoogloea ramigera* posee dos cetotilasas que pueden formar la beta-cetovaleril-CoA a partir de propionil-CoA y acetil-CoA y *R. eutropha* tiene una cetotiolasa de beta-oxidación que también es capaz de catalizar esta transformación (Gruys et al., Patente de
15 Estados Unidos No. 5,958,745). No se han reportado las secuencias de estos genes o sus proteínas traducidas, pero varios genes en *R. eutropha*, *Z. ramigera*, u otros organismos se pueden identificar con base en la homología de secuencia con *bktB* de *R. eutropha*.

20

Proteína	ID de GenBank	Número de GI	Organismo
<i>phaA</i>	YP_725941.1	113867452	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_A1713</i>	YP_726205.1	113867716	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>pcaF</i>	YP_728366.1	116694155	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_B1369</i>	YP_840888.1	116695312	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_A0170</i>	YP_724690.1	113866201	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_A0462</i>	YP_724980.1	113866491	<i>Ralstonia eutropha</i>

25

5

<i>h16_A1528</i>	YP_726028.1	113867539	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_B0381</i>	YP_728545.1	116694334	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_B0662</i>	YP_728824.1	116694613	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_B0759</i>	YP_728921.1	116694710	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_B0668</i>	YP_728830.1	116694619	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_A1720</i>	YP_726212.1	113867723	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_A1887</i>	YP_726356.1	113867867	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>phbA</i>	P07097.4	135759	<i>Zoogloea ramigera</i>
<i>bktB</i>	YP_002005382.1	194289475	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>
<i>Rmet_1362</i>	YP_583514.1	94310304	<i>Ralstonia metallidurans</i>
<i>Bphy_0975</i>	YP_001857210.1	186475740	<i>Burkholderia phymatum</i>

10

Las enzimas adicionales incluyen beta-cetotiolasas que son conocidas por convertir dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA reductasa (EC 2.1.3.9). Las enzimas acetoacetil-CoA tiolasa ejemplares incluyen los productos génicos de *atoB* de *E. coli* (Martin et al., *Nat. Biotechnol.* 21:796-802 (2003)), *thlA* y *thlB* de *C. acetobutylicum* (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)).

15

20

Proteína	ID de GenBank	Número de GI	Organismo
<i>atoB</i>	NP_416728	16130161	<i>Escherichia coli</i>
<i>thlA</i>	NP_349476.1	15896127	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>thlB</i>	NP_149242.1	15004782	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>ERG10</i>	NP_015297	6325229	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

25

La beta-cetoadipil-CoA tiolasa (EC 2.3.1.174),

también llamada 3-oxoadipil-CoA tiolasa, convierte la beta-cetoadipil-CoA a succinil-CoA y acetil-CoA, y es una enzima clave de la trayectoria de beta-cetoadipato para la degradación de compuestos aromáticos. La enzima se extiende en las bacterias y hongos del suelo incluyendo *Pseudomonas putida* (Harwood et al., *J. Bacteriol.* 176:6479-6488 (1994)) y *Acinetobacter calcoaceticus* (Doten et al., *J. Bacteriol.* 169:3168-3174 (1987)). La enzima de *P. putida* es un homotetrámero que porta 45% de homología de secuencia a las beta-cetotiolasas implicadas en la síntesis de PHB en *Ralstonia eutropha*, la degradación de ácidos grasos por mitocondrias humanas y la producción de butirato por *Clostridium acetobutylicum* (Harwood et al., *supra*). También se ha caracterizado Una beta-cetoadipil-CoA tiolasa en *Pseudomonas knackmussii* (anteriormente *sp. B13*) (Gobel et al., *J. Bacteriol.* 184:216-223 (2002); Kaschabek et al., *supra*).

20

Proteína	ID de GenBank	Número de GI	Organismo
<i>pcaF</i>	NP_743536.1	506695	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>pcaF</i>	AAC37148.1	141777	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
<i>catF</i>	Q8VPF1.1	75404581	<i>Pseudomonas knackmussii</i>

25

La remoción de la porción CoA del producto 3-oxopent-4-enoil-CoA se cataliza, por ejemplo, por 3-oxopent-4-enoil-CoA hidrolasa. La CoA hidrolasa codificada por *acot12* de cerebro de *Rattus norvegicus* (Robinson et al., *Biochem.*

Biophys. Res. Commun. 71:959-965 (1976)) puede reaccionar con
varios sustratos alternativos incluyendo butiril-CoA,
hexanoil-CoA y malonil-CoA. La ácido dicarboxílico
tioesterasa humana, codificada por *acot8*, exhibe la actividad
5 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 para esta
enzima, *tesB*, también puede hidrolizar un rango de
tiolésteres de CoA (Naggert et al., *J Biol Chem* 266:11044-
10 11050 (1991)). Una enzima similar también se ha caracterizado
en el hígado de rata (Deana R., *Biochem Int* 26:767-773
(1992)). Las 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*
15 *Chem*, 2006, 281(16):11028-38). Aunque su secuencia no se ha
reportado, la enzima de la mitocondria de la hoja del
guisante 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
20 (Zeiher et al., *Plant. Physiol.* 94:20-27 (1990)). La acetil-
CoA hidrolasa, *ACH1*, de *S. cerevisiae* representa otra
hidrolasa candidata (Buu et al., *J. Biol. Chem.* 278: 17203-
17209 (2003)).

	Proteína	Acceso de GenBank #	GI #	Organismo
25	<i>acot12</i>	NP_570103.1	18543355	<i>Rattus norvegicus</i>

5

<i>tesB</i>	NP_414986	16128437	<i>Escherichia coli</i>
<i>acot8</i>	CAA15502	3191970	<i>Homo sapiens</i>
<i>acot8</i>	NP_570112	51036669	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>tesA</i>	NP_415027	16128478	<i>Escherichia coli</i>
<i>ybgC</i>	NP_415264	16128711	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaI</i>	NP_415914	16129357	<i>Escherichia coli</i>
<i>ybdB</i>	NP_415129	16128580	<i>Escherichia coli</i>
<i>ACH1</i>	NP_009538	6319456	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Las enzimas hidrolasa adicionales incluyen 3-
10 hidroxiiisobutiril-CoA hidrolasa que se ha descrito que cataliza eficientemente la conversi3n de 3-hidroxiiisobutiril-CoA a 3-hidroxiiisobutirato durante la degradaci3n de valina (Shimomura et al., *J Biol Chem.* 269:14248-14253 (1994)). Los genes que codifican esta enzima incluyen *hibch* de *Rattus*
15 *norvegicus* (Shimomura et al., *Methods Enzymol.* 324:229-240 (2000)) y *Homo sapiens* (Shimomura et al., *supra*). Los genes candidatos similares tambi3n se pueden identificar por homologi3 de secuencia, incluyendo *hibch* de *Saccharomyces cerevisiae* y *BC_2292* de *Bacillus cereus*.

20

Prote3na	Acceso de GenBank #	GI #	Organismo
<i>hibch</i>	Q5XIE6.2	146324906	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	146324905	<i>Homo sapiens</i>
<i>hibch</i>	P28817.2	2506374	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>BC_2292</i>	AP09256	29895975	<i>Bacillus cereus</i>

25

La descarboxilaci3n de 3-oxopent-4-enoato se

catalizó por una 3-cetoácido descarboxilasa. La acetoacetato descarboxilasa (EC 4.1.1.4) de *Clostridium acetobutylicum*, codificada por *adc*, tiene una amplia especificidad de sustrato y se ha mostrado que descarboxila numerosos sustratos alternativos incluyendo carboxilato de 2-cetociclohexano, 3-oxopentanoato, ácido 2-oxo-3-fenilpropiónico, 2-metil-3-oxobutirato y benzoil-acetato (Rozzel et al., *J. Am. Chem. Soc.* 106:4937-4941 (1984); Benner and Rozzell, *J. Am. Chem. Soc.* 103:993-994 (1981); Autor et al., *J. Biol. Chem.* 245:5214-5222 (1970)). Una acetoacetato descarboxilasa también se ha caracterizado en *Clostridium beijerinckii* (Ravagnani et al., *Mol. Microbiol* 37:1172-1185 (2000)). La acetoacetato descarboxilasa de *Bacillus polymyxa*, caracterizada en extractos libres de células, también tiene una amplia especificidad de sustrato para los 3-ceto ácidos y puede descarboxilar el 3-oxopentanoato (Matiasek et al., *Curr. Microbiol* 42:276-281 (2001)). El gen que codifica esta enzima no se ha identificado hasta la fecha y la secuencia del genoma de *B. polymyxa* no está disponible todavía. Otra *adc* se encuentra en *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kosaka, et al., *Biosci. Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007)). Los genes candidatos adicionales en otros organismos, incluyendo *Clostridium botulinum* y *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, se pueden identificar por homología de secuencia.

5

Proteína	ID de GenBank	No. de GI	Organismo
adc	NP_149328.1	15004868	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
adc	AAP42566.1	31075386	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
adc	YP_001310906.1	150018652	<i>Clostridium beijerinckii</i>
CLL_A2135	YP_001886324.1	187933144	<i>Clostridium botulinum</i>
RBAM_030030	YP_001422565.1	154687404	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

10

15

20

25

La reducción de 3-buten-2-al a 3-buten-2-ol se catalizó por una alcohol deshidrogenasa o cetona reductasa. Las alcohol deshidrogenasas descritas anteriormente en el Ejemplo III también son candidatos adecuados para esta transformación. Existen varias alcohol deshidrogenasas ejemplares que convierten una cetona a un grupo funcional hidroxilo. Dos de tales enzimas de *E. coli* se codifican por la malato deshidrogenasa (*mdh*) y lactato deshidrogenasa (*ldhA*). Además, se ha mostrado que la lactato deshidrogenasa de *Ralstonia eutropha* demuestra altas actividades de 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 se puede catalizar por la 2-cetoadipato reductasa, una enzima reportada que se encuentra en la placenta de rata y humana (Suda et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 176:610-620 (1976); Suda et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77:586-591 (1977)). Una óxidorreductasa adicional es la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa mitocondrial

(bdh) del corazón humano la cual se ha clonado y caracterizado (Marks et al., *J. Biol. Chem.* 267:15459-15463 (1992)). Las enzimas 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 la acetona a isopropanol. La metil etil cetona reductasa cataliza la reducción de MEK a 2-butanol. Las enzimas MEK reductasa ejemplares se pueden encontrar en *Rhodococcus ruber* (Kosjek et al., *Biotechnol Bioeng.* 86:55-62 (2004)) y *Pyrococcus furiosus* (van der Oost et al., *Eur. J. Biochem.* 268:3062-3068 (2001)).

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

Las enzimas que catalizan la reducción de 3-oxobutanol a 1,3-butanodiol también son aplicables aquí. Tales enzimas se encuentran en organismos del género *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Candida*, y *Klebsiella* entre otros,

como se describe por Matsuyama et al. *J Mol Cat B Enz*, 11:513-521 (2001). Una de estas enzimas, SADH de *Candida parapsilosis*, se clonó y caracterizó en *E. coli*. También se han mostrado que una fenilacetaldehído reductasa de *Rhodococcus* mutada (Sar268) y una alcohol deshidrogenasa de *Leifonia* catalizan esta transformación a altos rendimientos (Itoh et al., *Appl. Microbiol Biotechnol* 75:1249-1256 (2007)).

	Gen	No. de Acceso de GenBank	No. de GI	Organismo
10	<i>sadh</i>	BAA24528.1	2815409	<i>Candida parapsilosis</i>

EJEMPLO VI

Preparación de un Organismo Microbiano Que Produce Butadieno con una Trayectoria de But-3-en-2-ol

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir butadieno a partir de piruvato vía un intermediario but-3-en-2-ol, en un organismo modificado genéticamente para tener una trayectoria de butadieno.

Escherichia coli se utilizó como un organismo objetivo para modificar genéticamente una trayectoria productora de butadieno. *E. coli* proporciona un buen huésped para generar un microorganismo de origen no natural capaz de producir butadieno. *E. coli* es susceptible de manipulación genética y se sabe que es capaz de producir diversos

productos, incluyendo etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, y ácido succínico, efectivamente bajo condiciones anaeróbicas o microaeróbicas.

Para generar una cepa de *E. coli* modificada genéticamente para producir el precursor de la trayectoria de butadieno, but-3-en-2-ol, unos ácidos nucleicos funcionales que codifican los enzimas utilizadas en la trayectoria descrita en el Ejemplo III, se expresan en *E. coli* utilizando técnicas de biología molecular bien conocidas (ver, por ejemplo, Sambrook, *supra*, 2001; Ausubel *supra*, 1999; Roberts et al., *supra*, 1989).

En particular, una cepa de *E. coli* se modifica genéticamente para producir, but-3-en-2-ol a partir de acrilil-CoA vía la ruta descrita en el Ejemplo III. Para la primera etapa de construcción de la trayectoria, los genes que codifican las enzimas para transformar la acrilil-CoA a but-3-en-2-ol se ensamblan en un vector. Los genes *phaA* (YP_725941.1), *tesB* (NP_414986), *adc* (NP_149328.1) y *sadh* (BAA24528.1) que codifican la beta-cetotiolasa, 3-oxopent-4-enoil-CoA hidrolasa, 3 oxopent-4-enoato descarboxilasa y 3-buten-2-ona reductasa, respectivamente, se clonaron en el vector de pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania), bajo el control del promotor PA1/lacO. Los genes *mvk* (NP_357932.1), *mvaK2* (AAG02457.1) e *ispS* (CAC35696.1) que codifican la alquil fosfato cinasa, alquil difosfato cinasa y butadieno

sintetasa, respectivamente, se clonaron en el vector pZA33 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el promotor PA1/lacO. Los dos plásmidos se transformaron en la cepa huésped de *E. coli* que contiene lacI^q, que permite la expresión inducible
5 por adición de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

El organismo modificado genéticamente resultante se cultivó en medio que contiene glucosa siguiendo los procedimientos bien conocidos en la técnica (ver, por
10 ejemplo, Sambrook et al., *supra*, 2001). La expresión de genes de la trayectoria de butadieno se corroboró utilizando métodos bien conocidos en la técnica para determinar la expresión del polipéptido o actividad enzimática, incluyendo, por ejemplo, análisis Northern blot, amplificación por PCR de
15 ARNm e inmunotransferencia. Las actividades enzimáticas de las enzimas expresadas se confirmaron utilizando ensayos específicos para las actividades individualmente. La capacidad de la cepa de *E. coli* modificada genéticamente para producir butadieno se confirmó utilizando HPLC, cromatografía
20 de gases-espectrometría de masas (GC-MS) o cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS).

Las cepas microbianas modificadas genéticamente para tener una trayectoria de síntesis de butadieno funcional se aumentaron adicionalmente por la optimización para la
25 utilización eficiente de la trayectoria. Brevemente, la cepa

modificada genéticamente se evaluó para determinar si cualquiera de los genes exógenos se expresaron a un nivel limitante de la velocidad. La expresión se incrementó para cualquiera de las enzimas expresadas a niveles bajos que
5 pueden limitar el flujo a través de la vía, por ejemplo, por la introducción de números de copias de genes adicionales. Las estrategias también se aplican para mejorar la producción del precursor de butadieno but-3-en-2-ol, tales como mutagénesis, clonación y/o supresión de genes nativos
10 implicados en la formación de subproducto.

Para generar mejores productores de butadieno, se utilizó el modelado metabólico para optimizar las condiciones de crecimiento. El modelado también se utilizó para diseñar desactivaciones génicas que optimizan adicionalmente la
15 utilización de la trayectoria (ver, por ejemplo, publicaciones de patente de Estados Unidos 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 de Estados Unidos No. 7,127,379). El análisis de
20 modelado permite predicciones confiables de los efectos en el crecimiento celular del cambio del metabolismo hacia la producción más eficiente de butadieno. Un método de modelado es el procedimiento de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard et al., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)),
25 el cual se aplica para seleccionar desactivaciones génicas

que colectivamente resultan en mejor producción de butadieno. La evolución adaptativa también se puede utilizar para generar mejores productores, por ejemplo, del intermediario but-3-en-2-ol o el producto butadieno. La evolución adaptativa se realizó para mejorar tanto el crecimiento como las características de la producción (Fong and Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et al., *Science* 314:1565-1568 (2006)). Con base en los resultados, se pueden aplicar rondas subsiguientes de modelado, ingeniería genética y evolución adaptativa al productor de butadieno para aumentar adicionalmente la producción.

Para la producción a gran escala de butadieno, el organismo que contiene la trayectoria de butadieno anterior se cultivó en un fermentador utilizando un medio conocido en la técnica para apoyar el crecimiento del organismo bajo condiciones anaeróbicas. Las fermentaciones se realizaron ya sea en una manera por lotes, alimentación por lotes o continua. Las condiciones anaeróbicas se mantuvieron primero burbujeando el medio con nitrógeno y luego sellado el recipiente de cultivo (por ejemplo, los matraces se pueden sellar con un septo y tapa de rosca). También se pueden utilizar condiciones microaeróbicas proporcionando un pequeño agujero para la aireación limitada. El pH del medio se mantuvo a un pH de 7 por adición de un ácido, tal como H₂SO₄. La tasa de crecimiento se determinó midiendo la densidad

5 óptica utilizando un espectrofotómetro (600 nm), y la tasa de absorción de glucosa monitoreando el agotamiento de la fuente de carbono con el tiempo. Los subproductos tales como alcoholes, ácidos orgánicos, y glucosa residual indeseables se pueden cuantificar por HPLC (Shimadzu) con una columna HPX-087 (BioRad), utilizando un detector de índice de refracción para la glucosa y alcoholes, y un detector de UV para los ácidos orgánicos, Lin et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 775-779 (2005).

10 A lo largo de esta solicitud se ha hecho referencia a varias publicaciones. Las descripciones de estas publicaciones en sus totalidades, incluyendo publicaciones de número de GenBank y GI, se incorporan por referencia en esta solicitud para describir más completamente el estado de la

15 técnica a la que pertenece esta invención. Aunque la invención se ha descrito con referencia a los ejemplos proporcionados anteriormente, se debe entender que diversas modificaciones se pueden hacer sin apartarse del espíritu de la invención.

20

25

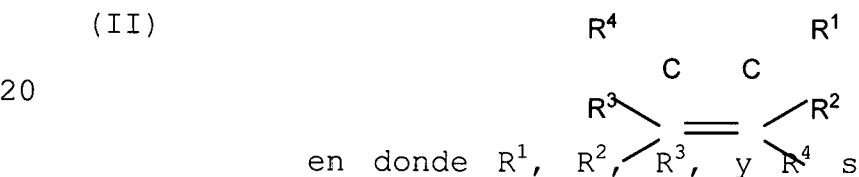
REIVINDICACIONES

1. Un organismo microbiano de origen no natural, el organismo microbiano tiene una trayectoria de alqueno y
5 comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de alqueno expresada en una cantidad suficiente para convertir un alcohol a un alqueno, caracterizado porque la trayectoria de alqueno comprende una trayectoria seleccionada de: (1) una alcohol cinasa y una
10 fosfato liasa; (2) una difosfocinasa y una difosfato liasa; y (3) una alcohol cinasa, una alquil fosfato cinasa y una difosfato liasa,

en donde el alcohol es un compuesto de la Fórmula



y en donde el alqueno es un compuesto de la Fórmula



en donde R¹, R², R³, y R⁴ son independientemente los mismos entre el alcohol y el alqueno y son cada uno independientemente (a) hidrógeno, ciano, halo, o nitro; (b) alquilo de C₁₋₆, alquenilo de C₂₋₆, alquinilo de C₂₋₆,
25 cicloalquilo de C₃₋₇, arilo de C₆₋₁₄, aralquilo de C₇₋₁₅,

heteroarilo, o heterociclilo, cada uno opcionalmente
sustituido con uno o más sustituyentes Q; o (c) $-C(O)R^{1a}$, $-$
 $C(O)OR^{1a}$, $-C(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-C(NR^{1a})NR^{1b}R^{1c}$, $-OR^{1a}$, $-OC(O)R^{1a}$, $-$
 $OC(O)OR^{1a}$, $-OC(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-OC(=NR^{1a})NR^{1b}R^{1c}$, $-OS(O)R^{1a}$, $-$
5 $OS(O)_2R^{1a}$, $-OS(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-OS(O)_2NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1a}C(O)R^{1d}$,
 $-NR^{1a}C(O)OR^{1d}$, $-NR^{1a}C(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1a}C(=NR^{1d})NR^{1b}R^{1c}$, $-$
 $NR^{1a}S(O)R^{1d}$, $-NR^{1a}S(O)_2R^{1d}$, $-NR^{1a}S(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1a}S(O)_2NR^{1b}R^{1c}$, $-$
 SR^{1a} , $-S(O)R^{1a}$, $-S(O)_2R^{1a}$, $-S(O)NR^{1b}R^{1c}$, o $-S(O)_2NR^{1b}R^{1c}$; en
donde cada R^{1a} , R^{1b} , R^{1c} , y R^{1d} es independientemente
10 hidrógeno, alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de
 C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} ,
heteroarilo, o heterociclilo; o R^{1a} y R^{1c} junto con los
átomos de C y N a los cuales se unen forman heterociclilo; o
 R^{1b} y R^{1c} junto con el átomo de N al cual se unen forman
15 heterociclilo;

en donde cada Q se selecciona independientemente
de (a) oxo, ciano, halo, y nitro; (b) alquilo de C_{1-6} ,
alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} ,
arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, y
20 heterociclilo, cada uno de los cuales es opcionalmente
sustituido con uno o más, en una modalidad, uno, dos, tres,
o cuatro, sustituyentes Q^a ; y (c) $-C(O)R^a$, $-C(O)OR^a$, $-$
 $C(O)NR^bR^c$, $-C(NR^a)NR^bR^c$, $-OR^a$, $-OC(O)R^a$, $-OC(O)OR^a$, $-$
 $OC(O)NR^bR^c$, $-OC(=NR^a)NR^bR^c$, $-OS(O)R^a$, $-OS(O)_2R^a$, $-OS(O)NR^bR^c$, $-$
25 $OS(O)_2NR^bR^c$, $-NR^bR^c$, $-NR^aC(O)R^d$, $-NR^aC(O)OR^d$, $-NR^aC(O)NR^bR^c$, $-$

$\text{NR}^a\text{C}(=\text{NR}^d)\text{NR}^b\text{R}^c$, $-\text{NR}^a\text{S}(\text{O})\text{R}^d$, $-\text{NR}^a\text{S}(\text{O})_2\text{R}^d$, $-\text{NR}^a\text{S}(\text{O})\text{NR}^b\text{R}^c$, $-\text{NR}^a\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^b\text{R}^c$, $-\text{SR}^a$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}^a$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^a$, $-\text{S}(\text{O})\text{NR}^b\text{R}^c$, y $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^b\text{R}^c$, en donde cada R^a , R^b , R^c , y R^d es independientemente (i) hidrógeno; (ii) alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, o heterociclilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o más, en una modalidad, uno, dos, tres, o cuatro, sustituyentes Q^a ; o (iii) R^b y R^c junto con el átomo de N al cual se unen forman heterociclilo, opcionalmente sustituido con uno o más, en una modalidad, uno, dos, tres, o cuatro, sustituyentes Q^a ;

en donde cada Q^a se selecciona independientemente del grupo que consiste de (a) oxo, ciano, halo, y nitro; (b) alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, y heterociclilo; y (c) $-\text{C}(\text{O})\text{R}^e$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^e$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{C}(\text{NR}^e)\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{OR}^e$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^e$, $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^e$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{OC}(=\text{NR}^e)\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{OS}(\text{O})\text{R}^e$, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{R}^e$, $-\text{OS}(\text{O})\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{NR}^e\text{C}(\text{O})\text{R}^h$, $-\text{NR}^e\text{C}(\text{O})\text{OR}^f$, $-\text{NR}^e\text{C}(\text{O})\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{NR}^e\text{C}(=\text{NR}^h)\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{NR}^e\text{S}(\text{O})\text{R}^h$, $-\text{NR}^e\text{S}(\text{O})_2\text{R}^h$, $-\text{NR}^e\text{S}(\text{O})\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{NR}^e\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{SR}^e$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}^e$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^e$, $-\text{S}(\text{O})\text{NR}^f\text{R}^g$, y $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^f\text{R}^g$; en donde cada R^e , R^f , R^g , y R^h es independientemente (i) hidrógeno; (ii) alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} ,

arilo de C₆₋₁₄, aralquilo de C₇₋₁₅, heteroarilo, o heterociclilo; o (iii) R^f y R^g junto con el átomo de N al cual se unen forman heterociclilo.

2. El organismo microbiano de origen no natural de
5 conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el organismo microbiano comprende dos o tres ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la trayectoria de alqueno.

3. El organismo microbiano de origen no natural de
10 conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque los dos ácidos nucleicos exógenos codifican una alcohol cinasa y un fosfato liasa.

4. El organismo microbiano de origen no natural de
15 conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque los dos ácidos nucleicos exógenos codifican una difosfocinasa y una difosfato liasa.

5. El organismo microbiano de origen no natural de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque los tres ácidos nucleicos exógenos codifican una alcohol cinasa,
20 una alquil fosfato cinasa y una difosfato liasa.

6. El organismo microbiano de origen no natural de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

25 7. El organismo microbiano de origen no natural de

conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el organismo microbiano de origen no natural está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

8. El organismo microbiano de origen no natural de
5 conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el organismo microbiano convierte el etanol a etileno, n-propanol a propileno, isopropanol a propileno, n-butanol a but-1-eno, isobutanol a isobutileno, terc-butanol a isobutileno, butan-2-ol a but-1-eno o but-2-eno, pentan-1-ol
10 a pent-1-eno, 3-metilbutan-1-ol a 3-metilbut-1-eno, pentan-2-ol a pent-2-eno, pental-3-ol a pent-2-eno, 2-metilbutan-1-ol a 2-metilbut-1-eno, 3-metilbutan-2-ol a 3-metilbut-1-eno, 2-metilbutan-2-ol a 2-metilbut-1-eno o 2-metilbut-2-eno, 3-metilbut-3-en-1-ol a isopreno, 2-metilbut-3-en-2-ol a
15 isopreno, 2-metilbut-3-en-2-ol a 3-metilbuta-1,2-dieno, 2-metilbut-3-en-1-ol a isopreno, 3-metilbut-3-en-2-ol a isopreno, but-3-en-1-ol a 1,3-butadieno, but-3-en-2-ol a 1,3-butadieno, 1-feniletanol a estireno, 2-feniletanol a estireno, alcohol dimetilalílico a isopreno, o but-2-en-1-ol
20 a 1,3-butadieno.

9. Un método para producir un alqueno, caracterizado porque comprende cultivar el organismo microbiano de origen no natural de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 bajo condiciones y durante un
25 período de tiempo suficiente para producir el alqueno, en



donde el alqueno es un compuesto de la Fórmula (II)

en donde R^1 , R^2 , R^3 , y R^4 son cada uno
 5 independientemente (a) hidrógeno, ciano, halo, o nitro; (b)
 alquilo de C_{1-6} , alqueno de C_{2-6} , alquino de C_{2-6} ,
 cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} , aralquilo de C_{7-15} ,
 heteroarilo, o heterociclilo, cada uno opcionalmente
 sustituido con uno o más sustituyentes Q; o (c) $-C(O)R^{1a}$, -
 10 $C(O)OR^{1a}$, $-C(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-C(NR^{1a})NR^{1b}R^{1c}$, $-OR^{1a}$, $-OC(O)R^{1a}$, -
 $OC(O)OR^{1a}$, $-OC(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-OC(=NR^{1a})NR^{1b}R^{1c}$, $-OS(O)R^{1a}$, $-OS(O)_2R^{1a}$,
 $-OS(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-OS(O)_2NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1a}C(O)R^{1d}$, -
 $NR^{1a}C(O)OR^{1d}$, $-NR^{1a}C(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1a}C(=NR^{1d})NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1a}S(O)R^{1d}$, -
 $NR^{1a}S(O)_2R^{1d}$,
 15 $-NR^{1a}S(O)NR^{1b}R^{1c}$, $-NR^{1a}S(O)_2NR^{1b}R^{1c}$, $-SR^{1a}$, $-S(O)R^{1a}$, $-S(O)_2R^{1a}$, -
 $S(O)NR^{1b}R^{1c}$, o $-S(O)_2NR^{1b}R^{1c}$; en donde cada R^{1a} , R^{1b} , R^{1c} , y R^{1d} es
 independientemente hidrógeno, alquilo de C_{1-6} , alqueno de C_{2-6} ,
 alquino de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} ,
 aralquilo de C_{7-15} , heteroarilo, o heterociclilo; o R^{1a} y R^{1c}
 20 junto con los átomos de C y N a los cuales se unen forman
 heterociclilo; o R^{1b} y R^{1c} junto con el átomo de N al cual se
 unen forman heterociclilo;

en donde cada Q se selecciona independientemente de
 (a) oxo, ciano, halo, y nitro; (b) alquilo de C_{1-6} , alqueno
 25 de C_{2-6} , alquino de C_{2-6} , cicloalquilo de C_{3-7} , arilo de C_{6-14} ,

aralquilo de C₇₋₁₅, heteroarilo, y heterociclilo, cada uno de los cuales es opcionalmente sustituido con uno o más, en una modalidad, uno, dos, tres, o cuatro, sustituyentes Q^a; y (c) -C(O)R^a, -C(O)OR^a, -C(O)NR^bR^c, -C(NR^a)NR^bR^c, -OR^a, -OC(O)R^a, -OC(O)OR^a, -OC(O)NR^bR^c, -OC(=NR^a)NR^bR^c, -OS(O)R^a, -OS(O)₂R^a, -OS(O)NR^bR^c, -OS(O)₂NR^bR^c, -NR^bR^c, -NR^aC(O)R^d, -NR^aC(O)OR^d, -NR^aC(O)NR^bR^c, -NR^aC(=NR^d)NR^bR^c, -NR^aS(O)R^d, -NR^aS(O)₂R^d, -NR^aS(O)NR^bR^c, -NR^aS(O)₂NR^bR^c, -SR^a, -S(O)R^a, -S(O)₂R^a, -S(O)NR^bR^c, y -S(O)₂NR^bR^c, en donde cada R^a, R^b, R^c, y R^d es independientemente (i) hidrógeno; (ii) alquilo de C₁₋₆, alquenilo de C₂₋₆, alquinilo de C₂₋₆, cicloalquilo de C₃₋₇, arilo de C₆₋₁₄, aralquilo de C₇₋₁₅, heteroarilo, o heterociclilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o más, en una modalidad, uno, dos, tres, o cuatro, sustituyentes Q^a; o (iii) R^b y R^c junto con el átomo de N al cual se unen forman heterociclilo, opcionalmente sustituido con uno o más, en una modalidad, uno, dos, tres, o cuatro, sustituyentes Q^a;

en donde cada Q^a se selecciona independientemente del grupo que consiste de (a) oxo, ciano, halo, y nitro; (b) alquilo de C₁₋₆, alquenilo de C₂₋₆, alquinilo de C₂₋₆, cicloalquilo de C₃₋₇, arilo de C₆₋₁₄, aralquilo de C₇₋₁₅, heteroarilo, y heterociclilo; y (c) -C(O)R^e, -C(O)OR^e, -C(O)NR^fR^g, -C(NR^e)NR^fR^g, -OR^e, -OC(O)R^e, -OC(O)OR^e, -OC(O)NR^fR^g, -

OC(=NR^e)NR^fR^g, -OS(O)R^e, -OS(O)₂R^e, -OS(O)NR^fR^g, -OS(O)₂NR^fR^g, -
 NR^fR^g, -NR^eC(O)R^h, -NR^eC(O)OR^f, -NR^eC(O)NR^fR^g, -NR^eC(=NR^h)NR^fR^g, -
 NR^eS(O)R^h, -NR^eS(O)₂R^h, -NR^eS(O)NR^fR^g, -NR^eS(O)₂NR^fR^g, -SR^e, -
 S(O)R^e, -S(O)₂R^e, -S(O)NR^fR^g, y -S(O)₂NR^fR^g; en donde cada R^e,
 5 R^f, R^g, y R^h es independientemente (i) hidrógeno; (ii) alquilo
 de C₁₋₆, alqueno de C₂₋₆, alquino de C₂₋₆, cicloalquilo de
 C₃₋₇, arilo de C₆₋₁₄, aralquilo de C₇₋₁₅, heteroarilo, o
 heterociclilo; o (iii) R^f y R^g junto con el átomo de N al cual
 se unen forman heterociclilo.

10 10. El método de conformidad con la reivindicación
 9, caracterizado porque el alqueno se selecciona de etileno,
 propileno, propileno, but-1-eno, isobutileno, isobutileno,
 but-1-eno, but-2-eno, pent-1-eno, 3-metilbut-1-eno, pent-2-
 eno, 2-metilbut-1-eno, 3-metilbut-1-eno, 2-metilbut-1-eno, 2-
 15 metilbut-2-eno, isopreno, 3-metilbuta-1,2-dieno, 1,3-
 butadieno y estireno.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona organismos microbianos de origen no natural que contienen una trayectoria de alqueno que tiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la trayectoria de alqueno expresada en una cantidad suficiente para convertir un alcohol a un alqueno. La invención proporciona adicionalmente métodos de uso de tales organismos microbianos para producir un alqueno, cultivando un organismo microbiano de origen no natural que contiene una trayectoria de alqueno como se describe en la presente bajo condiciones y durante un período de tiempo suficiente para producir un alqueno.

15

20

25

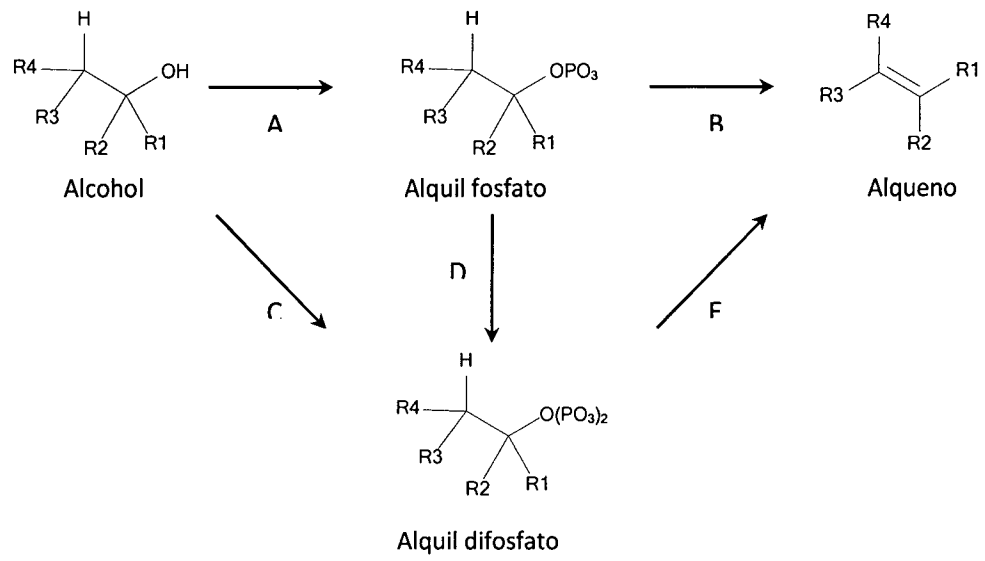


Figura 1

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference 12956-164-28	FOR FURTHER ACTION	See item 4 below
International application No. PCT/US2012/055469	International filing date (day/month/year) 14 September 2012 (14.09.2012)	Priority date (day/month/year) 16 September 2011 (16.09.2011)
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237		
Applicant GENOMATICA, INC.		

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 bis.1(a).

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.

3. This report contains indications relating to the following items:

☒	Box No. I	Basis of the report
☐	Box No. II	Priority
☐	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
☐	Box No. IV	Lack of unity of invention
☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
☐	Box No. VI	Certain documents cited
☐	Box No. VII	Certain defects in the international application
☐	Box No. VIII	Certain observations on the international application

4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).

	Date of issuance of this report 18 March 2014 (18.03.2014)
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Simin Baharlou
Facsimile No. +41 22 338 82 70	e-mail: pt09.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: DAVID A. GAY
JONES DAY
222 EAST 41ST STREET
NEW YORK, NY 10017-6702

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year)

05 NOV 2012

Applicant's or agent's file reference
12956-164-28

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US 12/55469

International filing date (day/month/year)

14 September 2012 (14.09.2012)

Priority date (day/month/year)

16 September 2011 (16.09.2011)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

IPC(8) - C12N 15/74 (2012.01)

USPC - 435/471

Applicant GENOMATICA, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1 bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Date of completion of this opinion

22 October 2012 (22.10.2012)

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

PCT/US2012/055469 05.11.2012

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 12/55469

Box No. I	Basis of this opinion
1.	With regard to the language, this opinion has been established on the basis of: ☒ the international application in the language in which it was filed. ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2.	☐ This opinion has been established taking into account therectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished: a. (means) ☐ on paper ☐ in electronic form b. (time) ☐ in the international application as filed ☐ together with the international application in electronic form ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4.	☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5.	Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 12/55469

Box No. V	Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement			
1. Statement				
Novelty (N)	Claims	1-10	YES	
	Claims	None	NO	
Inventive step (IS)	Claims	None	YES	
	Claims	1-10	NO	
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES	
	Claims	None	NO	
2. Citations and explanations:				
Claims 1-3 and 5-10 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over US 2009/0203102 A1 to Cervin et al. (hereinafter 'Cervin'), in view of US 2011/0040058 A1 to Mcauliffe et al. (hereinafter 'Mcauliffe').				
Regarding claim 1, Cervin teaches a non-naturally occurring microbial organism, said microbial organism having an alkene pathway and comprising at least one exogenous nucleic acid encoding an alkene pathway enzyme expressed in a sufficient amount to convert an alcohol to an alkene, wherein said alkene pathway comprises a pathway that contains an alcohol kinase, an alkyl phosphate kinase and a diphosphate lyase (Fig 19A and para [0131]-[0132], [0136]-[0139]; where the diphosphate lyase is isoprene synthase); wherein said alcohol is a compound of Formula (I) shown (Figure 19A, alcohol is Mevalonate) and wherein said alkene is a compound of Formula (II) shown (para [0132], olefin is isoprene) wherein R1, R2, R3, and R4 are each independently (a) hydrogen, (b) C1-6 alkyl or C2-6 alkenyl optionally substituted with one or more substituents Q; or (c) -OR1a; wherein Q is independently selected from C1-6 alkyl, which is further optionally substituted with C(O)OR1a, and R1a is hydrogen. However, Cervin, does not teach wherein R1, R2, R3 and R4 are independently the same between said alcohol and said alkene. Cervin teaches methods for the production of isoprene from cultured cells which utilizes the MVA pathway as outlined in Figure 19A from Mevalonate to Mevalonate phosphate to Mevalonate diphosphate to IPP and DMAPP which are then converted to isoprene. Thus, Cervin teaches the conversion of an alcohol to an alkene, but R1-R4 are also modified during the conversion. However, Mcauliffe teaches the production of isoprene from cultured cells using renewable carbon sources (abstract, para [0045] and [0049]) and specifically identifies a composition derived from renewable resource includes 3-methyl-3-buten-1-ol (para [0253]) which provides R1, R2, R3, and R4 to be identical between the starting alcohol and the product olefin, in this example, isoprene. Therefore it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to take the cell culture taught by Cervin and the bioconversion taught by Mcauliffe to provide a more robust production of product olefin. Regarding claim 2, Cervin, in view of Mcauliffe, further teaches the non-naturally occurring microbial organism of claim 1, wherein said microbial organism comprises two or three exogenous nucleic acids each encoding an alkene pathway enzyme (para [0132]). Regarding claim 3, Cervin, in view of Mcauliffe, further teaches the non-naturally occurring microbial organism of claim 2, wherein said two exogenous nucleic acids encode an alcohol kinase and a phosphate lyase (para [0132], [0140] and [0367], Example 10). Regarding claim 5, Cervin, in view of Mcauliffe, further teaches the non-naturally occurring microbial organism of claim 2, wherein said three exogenous nucleic acids encode an alcohol kinase, an alkyl phosphate kinase and a diphosphate lyase (para [0139] and [0334], Example 8). Regarding claim 6, Cervin, in view of Mcauliffe, further teaches the non-naturally occurring microbial organism of claim 1, wherein said at least one exogenous nucleic acid is a heterologous nucleic acid (para [0006]). Regarding claim 7, Cervin, in view of Mcauliffe, further teaches the non-naturally occurring microbial organism of claim 1, wherein said nonnaturally occurring microbial organism is in a substantially anaerobic culture medium (para [0232]). Regarding claim 8, Cervin, in view of Mcauliffe, further teaches the non-naturally occurring microbial organism of claim 1, wherein said microbial organism converts 3-methylbut-3-en-1-ol to isoprene, more specifically by Mcauliffe (para [0253], C5 prenyl alcohol such as 3-methyl-3-buten-1-ol). Regarding claim 9, Cervin, in view of Mcauliffe, further teaches a method (para [0010]) for producing an alkene comprising culturing the non-naturally occurring microbial organism of anyone of claims 1-7 under conditions and for a sufficient period of time to produce said alkene (para [0136]), wherein said alkene is a compound of Formula (II), (para [0003]). Regarding claim 10, Cervin, in view of Mcauliffe, further teaches the method of claim 9, wherein said alkene is selected from Isoprene (para [0003]).				
-----continued in Supplemental Box-----				

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 12/55469

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.
Continuation of:

Box No. V 2. Citations and explanations:

Claim 4 lacks an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Cervin in view of Mcauliffe and further in view of US 2010/0037350 A1 to Zank et al. (hereinafter 'Zank').

Regarding claim 4, Cervin and Mcauliffe teach the non-naturally occurring microbial organism of claim 2, where the exogenous nucleic acid is a diphosphate lyase, but not wherein said exogenous nucleic acids encode a diphosphokinase. Zank teaches the cellular overexpression of a diphosphokinase which catalyzes the transfer of a diphosphate group and is also known as a pyrophosphate synthase (para [0010] and [0022]). Therefore it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to take the teaching of Cervin and Mcauliffe and to insert an expression system for a diphosphokinase taught by Zank, in order to increase the yield of the olefin produced by the hybrid organism.

Claims 1-10 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

127542

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

180



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0022308

Bogotá D.C., Febrero 27 de 2014 - 08:11:18

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	610755670	26/02/2014	21.810.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	7 TTLOS-TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-082149-00000-0000

Fecha: 2014-04-15 16:12:29
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 181

182

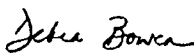
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Febrero 27 de 2014 - 08:11:27

121

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:	

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 ou 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/.



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 enseñanzas, 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 creyeran 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 2012*
Signature *W. Howard*



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-082149- -00000-0000

Fecha: 2014-04-15 16:12:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 182

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	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 INVENCION 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 ☐	