SUPERINTENDENCIA DE INI

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-258879- -00000-0000
Fecha: 2013-10-31 17:01:49 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 351

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TITULO** *MICROORGANISMOS PARA PRODUCIR ÁCIDO METACRÍLICO Y ÉSTERES DE METACRILATO Y MÉTODOS RELACIONADOS*

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** GENOMATICA, INC.

DOMICILIO SAN DIEGO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. **APODERADO** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. **BOGOTÁ, D.C.** _____

(FORMA P 10)

Oficina de Comunicaciones

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-258879- -00000-0000

Fecha: 2013-10-31 17:01:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 351

AS. 125.881

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

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

2 DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)

Solicitud Internacional No.	PCT/US2012/031733	**Fecha**	30.03.2012
Publicación Internacional No.	WO 2012/135789	**Fecha**	04.10.2012

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

MICROORGANISMOS PARA PRODUCIR ÁCIDO METACRÍLICO Y ÉSTERES DE METACRILATO Y MÉTODOS RELACIONADOS

4 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)

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

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

6 DATOS DEL SOLICITANTE

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

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

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

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

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

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

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

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

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

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

10 DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO

(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. US	US	61/510,054	2011.07.20
2. US	US	61/512,348	2011.07.27
3. US	US	61/509,560	2011.07.19
4. US	US	61/571,232	2011.06.22
5. US	US	61/471,078	2011.04.01

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

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

☐ SI ☒ NO

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

12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

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

☐ SI ☒ NO

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

13	REDUCCIÓN DE TASAS

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

☐ SI ☒ NO

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

Micro, pequeñas y medianas empresas ☐

Universidades públicas o privadas ☐

Entidades sin ánimo de lucro ☐

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

14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO

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

15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	**No.** 13-77816, 13-90694, 13-86272	**Fecha:** 31.10.2013

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



17	ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios: 4-260
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 46
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios: 259-317
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☐ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

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

Micro, pequeñas o medianas empresas

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

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

Universidades públicas o privadas

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

Entidades sin ánimo de lucro

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

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

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
4 October 2012 (04.10.2012)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2012/135789 A2

(51) International Patent Classification:
C12P 7/40 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2012/031733

(22) International Filing Date:
30 March 2012 (30.03.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

61/471,078	1 April 2011 (01.04.2011)	US
61/571,232	22 June 2011 (22.06.2011)	US
61/509,560	19 July 2011 (19.07.2011)	US
61/510,054	20 July 2011 (20.07.2011)	US
61/512,348	27 July 2011 (27.07.2011)	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). **BURGARD, Anthony, P.** [US/US]; 10520 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121 (US). **OSTERHOUT, Robin, E.** [US/US]; 10520 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121 (US). **SUN, Jun** [CN/US]; 10520 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121 (US). **PHARKYA, Priti** [IN/US]; 10520 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121 (US).

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

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, 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, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

WO 2012/135789 A2

(54) Title: MICROORGANISMS FOR PRODUCING METHACRYLIC ACID AND METHACRYLATE ESTERS AND METHODS RELATED THERETO

(57) Abstract: The invention provides a non-naturally occurring microbial organism having a methacrylic acid, methacrylate ester, 3-hydroxyisobutyrate and/or 2-hydroxyisobutyrate pathway. The microbial organism contains at least one exogenous nucleic acid encoding an enzyme in a methacrylic acid pathway. The invention additionally provides a method for producing methacrylic acid, methacrylate ester, 3-hydroxyisobutyrate and/or 2- hydroxyisobutyrate. The method can include culturing methacrylic acid, methacrylate ester, 3-hydroxyisobutyrate and/or 2-hydroxyisobutyrate producing microbial organism, where the microbial organism expresses at least one exogenous nucleic acid encoding a methacrylic acid pathway enzyme in a sufficient amount to produce methacrylic acid, methacrylate ester, 3-hydroxyisobutyrate and/or 2-hydroxyisobutyrate, under conditions and for a sufficient period of time to produce methacrylic acid, methacrylate ester, 3-hydroxyisobutyrate and/or 2-hydroxyisobutyrate.

MICROORGANISMOS PARA PRODUCIR ÁCIDO METACRÍLICO Y ÉSTERES DE METACRILATO Y MÉTODOS RELACIONADOS

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[001] Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad de la solicitud Provisional de los Estados Unidos serie No. 61/471,078, presentada el 1 de abril de 2011, y solicitud Provisional de los Estados Unidos serie No. 61/571,232, presentada el 22 de junio de 2011, y solicitud Provisional de los Estados Unidos serie No. 61/509,560, presentada el 19 de julio de 2011, y solicitud Provisional de los Estados Unidos serie No. 61/510,054, presentada el 20 de julio de 2011, y solicitud Provisional de los Estados Unidos serie No. 61/512,348, presentada el 27 de julio de 2011, cuyos contenidos totales de cada una se incorporan aquí por referencia.

[002] La presente invención se refiere generalmente a procesos biosintéticos y, más específicamente, a organismos que tienen capacidades biosintéticas de ácido metacrílico.

[003] El metacrilato de metilo (MMA – *methyl methacrylate*) es un compuesto orgánico con la fórmula $CH_2=C(CH_3)CO_2CH_3$. Este líquido incoloro es el ester metílico del ácido metacrílico (MMA – *methyl ester of methacrylic acid*) y es el monómero para la producción del metacrilato de polimetilo plástico transparente (PMMA – *polymethyl methacrylate*).

[004] La principal aplicación del metacrilato de metilo es la producción de plásticos acrílicos de metacrilato de polimetilo. Además, el metacrilato de metilo se usa para la producción del co-polímero metacrilato de metilo-butadieno-estireno (MBS - *methacrylate-butadiene-styrene*), usado como un modificador para PVC. Los polímeros y co-polímeros de metacrilato de metilo se usan para recubrimientos transportados por agua, tales como pintura de látex. Usos se encuentran también en formulaciones de adhesivos. Aplicaciones contemporáneas incluyen el uso en placas que mantienen la luz difundida uniformemente a través de pantallas de cristal líquido (LCD – *liquid crystal display*) para TV y computadores. El metacrilato de metilo se usa igualmente para preparar moldes anticorrosivos de órganos anatómicos, tales como las arterias coronarias del corazón.

[005] El ácido metacrílico, o el ácido 2-metil-2-propenoico, es un ácido carboxílico de bajo peso molecular que ocurre naturalmente en pequeñas

cantidades en el aceite de la camomila romana. Es un líquido corrosivo con un desagradable olor acre. Es soluble en agua caliente y miscible con la mayoría de los solventes orgánicos. El ácido metacrílico se polimeriza rápidamente luego del calentamiento o tratamiento con una cantidad catalítica de ácido fuerte, tal como HCl. El polímero resultante es un plástico con aspecto de cerámica. El ácido metacrílico se usa industrialmente en la preparación de sus ésteres, conocidos colectivamente como metacrilatos, tales como metacrilato de metilo. Los metacrilatos tienen numerosos usos, muy notablemente en la fabricación de polímeros.

[006] La mayoría de los productores comerciales aplican una vía de cianohidrina de acetona (ACH - *acetone cyanohydrin*) para producir ácido metacrílico (MAA), con acetona y cianuro de hidrógeno como materias primas. El intermediario cianohidrina se convierte con ácido sulfúrico en éster de sulfato de la metacrilamida, cuya hidrólisis produce bisulfato de amonio y MAA. Algunos productores comienzan con un isobutileno o, equivalentemente, *terc*-butanol, el cual se oxida a metacroleína, y se oxida nuevamente a ácido metacrílico. El MAA se esterifica entonces con metanol a MMA.

[007] El proceso de producción convencional, usando una vía de cianohidrina de acetona, implica la conversión de cianuro de hidrógeno (HCN - *hydrogen cyanide*) y acetona a cianohidrina de acetona, la cual experimenta luego hidrólisis asistida por ácido y esterificación con metanol para producir MMA. Dificultades en manipular el HCN potencialmente mortal, junto con los elevados costos de la disposición final de los subproductos (1,2 toneladas de bisulfato de amonio se forman por tonelada de MMA) han desatado una gran cantidad de investigación dirigida a procesos más limpios y más económicos. Un sinnúmero de nuevos procesos se han comercializado durante las últimas dos décadas y muchos más están próximos a la comercialización. La vía Asahi "Direct Metha", la cual implica la oxidación de isobutileno a metacroleína, la cual se mezcla luego con metanol, se oxida con aire y se esterifica a MMA, se ha descrito como un proceso económico.

[008] Otros polímeros distintos de MMA, el otro principal producto de esta industria es ácido metacrílico crudo, el cual representa alrededor de 20 por ciento de la producción total de MMA. El MAA crudo se procesa en metacrilatos de butilo y/o MAA "glacial", el cual es MAA crudo altamente purificado. El MAA glacial puede usarse directamente como un co-monómero en varios polímeros y se emplea igualmente para fabricar una variedad de metacrilatos de volumen

pequeño. Por otro lado, el MAA puede convertirse asimismo en MMA mediante esterificación con metanol.

[009] En consecuencia, existe una necesidad de métodos alternativos para producir efectivamente compuestos tales como ácido metacrílico. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona asimismo ventajas relacionadas.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[010] La invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza que tiene una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato tal como metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. El organismo microbiano contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima en una vía de ácido metacrílico. La invención provee adicionalmente un método para producir ácido metacrílico, éster de metacrilato tal como metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. El método puede incluir cultivar un organismo microbiano que produce ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, en donde el organismo microbiano expresa por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato.

[011] La invención proporciona igualmente organismos microbianos no existentes por naturaleza que contienen vías de éster de metacrilato o metacrilato de metilo, que comprenden por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de éster de metacrilato o metacrilato de metilo expresada en una cantidad suficiente para producir éster de metacrilato o metacrilato de metilo. El organismo microbiano contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima en la vía de éster de metacrilato o metacrilato de metilo y por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima, la cual aumenta los rendimientos de éster de metacrilato o metacrilato de metilo (i) mejorando la fijación de carbono mediante el ciclo de los TCA reductores , y/o (ii) accediendo a equivalentes reductores adicionales de fuentes de carbono gaseoso y/o componentes de gas de síntesis tales como CO, CO_2, y/o H_2. En algunos aspectos, los organismos microbianos no existentes por naturaleza comprenden (i) una vía de los TCA reductores que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una

citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa; (ii) una vía de los TCA reductores que comprende por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o (iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores. La invención proporciona adicionalmente métodos de usar tales organismos microbianos para producir éster de metacrilato o metacrilato de metilo, cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza que contiene vías de éster de metacrilato o metacrilato de metilo bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir éster de metacrilato o metacrilato de metilo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[012] Figura 1 muestra vías ejemplares a ácido metacrílico a partir de piruvato y acetil-CoA, y aconitato. Las enzimas son A. citramalato sintasa, B. citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), C. citraconato descarboxilasa, D. citramalil-CoA liasa, E. citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, F. citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), G. citraconato isomerasa, H. mesaconato descarboxilasa, I. aconitato descarboxilasa, J. itaconato isomerasa, K. citramalil-CoA deshidratasa y L. itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa.

[013] Figura 2 muestra vías ejemplares a partir de metacrilato a ésteres de metacrilato. Metacrilato puede formarse a partir de las vías descritas en Figura 1 u otras vías de metacrilato tales como las descritas en WO 2009/135074 y la publicación de los Estados Unidos 2009/0275096. Metacrilil-CoA puede formarse a partir de metacrilato mediante una metacrilil-CoA transferasa o una metacrilil-CoA sintetasa. Ésteres de metacrilato pueden formarse a partir de metacrilil-CoA y un alcohol en la presencia de una enzima alcohol transferasa. Ésteres de metacrilato pueden formarse también directamente a partir de metacrilato y un alcohol por una enzima formadora de éster de metacrilato o por conversión química (por ejemplo, calentamiento en la presencia de un agente deshidratante tal como un ácido). R denota cualquier grupo funcional orgánico incluyendo, pero no limitado a, un grupo funcional metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, i-propilo, sec-butilo, y *terc*-butilo, pentilo, o hexilo. Por ejemplo, si R denota un grupo metilo, R-OH denota metanol y el producto de la vía es metilmetacrilato.

[014] Figura 3 muestra una vía metabólica ejemplar a partir de succinil-CoA a MMA mediante 3-hidroxiisobutirato.

[015] Figura 4 muestra una vía ejemplar de succinil-CoA a MAA mediante 3-amino-2-metilpropionato. La "reacción concentrada" (pasos 2-3) se cataliza por 1) metilmalonil-CoA epimerasa y 2) metilmalonil-CoA reductasa.

[016] Figura 5 muestra una vía ejemplar de 4-hidroxibutiril-CoA a MAA que procede mediante 3-hidroxiisobutirato o metacrilil-CoA. El paso 2 puede catalizarse por tres enzimas alternativas: 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa. Análogamente, el paso 5 puede catalizarse por tres enzimas alternativas: metacrilil-CoA sintetasa, metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa.

[017] Figura 6 muestra una vía ejemplar de alfa-ketoglutarato a MAA mediante treo-3-metilaspartato.

[018] Figura 7 muestra una vía ejemplar de alfa-ketoglutarato a MAA mediante 2-hidroxiglutarato.

[019] Figura 8 muestra vías metabólicas ejemplares para la conversión de acetil-CoA o 4-hidroxibutiril-CoA en MAA o 2-hidroxiisobutirato.

[020] Figura 9 muestra una vía ejemplar a partir de acetil-CoA a MAA.

[021] Figura 10 muestra una vía ejemplar de piruvato a acrilil-CoA a MAA.

[022] Figura 11 muestra una vía ejemplar de 2-ketovalerato a MAA. 2-Ketoisovalerato puede producirse de valina o piruvato. Un conjunto ejemplar de enzimas para la conversión de piruvato en 2-ketoisovalerato se compone de acetolactato sintasa, acetohidroxiácido isomerorreductasa, y dihidroxiácido deshidratasa.

[023] Figura 12 muestra el ciclo inverso de los TCA para la fijación de CO_2 en carbohidratos como sustratos. Las transformaciones enzimáticas se llevan a cabo por las enzimas, tal como se muestra.

[024] Figura 13 muestra la vía para el ciclo inverso de los TCA, acoplado con monóxido de carbono deshidrogenasa e hidrogenasa para la conversión de gas de síntesis en acetil-CoA.

[025] Figura 14 muestra Western blots de 10 microgramos de extractos celulares ACS90 (calle 1), ACS91 (calle 2), Mta98/99 (calles 3 y 4) con estándares de tamaño (calle 5) y controles de proteínas de CODH de *M. thermoacetica* (Moth_1202/1203) o Mtr (Moth_1197) (50, 150, 250, 350, 450, 500, 750, 900, y 1000 ng).

[026] Figura 15 muestra los resultados del ensayo de oxidación de CO. Células (*M. thermoacetica* o *E. coli* con el operón CODH/ACS; ACS90 o ACS91 o vector vacío: pZA33S) se cultivaron y se prepararon extractos. Los análisis se llevaron a cabo a 55 °C en varios momentos, el día en que se prepararon los extractos. La reducción de metilviológeno fue seguida a 578 nm durante un transcurso de tiempo de 120 segundos.

[027] Figura 16A muestra las vías para la biosíntesis de ácido metacrílico y ácido 3-hidroxiisobutírico. Las transformaciones enzimáticas mostradas se llevan a cabo por las siguientes enzimas: (1) hidrogenasa, (2) monóxido de carbono deshidrogenasa, (3) succinil-CoA transferasa, succinil-CoA sintetasa, (4) metilmalonil-CoA mutasa, (5) metilmalonil-CoA epimerasa, (6) metilmalonil-CoA reductasa, (7) metilmalonato semialdehído reductasa y (8) 3-hidroxiisobutirato deshidratasa.

[028] Figura 16B muestra la vía para la biosíntesis de ácido metacrílico a partir de glucosa mediante un intermediario 4-hidroxibutiril-CoA. Las transformaciones enzimáticas se llevan a cabo por las enzimas: (1) hidrogenasa, (2) monóxido de carbono deshidrogenasa, (3) succinil-CoA transferasa, succinil-CoA sintetasa, (4) succinil-CoA reductasa (formadora de aldehído), (5) 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, (6) 4-hidroxibutirato cinasa, (7) fosfotrans-4-hidroxibutirilasa, (8) succinato reductasa, (9) succinil-CoA reductasa (formadora de alcohol), (10) 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa, 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, (11) 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, (12) 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa, transferasa o hidrolasa, (13) 3-hidroxiisobutirato deshidratasa, (14) 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, (15) metacrilil-CoA sintetasa, transferasa o hidrolasa.

[029] Figura 16C muestra la distribución de flujo que ilustra un rendimiento teórico máximo mejorado de ácido metacrílico en glucosa cuando se enruta carbono mediante el ciclo de los TCA reductores. Las transformaciones enzimáticas se llevan a cabo por: (1) ATP-citrato liasa; citrato liasa, acetil-CoA sintetasa; o citrato liasa, acetato cinasa, fosfotransacetilasa, (2) malato deshidrogenasa, (3) fumarasa, (4) fumarato reductasa, (5) succinil-CoA sintetasa o transferasa, (6) alfa-ketoglutarato:ferridoxina oxidorreductasa, (7) isocitrato deshidrogenasa, (8) aconitasa, (9) piruvato:ferridoxina oxidorreductasa; piruvato oxidasa, acetil-CoA sintetasa; o piruvato oxidasa, acetato cinasa, fosfotransacetilasa, (10) acetoacetil-CoA tiolasa, (11) acetoacetil-CoA reductasa, (12) 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, (13) 2-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, (14)

metacrilil-CoA sintetasa, transferasa o hidrolasa, (15) 2-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa, transferasa o hidrolasa.

[030] Figura 16D muestra la distribución de flujo que ilustra un rendimiento teórico máximo mejorado de ácido metacrílico en glucose mediante citramalato cuando se enruta carbono mediante el ciclo de los TCA reductores. Las transformaciones enzimáticas se llevan a cabo por (1) ATP-citrato liasa; citrato liasa, acetil-CoA sintetasa; o citrato liasa, acetato cinasa, fosfotransacetilasa, (2) malato deshidrogenasa, (3) fumarasa, (4) fumarato reductasa, (5) succinil-CoA sintetasa o transferasa, (6) alfa-ketoglutarato:ferridoxina oxidorreductasa, (7) isocitrato deshidrogenasa, (8) aconitasa, (9) piruvato:ferridoxina oxidorreductasa; piruvato oxidasa, acetato cinasa, fosfotransacetilasa, (10) citramalato sintasa, (11) citramalato deshidratasa y (12) citraconato descarboxilasa.

[031] Figura 16E muestra vías para la biosíntesis de ácido metacrílico a partir de acetil-CoA y piruvato. Las transformaciones enzimáticas se llevan a cabo por las enzimas tal como se muestran. Las enzimas son (1) citramalato sintasa, (2) citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), (3) citraconato descarboxilasa, (4) citramalil-CoA liasa, (5) citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, (6) citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), (7) citraconato isomerasa, (8) mesaconato descarboxilasa, (9) aconitato descarboxilasa, (10) itaconato isomerasa, (11) itaconil-CoA transferasa o sintetasa y (12) itaconil-CoA hidratasa.

[032] Figuras 17A y 17B muestran vías ejemplares. Las transformaciones enzimáticas se llevan a cabo por las enzimas tal como se muestran. Figura 17A muestra las vías para fijación de CO_2 a succinil-CoA usando el ciclo de los TCA reductores. Figura 17B muestra vías ejemplares para la biosíntesis de ácido 3-hidroxiisobutírico y ácido metacrílico a partir de succinil-CoA; las transformaciones enzimáticas mostradas se llevan a cabo por las siguientes enzimas: A. Metilmalonil-CoA mutasa, B. Metilmalonil-CoA epimerasa, C. Metilmalonil-CoA reductasa, D. Metilmalonato semialdehído reductasa, E. 3-hidroxiisobutirato deshidratasa.

[033] Figuras 18A y 18B muestran vías ejemplares. Las transformaciones enzimáticas se llevan a cabo por las enzimas tal como se muestran. Figura 18A muestra las vías para fijación de CO_2 a succinato usando el ciclo de los TCA reductores. Figura 18B muestra vías ejemplares para la biosíntesis de ácido 3-hidroxiisobutírico y ácido metacrílico a partir de succinato; las transformaciones enzimáticas mostradas se llevan a cabo por las siguientes enzimas: A. 3-

Hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, B. Metacrilil-CoA sintetasa, transferasa o hidrolasa, C. Succinil-CoA transferasa o sintetasa, D. Succinil-CoA reductasa (formadora de aldehído), E. 4-Hidroxibutirato deshidrogenasa, F. 4-Hidroxibutirato cinasa, G. Fosfotrans-4-hidroxibutirilasa, H. Succinato reductasa, I. Succinil-CoA reductasa (formadora de alcohol), J. 4-Hidroxibutiril-CoA sintetasa o transferasa, K. 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, L. 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa, transferasa o hidrolasa, M. 3-hidroxiisobutirato deshidratasa.

[034] Figuras 19A y 19B muestran vías ejemplares. Figura 19A muestra las vías para fijación de CO_2 a acetil-CoA y piruvato usando el ciclo de los TCA reductores. Figura 19B muestra vías ejemplares para la biosíntesis de metacrilato a partir de acetil-CoA y piruvato; las transformaciones enzimáticas mostradas se llevan a cabo por las siguientes enzimas: 1. Citramalato sintasa, 2. Citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), 3. Citraconato descarboxilasa, 4. Citramalil-CoA liasa, 5. Citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, 6. Citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), 7. Citraconato isomerasa, 8. Mesaconato descarboxilasa, 9. Aconitato descarboxilasa, 10. Itaconato isomerasa, 11. Itaconil-CoA transferasa o sintetasa, 12. Itaconil-CoA hidratasa.

[035] Figuras 20A y 20B muestran vías ejemplares. Figura 20A muestra las vías para fijación de CO_2 a acetil-CoA usando el ciclo de los TCA reductores. Figura 20B muestra vías ejemplares para la biosíntesis de ácido metacrílico y ácido 2-hidroxiisobutírico a partir de acetil-CoA.

[036] Figuras 21A y 21B muestran vías ejemplares. Figura 21A muestra las vías para fijación de CO2 a acetil-CoA usando el ciclo de los TCA reductores. Figura 21B muestra vías ejemplares para la biosíntesis de ácido metacrílico y ácido 3-hidroxiisobutírico a partir de acetil-CoA; las transformaciones enzimáticas mostradas se llevan a cabo por las siguientes enzimas: 1) Acetoacetil-CoA tiolasa (AtoB), 2) 3-Hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa (Hbd), 3) Crotonasa (Crt), 4) Crotonil-CoA hidratasa (4-Budh), 5) 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 6) 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa, sintetasa, o transferasa, 7) ácido 3-hidroxiisobutírico deshidratasa, 8) 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, 9) metacrilil-CoA hidrolasa, sintetasa, o transferasa.

[037] Figura 22A muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:1) de ácido carboxílico reductasa de *Nocardia iowensis* (GNM_720), y Figura 22B muestra la secuencia de aminoácidos codificados (SEQ ID NO:2).

[038] Figura 23A muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:3) de fosfopanteteína transferasa, la cual se optimizó con respecto a sus codones, y Figura 23B muestra la secuencia de aminoácidos codificados (SEQ ID NO:4).

[039] Figura 24A muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:5) de ácido carboxílico reductasa mc(2)155 de *Mycobacterium smegmatis* (designada 890), y Figura 24B muestra la secuencia de aminoácidos codificados (SEQ ID NO:6).

[040] Figura 25A muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:7) de ácido carboxílico reductasa de la subespecie paratuberculosis K-10 de *Mycobacterium avium* (designada 891), y Figura 25B muestra la secuencia de aminoácidos codificados (SEQ ID NO:8).

[041] Figure 26A muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:9) de ácido carboxílico reductasa M de *Mycobacterium marinum* (designada 892), y Figura 26B muestra la secuencia de aminoácidos codificados (SEQ ID NO:10).

[042] Figura 27A muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:11) de ácido carboxílico reductasa designada 891GA, y Figura 27B muestra la secuencia de aminoácidos codificados (SEQ ID NO:12).

[043] Figura 28 muestra una vía ejemplar a un éster de metacrilato mediante 3-hidroxiisobutirato y/o 3-hidroxiisobutiril-CoA. R-OH se refiere a cualquier alcohol orgánico.

[044] Figura 29 muestra una vía ejemplar a un éster de metacrilato mediante 2-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutiril-CoA. R-OH refiere a cualquier alcohol orgánico.

[045] Figura 30 muestra una vía ejemplar a un éster de metacrilato, metacrilato de metilo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[046] La presente invención se dirige al diseño y producción de células y organismos que tienen capacidades de producción biosintética para ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. Tal como se divulga aquí, pueden diseñarse y producirse recombinantemente por ingeniería genética vías metabólicas para lograr la biosíntesis de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato en organismos microbianos tales como *Escherichia coli* y otras células u organismos. La producción biosintética de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato se confirma por la construcción de cepas que tienen el genotipo metabólico diseñado. Estas células u organismos producidos metabólicamente por ingeniería genética pueden someterse asimismo

a evolución adaptativa para promover aún más la biosíntesis de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, incluso bajo condiciones que se aproximan al crecimiento teórico máximo.

[047] Microorganismos para la producción de ácido metacrílico (MAA) se han descrito anteriormente (véase, por ejemplo, WO 2009/135074 y la publicación de los Estados Unidos 2009/0275096, la cual se incorpora aquí por referencia). La presente invención proporciona vías adicionales para generar mediante ingeniería genética organismos microbianos para la producción de ácido metacrílico (MAA). Figura 1 ofrece vías ejemplares a MAA a partir de acetil-CoA y piruvato mediante el intermediario citramalato. Asimismo se muestran vías a MAA a partir de aconitato. En una vía, acetil-CoA y piruvato se convierten primeramente en citramalato por citramalato sintasa. La deshidratación de citramalato puede producir citraconato (Paso B) o mesaconato (Paso C). Mesaconato y citraconato se someten a interconversión por una cis/trans isomerasa en Paso G. La descarboxilación de mesaconato (Paso H) o citraconato (Paso C) produce MAA. En una vía alternativa, citramalato se forma a partir de acetil-CoA y piruvato mediante un intermediario citramalil-CoA en Pasos D y E, catalizados por citramalil-CoA liasa y citramalil-coA hidrolasa, transferasa o sintetasa.

[048] La invención abarca igualmente vías a partir de aconitato a MAA. En una vía, aconitato se descarboxila primeramente a itaconato por aconitato descarboxilasa (Paso I). Itaconato se isomeriza entonces a citraconato por itaconato delta-isomerasa (Paso J). La conversión de citraconato a MAA procede directamente por descarboxilación o indirectamente mediante mesaconato. En una vía alternativa, el intermediario itaconato se convierte primeramente en itaconil-CoA por una CoA transferasa o sintetasa (Paso L). La hidratación de itaconil-CoA produce citramalil-CoA, la cual puede convertirse entonces en MAA, como se describe anteriormente. Además, detalles y modalidades de las vías MAA ejemplares se describen aquí más adelante.

[049] Tal como se emplea aquí, el término "no existente por naturaleza", cuando se usa en referencia a un organismo microbiano o microorganismo de la invención, tiene como fin dar a entender que el organismo microbiano tiene por lo menos una alteración genética no encontrada normalmente en una cepa existente en la naturaleza de la especie referenciada, incluyendo cepas silvestres de la especie referenciada. Las alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, modificaciones que introducen ácidos nucleicos expresables que codifican polipéptidos metabólicos, adiciones de otros ácidos nucleicos, deleciones de

ácidos nucleicos y/u otra alteración funcional del material genético del organismo microbiano. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, regiones codificantes y sus fragmentos funcionales, para polipéptidos heterólogos, homólogos, o ambos, heterólogos y homólogos, para la especie referenciada. Modificaciones adicionales incluyen, por ejemplo, regiones reguladoras no codificantes en las cuales las modificaciones alteran la expresión de un gen u operón. Polipéptidos metabólicos ejemplares incluyen enzimas o proteínas en una vía biosintética de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato.

[050] Una modificación metabólica se refiere a una reacción bioquímica que se altera a partir de su estado de ocurrencia natural. En consecuencia, microorganismos no existentes por naturaleza pueden tener modificaciones genéticas a ácidos nucleicos que codifican polipéptidos metabólicos, o sus fragmentos funcionales. Modificaciones metabólicas ejemplares se divulgan aquí.

[051] Tal como se emplea aquí, el término "aislado(a)", cuando se utiliza en referencia a un organismo microbiano, tiene como fin dar a entender un organismo que está sustancialmente libre de por lo menos un componente tal como el organismo microbiano referenciado se encuentra en la naturaleza. El término incluye un organismo microbiano al que se priva de algunos o todos los componentes tal como se encuentra en su ambiente natural. El término incluye asimismo un organismo microbiano al que se priva de algunos o todos los componentes tal como el organismo microbiano se encuentra en ambientes no existentes por naturaleza. Por consiguiente, un organismo microbiano aislado está parcial o completamente separado de otras sustancias tal como se encuentra en la naturaleza o tal como se cultiva, almacena o subsiste en ambientes no existentes por naturaleza. Ejemplos específicos de organismos microbianos aislados incluyen microbios parcialmente puros, microbios sustancialmente puros y microbios cultivados en un medio que es no existente por naturaleza.

[052] Tal como se emplean aquí, los términos "microbiano," "organismo microbiano" o "microorganismo" tienen como fin dar a entender cualquier organismo que existe como una célula microscópica, la cual se encuentra incluida en los dominios de arqueas, bacterias o eucariotas. En consecuencia, el término pretende abarcar células procariotas y eucariotas u organismos que tienen un tamaño microscópico e incluye bacterias, arqueas y eubacterias de todas las especies, así como microorganismos eucariotas tales como levadura y hongos. El término incluye igualmente cultivos de células de cualquier especie que pueda cultivarse para la producción de un producto bioquímico.

[053] Tal como se emplea aquí, "ácido metacrílico," que tiene la fórmula química $CH_2=C(CH_3)CO_2$ (véase Figura 1) (denominación de la IUPAC ácido 2-metil-2-propenoico), es la forma de ácido de metacrilato, y se entiende que ácido metacrílico y metacrilato pueden usarse indistintamente de principio a fin para referirse al compuesto en cualquiera de sus formas neutras o ionizadas, incluyendo cualesquiera formas de sal de los mismos. Se entiende por las personas versadas en el arte que la forma específica dependerá del pH.

[054] Tal como se emplea aquí, "éster de metacrilato," se refiere a un compuesto que tiene la fórmula química $CH_2=C(CH_3)COOR$ (veáse Figuras 28 y 29), en donde R es un alquilo inferior, que es una cadena recta o ramificada C_1 a C_6, incluyendo, sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, i-propilo, sec-butilo, y *terc*-butilo, pentilo, o hexilo, cualquiera de los cuales puede contener insaturaciones ,siendo en consecuencia, por ejemplo, propenilo, butenilo, pentilo, y hexenilo. Ésteres de metacrilato ejemplares incluyen, sin limitación, metacrilato de metilo, metacrilato de etilo, y metacrilato de n-propilo. Ésteres de metacrilato, tal como se emplea aquí, incluyen también otros grupos R que son grupos de cadena mediana a larga, es decir C_7-C_{22}, en donde los ésteres de metacrilato se derivan de alcoholes grasos, tales como heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, laurilo, tridecilo, miristilo, pentadecilo, cetilo, palmitolilo, heptadecilo, estearilo, nonadecilo, araquidilo, heneicosilo, y alcoholes behenílicos, uno cualquiera de los cuales puede ser opcionalmente ramificado y/o contener insaturaciones.

[055] Tal como se emplea aquí, el término "CoA" o "coenzima A" tiene como finalidad dar a entender un cofactor orgánico o grupo prostético (porción no proteínica de una enzima) cuya presencia se requiere para la actividad de muchas enzimas (la apoenzima) para formar un sistema enzimático activo. La coenzima A funciona en ciertas enzimas condensadoras, actúa en la transferencia del grupo acetilo u otro grupo acilo y en la síntesis y oxidación de ácidos grasos, oxidación de piruvato y en otra acetilación.

[056] Tal como se emplea aquí, el término "sustancialmente anaerobio(a)" cuando se utiliza en referencia a una condición de cultivo o crecimiento tiene como fin dar a entender que la cantidad de oxígeno es menor que alrededor de 10% de la saturación para el oxígeno disuelto en medio líquido. El término tiene igualmente como finalidad incluir cámaras selladas de medio líquido o sólido, mantenidas con una atmósfera de menos de alrededor de 1% de oxígeno.

[057] "Exógeno(a)", tal como se emplea aquí, tiene como finalidad dar a entender que la molécula referenciada o la actividad referenciada se introduce en

el organismo microbiano hospedero. La molécula puede insertarse, por ejemplo, mediante la introducción de un ácido nucleico codificante en el material genético del hospedero, tal como mediante integración en un cromosoma del hospedero o como material genético no cromosómico, tal como un plásmido. En consecuencia, el término, tal 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 de referencia hospedero. La fuente puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico codificante homólogo o heterólogo, que expresa la actividad referenciada luego de la introducción en el organismo microbiano hospedero. Por consiguiente, el término "endógeno(a)" se refiere a una molécula o actividad referenciada que está presente en el hospedero. Análogamente, 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 en el organismo microbiano. El término "heterólogo(a)" se refiere a una molécula o actividad derivada de una fuente distinta de la especie referenciada, mientras que "homólogo(a)" se refiere a una molécula o actividad derivada del organismo microbiano hospedero. Por consiguiente, la expresión exógena de un ácido nucleico codificante de la invención puede utilizar cualquiera de los dos o ambos, ácido nucleico codificante heterólogo u homólogo.

[058] Se entiende que, cuando se incluye más de un ácido nucleico exógeno en un organismo microbiano, los más que uno ácidos nucleicos exógenos se refieren al ácido nucleico codificante referenciado o a la actividad biosintética, como ya se discutió. Se entiende además, como se divulga aquí, que tales más de que uno ácidos nucleicos exógenos pueden introducirse en el organismo microbiano hospedero en moléculas de ácido nucleico separadas, en moléculas de ácido nucleico policistrónicas, o una combinación de las anteriores, y considerarse aún como más que un ácido nucleico exógeno. Por ejemplo, como se divulga aquí, un organismo microbiano puede generarse mediante ingeniería genética para expresar dos o más ácidos nucleicos exógenos, que codifican una enzima o proteína de la vía deseada. En el caso en el que dos ácidos nucleicos exógenos, que codifican una actividad deseada, se introducen en un organismo microbiano hospedero, se entiende que los dos ácidos nucleicos exógenos pueden introducirse como un ácido nucleico único, por ejemplo, en un plásmido único, en plásmidos separados, pueden integrarse en el cromosoma del

hospedero en un sitio único o sitios múltiples, y considerarse todavía como dos ácidos nucleicos exógenos. Análogamente, se entiende que más de dos ácidos nucleicos exógenos pueden introducirse en un organismo hospedero en cualquier combinación deseada, por ejemplo, en un plásmido único, en plásmidos separados, pueden integrarse en el cromosoma del hospedero en un sitio único o sitios múltiples, y considerarse todavía como dos o más ácidos nucleicos exógenos, por ejemplo tres ácidos nucleicos exógenos. En consecuencia, el número de ácidos nucleicos exógenos referenciados o actividades biosintéticas se refiere al número de ácidos nucleicos codificantes o al número de actividades biosintéticas, no al número de ácidos nucleicos separados introducidos en el organismo hospedero.

[059] Los organismos microbianos no existentes por naturaleza de la invención pueden contener alteraciones genéticas estables, lo cual se refiere a microorganismos que pueden cultivarse durante más de cinco generaciones sin pérdida de la alteración. Generalmente, alteraciones genéticas estables incluyen modificaciones que persisten por más de 10 generaciones; modificaciones particularmente estables persistirán más de alrededor de 25 generaciones y, más particularmente, modificaciones genéticas estables durarán más de 50 generaciones, incluyendo indefinidamente.

[060] Las personas versadas en el arte entenderán que las alteraciones genéticas, incluyendo las modificaciones metabólicas ejemplificadas aquí, se describen con referencia a un organismo hospedero apropiado tal como *E. coli* y sus correspondientes reacciones metabólicas, o un organismo fuente apropiado para material genético deseado, tal como genes para una vía metabólica deseada. No obstante, dada la secuenciación del genoma completo de una amplia variedad de organismos y el alto nivel de habilidad en el área de la genómica, las personas versadas en el arte estarán fácilmente en capacidad de aplicar las enseñanzas y la orientación proporcionadas aquí a esencialmente todos los demás organismos. Por ejemplo, las alteraciones metabólicas de *E. coli* ejemplificadas aquí pueden aplicarse fácilmente a otra especie incorporando el mismo ácido nucleico codificante o análogo de una especie distinta de la especie referenciada. Tales alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, alteraciones genéticas de desplazamientos de genes homólogos, en general y, en particular, ortólogos, parálogos o no ortólogos de la especie.

[061] Un ortólogo es un gen o genes que se relacionan por ascendencia vertical y son responsables de funciones idénticas o sustancialmente las mismas

en diferentes organismos. Por ejemplo, la epóxido hidrolasa murina y la epóxido hidrolasa humana pueden considerarse ortólogos para la función biológica de la hidrólisis de epóxidos. Los genes están relacionados por ascendencia vertical cuando, por ejemplo, comparten una similitud de secuencia de magnitud suficiente para indicar que son homólogos, o relacionados por evolución de un ancestro común. Los genes pueden considerarse asimismo ortólogos si comparten la estructura tridimensional, pero no necesariamente la similitud de secuencia, de una magnitud suficiente para indicar que han evolucionado de un ancestro común, en la medida en que la similitud de la secuencia primaria no es identificable. Genes que son ortólogos pueden codificar proteínas con similitud de secuencia de alrededor de 25% a 100% de identidad de secuencia de aminoácidos. Genes que codifican proteínas que comparten una similitud de aminoácidos menor que 25% pueden considerarse igualmente que han surgido por ascendencia vertical, si su estructura tridimensional muestra también similitudes. Miembros de la familia de enzimas serina proteasas, incluyendo el activador de plasminógeno tisular y elastasa, se considera que han surgido por ascendencia vertical de un ancestro común.

[062] Los ortólogos incluyen genes o sus productos de genes codificados que, por ejemplo, a través de la evolución, han divergido en estructura o actividad general. Por ejemplo, donde una especie codifica un producto de genes que exhibe dos funciones y donde tales funciones se ha separado en distintos genes en una segunda especie, se considera que los tres genes y sus correspondientes productos son ortólogos. Para la producción de un producto bioquímico, las personas versadas en el arte entenderán que el gen ortólogo que alberga actividad metabólica y que se va a introducir o alterar tiene que escogerse para construcción del microorganismo no existente por naturaleza. Un ejemplo de ortólogos que exhiben actividades separables es donde distintas actividades se han separado en diferentes productos de genes entre dos o más especies o dentro de una única especie. Un ejemplo específico es la separación de proteólisis de elastasa y la proteólisis de plasminógeno, dos tipos de actividad serina proteasa, en distintas moléculas como activador de plasminógeno y elastasa. Un segundo ejemplo es la separación de la actividad de micoplasma 5'-3' exonucleasa y ADN polimerasa III de *Drosophila*. La ADN polimerasa de la primera especie puede considerarse un ortólogo a una cualquiera, o ambas, de la exonucleasa o la polimerasa de la segunda especie y viceversa.

[063] En contraste, los parálogos son homólogos relacionados, por ejemplo, por duplicación seguida por divergencia evolutiva y tienen funciones similares o comunes, pero no idénticas. Los parálogos pueden originarse o derivarse de, por ejemplo, la misma especie o de una especie diferente. Por ejemplo, epóxido microsómico hidrolasa (epóxido hidrolasa I) y epóxido hidrolasa soluble (epóxido hidrolasa II) pueden considerarse parálogos porque representan dos enzimas distintas, co-evolucionadas de un ancestro común, que catalizan diferentes reacciones y tienen distintas funciones en la misma especie. Los parálogos son proteínas de la misma especie con similitud de secuencia significativa unas con otras que sugieren que son homólogos, o están relacionadas mediante co-evolución de un ancestro común. Grupos de familias de proteínas parálogas incluyen los homólogos HipA, genes de luciferasa, peptidasas, y otros.

[064] Un desplazamiento de un gen no ortólogo es un gen no ortólogo de una especie que puede sustituir una función de un gen referenciada en una especie diferente. La sustitución incluye, por ejemplo, ser capaz de realizar sustancialmente la misma función o una función similar en la especie de origen, comparada con la función referenciada en la especie diferente. Si bien generalmente, un desplazamiento de un gen no ortólogo será identificable como relacionado estructuralmente con un gen conocido que codifica la función referenciada, genes menos relacionados estructuralmente, pero funcionalmente similares y sus correspondientes productos de genes caerán sin embargo todavía dentro del significado del término tal como se emplea aquí. La similitud funcional requiere, por ejemplo, por lo menos alguna semejanza estructural en el sitio activo o región de unión de un producto de genes no ortólogos, comparado con un gen que codifica la función que se busca sustituir. Por consiguiente, un gen no ortólogo incluye, por ejemplo, un parálogo o un gen no relacionado.

[065] Por lo tanto, al identificar y construir los organismos microbianos no existentes por naturaleza de la invención, que tienen capacidad biosintética de ácido metacrílico, las personas expertas en el arte entenderán que, aplicando las enseñanzas y la orientación ofrecidas aquí a una especie particular, la identificación de modificaciones metabólicas puede incluir la identificación e inclusión o inactivación de ortólogos. En la medida que estén presentes desplazamientos de genes parálogos y/o no ortólogos en el microorganismo referenciado que codifican una enzima que cataliza una reacción metabólica similar o sustancialmente similar, las personas versadas en el arte pueden utilizar asimismo estos genes evolutivamente relacionados.

[066] Los desplazamientos de genes ortólogos, parálogos y no ortólogos pueden determinarse por métodos bien conocidos por las personas expertas en el arte. Por ejemplo, la inspección de secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos para dos polipéptidos revelará identidad de secuencia y similitudes entre las secuencias comparadas. Basada en tales similitudes, una persona experta en el arte puede determinar si la similitud es suficientemente alta para indicar que las proteínas están relacionadas por la evolución de un ancestro común. Algoritmos bien conocidos a los expertos en el arte, tales como Align, BLAST, Clustal W y otros comparan y determinan una similitud o identidad de secuencia aproximada, y determinan igualmente la presencia o significancia de vacíos (*gaps*) en la secuencia a los que puede asignarse una ponderación o puntaje. Tales algoritmos son bien conocidos en el arte y son análogamente aplicables para determinar la similitud o identidad de secuencias nucleotídicas. Parámetros de suficiente similitud para determinar el coeficiente de relación se computan basándose en métodos bien conocidos para calcular semejanza estadística, o la probabilidad de hallar una coincidencia similar en un polipéptido aleatorio, y la significancia de la coincidencia determinada. Una comparación por computador de dos o más secuencias, si se desea, puede optimizarse también visualmente por los expertos en el arte. Puede esperarse que productos de genes relacionados o proteínas tengan una elevada 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 se esperaría que ocurriera por casualidad, si se escanea una base de datos de suficiente tamaño (alrededor de 5%). Secuencias entre 5% y 24% pueden representar o no suficiente homología para concluir que las secuencias comparadas están relacionadas. Análisis estadístico adicional para determinar la significancia de tales coincidencias, dado el tamaño del conjunto de datos, puede llevarse a cabo para determinar la relevancia de estas secuencias.

[067] Parámetros ejemplares para determinar el coeficiente de relación de dos o más secuencias usando el algoritmo BLAST, por ejemplo, pueden fijarse más adelante. En síntesis, pueden realizarse alineaciones de secuencias de aminoácidos usando BLASTP versión 2.0.8 (5 de enero de 1999) y los siguientes parámetros: Matrix: 0 BLOSUM62; gap open: 11; gap extension: 1; x_dropoff: 50; expect: 10.0; wordsize: 3; filter: on. Alineaciones de secuencias de ácidos nucleicos pueden llevarse a cabo usando BLASTN versión 2.0.6 (1 de septiembre de 1998) y los siguientes parámetros: Match: 1; mismatch: -2; gap open: 5; gap

extension: 2; x_dropoff: 50; expect: 10.0; wordsize: 11; filter: off. Las personas expertas en el arte sabrán qué modificaciones pueden hacerse a los parámetros anteriores para aumentar o disminuir la rigurosidad de la comparación, por ejemplo, y determinar el coeficiente de relación de dos o más secuencias.

[068] En una modalidad, la invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza que tiene una vía de éster de metacrilato que comprende por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de éster de metacrilato expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de metacrilato, en donde la vía de éster de metacrilato comprende una alcohol transferasa o una enzima formadora de éster, y una deshidratasa. En una modalidad particular, el organismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de éster de metacrilato. Por ejemplo, los dos ácidos nucleicos exógenos pueden codificar una alcohol transferasa y una deshidratasa o, alternativamente, una enzima formadora de éster y una deshidratasa. En una modalidad particular, el por lo menos un ácido nucleico exógeno puede ser un ácido nucleico heterólogo. En otra modalidad, el organismo microbiano no existente por naturaleza puede estar en un medio de cultivo sustancialmente anaerobio. La invención provee adicionalmente un método para producir éster de metacrilato, que comprende cultivar el organismo microbiano no existente por naturaleza, divulgado aquí, que tiene una vía de éster de metacrilato bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir éster de metacrilato.

[069] La invención provee adicionalmente un organismo microbiano no existente por naturaleza que tiene una vía de metacrilato de metilo que comprende por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de metacrilato de metilo expresada en una cantidad suficiente para producir un metacrilato de metilo, la vía de metacrilato de metilo comprendiendo una alcohol transferasa o una enzima formadora de éster, y una deshidratasa. En una modalidad adicional, el organismo microbiano puede comprender dos ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de metacrilato de metilo. En una modalidad particular, los dos ácidos nucleicos exógenos pueden codificar una alcohol transferasa y una deshidratasa o, alternativamente, una enzima formadora de éster y una deshidratasa. En otra modalidad, el por lo menos un ácido nucleico exógeno puede ser un ácido nucleico heterólogo. En otra modalidad, el organismo microbiano no existente por naturaleza puede estar en un medio de cultivo sustancialmente anaerobio. La invención facilita asimismo un

método para producir metacrilato de metilo cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza, que tiene una vía de metacrilato de metilo, bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir metacrilato de metilo.

[070] En una modalidad, la invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza, que comprende un organismo microbiano que tiene una vía de éster de metacrilato que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de éster de metacrilato expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de metacrilato, la citada vía de éster de metacrilato comprendiendo una alcohol transferasa o una enzima formadora de éster, y una deshidratasa. En un aspecto, el organismo microbiano no existente por naturaleza comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de éster de metacrilato. En un aspecto, los dos ácidos nucleicos exógenos codifican una alcohol transferasa y una deshidratasa o, alternativamente, una enzima formadora de éster y una deshidratasa. En otro aspecto, el por lo menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo. En otro aspecto, el organismo microbiano no existente por naturaleza está en un medio de cultivo sustancialmente anaerobio.

[071] En una modalidad, la invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza, en donde la citada deshidratasa convierte un éster de 3-hidroxiisobutirato o un éster de 2-hidroxiisobutirato en el citado éster de metacrilato. En una modalidad, la invención provee un organismo microbiano no existente por naturaleza, en donde la citada alcohol transferasa convierte 3-hidroxiisobutiril-CoA en un éster de 3-hidroxiisobutirato o 2-hidroxiisobutiril-CoA en un éster de 2-hidroxiisobutirato.

[072] En una modalidad, la invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza, en donde el citado organismo microbiano comprende además una vía de éster de metacrilato que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de éster de metacrilato expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de metacrilato, la citada vía de éster de metacrilato comprendiendo una vía seleccionada de: (a) una 3-hidroxiisobutirato-CoA transferasa o una 3-hidroxiisobutirato-CoA sintetasa; una alcohol transferasa; y una deshidratasa; (b) una enzima formadora de un éster de 3-hidroxiisobutirato y una deshidratasa; (c) una 2-hidroxiisobutirato-CoA transferasa o una 2-hidroxiisobutirato-CoA sintetasa; una alcohol transferasa; y una deshidratasa; o (d) una enzima formadora de un éster de 2-hidroxiisobutirato

y una deshidratasa. En un aspecto, la invención proporciona un método para producir éster de metacrilato cultivando el organismo microbiano no existente por naturaleza, como se divulga aquí, bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir éster de metacrilato.

[073] En una modalidad, la invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza, que comprende un organismo microbiano que tiene una vía de metacrilato de metilo que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de metacrilato de metilo expresada en una cantidad suficiente para producir un metacrilato de metilo, la citada vía de metacrilato de metilo comprendiendo una alcohol transferasa o una enzima formadora de éster, y una deshidratasa. En un aspecto, el organismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de metacrilato de metilo. En otro aspecto, los dos ácidos nucleicos exógenos codifican una alcohol transferasa y una deshidratasa, o alternativamente, una enzima formadora de éster y una deshidratasa. En otro aspecto, el por lo menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo. En otro aspecto, el organismo microbiano no existente por naturaleza está en un medio de cultivo sustancialmente anaerobio.

[074] En una modalidad, la invención provee un método para producir metacrilato de metilo, que comprende cultivar el organismo microbiano no existente por naturaleza, como se describe aquí, bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir metacrilato de metilo.

[075] En una modalidad, la invención proporciona un método para producir un éster de metacrilato que comprende cultivar un organismo microbiano no existente por naturaleza bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir un éster de 3-hidroxiisobutirato, en donde el citado organismo microbiano no existente por naturaleza contiene un ácido nucleico exógeno que codifica una alcohol transferasa o una enzima formadora de un éster de 3-hidroxiisobutirato expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de 3-hidroxiisobutirato, y deshidratar químicamente el citado éster de 3-hidroxiisobutirato para producir un éster de metacrilato.

[076] En una modalidad, la invención provee un método para producir un éster de metacrilato que comprende cultivar un organismo microbiano no existente por naturaleza bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir un éster de 2-hidroxiisobutirato, en donde el citado organismo microbiano no existente por naturaleza contiene un ácido nucleico exógeno que codifica una

alcohol transferasa o una enzima formadora de un éster de 2-hidroxiisobutirato expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de 2-hidroxiisobutirato, y deshidratar químicamente el citado éster de 2-hidroxiisobutirato para producir un éster de metacrilato.

[077] En una modalidad, la invención proporciona un método para producir metacrilato de metilo que comprende cultivar un organismo microbiano no existente por naturaleza bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir metil-3-hidroxiisobutirato, en donde el citado organismo microbiano no existente por naturaleza comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una alcohol transferasa o una enzima formadora de éster expresada en una cantidad suficiente para producir metil-3-hidroxiisobutirato, y deshidratar químicamente el citado metil-3-hidroxiisobutirato para producir metacrilato de metilo.

[078] En un aspecto de los métodos ya mencionados, el ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo. En otro aspecto de los métodos ya mencionados, el organismo microbiano no existente por naturaleza está en un medio de cultivo sustancialmente anaerobio.

[079] En una modalidad, la invención provee un método en donde el citado organismo microbiano comprende además una vía de un éster de 3-hidroxiisobutirato que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una vía de una enzima de éster de 3-hidroxiisobutirato expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de 3-hidroxiisobutirato, la citada vía de éster de 3-hidroxiisobutirato comprendiendo una vía seleccionada de: (a) una 3-hidroxiisobutirato-CoA transferasa o una 3-hidroxiisobutirato-CoA sintetasa; y una alcohol transferasa; o (b) una enzima formadora de un éster de 3-hidroxiisobutirato. En otra modalidad, la invención facilita un método en donde el citado organismo microbiano comprende además una vía de un éster de 2-hidroxiisobutirato que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de un éster de 2-hidroxiisobutirato expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de 2-hidroxiisobutirato, la citada vía de éster de 2-hidroxiisobutirato comprendiendo una vía seleccionada de: (a) una 2-hidroxiisobutirato-CoA transferasa o una 2-hidroxiisobutirato-CoA sintetasa; y una alcohol transferasa; o (b) una enzima formadora de un éster de 2-hidroxiisobutirato.

[080] Tal como se divulga aquí, la invención provee organismos microbianos no existentes por naturaleza que tienen una vía de ácido metacrílico que

comprende por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico. Vías ejemplares incluyen, pero no se limitan a, las vías divulgadas en Figura 1. Vías ejemplares de ácido metacrílico incluyen, por ejemplo, las vías correspondientes a las enzimas mostradas en Figura 1, como sigue y como se discute a continuación con más detalle: vía (1) A/B/C; vía (2) A/B/G/H; vía (3) A/F/G/C; vía (4) A/F/H; vía (5) D/E/B/C; vía (6) D/E/B/G/H; vía (7) D/E/F/H; vía (8) D/E/F/G/C; vía (9) I/J/C; vía (10) I/J/G/H; vía (11) I/L/K/E/B/C; vía (12) I/L/K/E/B/G/H; vía (13) I/L/K/E/F/H; y vía (14) I/L/K/E/F/G/C.

[081] En una modalidad particular, la invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza, que comprende un organismo microbiano que tiene una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo citramalato sintasa (A), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (1) A/B/C). Como se divulga aquí, el organismo microbiano puede comprender más de un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, incluyendo hasta todas las enzimas en una vía, por ejemplo, tres ácidos nucleicos exógenos codifican citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), y citraconato descarboxilasa.

[082] En una modalidad particular, un organismo microbiano no existente por naturaleza, productor de MAA, de la invención puede tener por lo menos un ácido nucleico exógeno que es un ácido nucleico heterólogo. En otra modalidad el organismo microbiano no existente por naturaleza, productor de MAA, puede estar en un medio de cultivo sustancialmente anaerobio.

[083] En otra modalidad, la invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza que comprende una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo citramalato sintasa (A), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), citraconato isomerasa (G), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (2) A/B/G/H). En todavía otra modalidad, la invención provee un organismo microbiano no existente por naturaleza, que comprende una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido

metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo citramalato sintasa (A), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F) citraconato isomerasa (G), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (3) A/F/G/C).

[084] En una modalidad adicional, la invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza, que comprende una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo citramalato sintasa (A), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (4) A/F/H). En todavía una modalidad adicional, la invención provee un organismo microbiano no existente por naturaleza, que comprende una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo citramalil-CoA liasa (D), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (5) D/E/B/C).

[085] En una modalidad adicional, la invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza, que comprende una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo citramalil-CoA liasa (D), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), citraconato isomerasa (G), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (6) D/E/B/G/H). En todavía otra modalidad, la invención provee un organismo microbiano no existente por naturaleza, que comprende una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo citramalil-CoA liasa (D), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (7) D/E/F/H).

[086] En otra modalidad, la invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza, que comprende una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la

vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo citramalil-CoA liasa (D), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F), citraconato isomerasa (G), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (8) D/E/F/G/C). Adicionalmente, la invención provee un organismo microbiano no existente por naturaleza, que comprende una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo aconitato descarboxilasa (I), itaconato isomerasa (J), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (9) I/J/C).

[087] En todavía una modalidad adicional, la invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza, que comprende una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo aconitato descarboxilasa (I), itaconato isomerasa (J), citraconato isomerasa (G), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (10) I/J/G/H). En una modalidad adicional, la invención provee un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo aconitato descarboxilasa (I), itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (L), citramalil-CoA deshidratasa (K), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (11) I/L/K/E/B/C).

[088] La invención proporciona asimismo un organismo microbiano no existente por naturaleza, que comprende una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo aconitato descarboxilasa (I), itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (L), citramalil-CoA deshidratasa (K), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), citraconato isomerasa (G), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (12) I/L/K/E/B/G/H). En todavía una modalidad

adicional, la invención provee un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo un organismo microbiano que tiene una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo aconitato descarboxilasa (I), itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (L), citramalil-CoA deshidratasa (K), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (13) I/L/K/E/F/H). En una modalidad adicional, la invención facilita un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo aconitato descarboxilasa (I), itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (L), citramalil-CoA deshidratasa (K), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F), citraconato isomerasa (G), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (14) I/L/K/E/F/G/C).

[089] En una modalidad adicional, la invención posibilita un organismo microbiano no existente por naturaleza que tiene una vía de ácido metacrílico, en donde el organismo microbiano no existente por naturaleza contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima o proteína que convierte un sustrato en un producto, seleccionada del grupo conformado por acetil-CoA y piruvato en citramalato, citramalato en citraconato, y citraconato en metacrilato; acetil-CoA y piruvato en citramalil-CoA, citramalil-CoA en citramalato, citramalato en citraconato, y citraconato en metilacrilato; aconitato en itaconato, itaconato en itaconil-CoA, itaconil-CoA en citramalil-CoA, citramalil-CoA en citramalato, citramalato en mesaconato, mesaconato en metacrilato, y así sucesivamente tal como las reacciones descritas aquí y aquellos sustratos y productos mostrados en la vías ejemplares de ácido metacrílico ilustradas en Figura 1. Un experto en el arte entenderá que estas son meramente ejemplares y que cualquiera de los pares sustrato-producto divulgados aquí, apropiados para producir un producto deseado y para los cuales se dispone de una actividad apropiada para la conversión del sustrato en el producto, pueden determinarse fácilmente por un experto en al arte, basado en las enseñanzas contenidas aquí. En consecuencia, la invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza que

contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima o proteína, en donde la enzima o proteína convierte los sustratos y productos de una vía de ácido metacrílico, tal como la mostrada en Figura 1. Adicionalmente se provee una vía de ácido metacrílico que comprende acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa (o crotonil-CoA hidratasa, 4-hidroxi), 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa (véase Ejemplo XXII y Figura 21). Asimismo se provee una vía de ácido metacrílico que comprende acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa (véase Ejemplo XXII y Figura 21).

[090] Aunque generalmente descrito aquí como un organismo microbiano que contiene una vía de ácido metacrílico, se entiende que la invención provee adicionalmente un organismo microbiano no existente por naturaleza, que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir un intermediario de una vía de ácido metacrílico. Por ejemplo, como se divulga aquí, una vía de ácido metacrílico se ejemplifica en Figura 1. Por lo tanto, además de un organismo microbiano que contiene una vía de ácido metacrílico que produce ácido metacrílico, la invención provee adicionalmente un organismo microbiano no existente por naturaleza que comprende por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, donde el organismo microbiano produce una vía de un intermediario de ácido metacrílico, por ejemplo, citramalil-CoA, itaconil-CoA, itaconato, citraconato, citramalato y mesaconato.

[091] Se entiende que cualquiera de las vías divulgadas aquí, como se describe en los Ejemplos y se ejemplifica en las vías de Figuras 1-30, puede utilizarse para generar un organismo microbiano no existente por naturaleza que produce un producto o intermediario de una vía, según se desee. Como se divulga aquí, tal organismo microbiano que produce un intermediario puede usarse en combinación con otro organismo microbiano que exprese enzimas de vías corriente abajo, para producir un producto deseado. Sin embargo, se entiende que un organismo microbiano no existente por naturaleza, que produce un intermediario de la vía de ácido metacrílico, puede utilizarse para producir el intermediario como un producto deseado.

[092] Esta invención se dirige igualmente, en parte, a vías biosintéticas generadas mediante ingeniería genética para mejorar el flujo de carbono a través de un intermediario de metabolismo central en camino al ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. La presente invención proporciona organismos microbianos no existentes por naturaleza, que tienen uno o más genes exógenos que codifican enzimas que pueden catalizar varias transformaciones enzimáticas en camino al ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. En algunas modalidades, estas transformaciones enzimáticas son parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos reductores (RTCA - *reductive tricarboxylic acid*) y se usan para mejorar los rendimientos del producto, incluyendo pero no limitado a, a partir de material de alimentación de carbono a base de carbohidratos.

[093] En numerosas vías generadas mediante ingeniería genética, la realización de rendimientos máximos de producto, basados en material de alimentación de carbohidratos se obstaculiza por equivalentes reductores insuficientes o por la pérdida de equivalentes reductores y/o carbono a subproductos. De acuerdo con algunas modalidades, la presente invención aumenta los rendimientos de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato (i) mejorando la fijación de carbono mediante el ciclo de los TCA reductores, y/o (ii) accediendo a equivalentes reductores adicionales a partir de fuentes de carbono gaseoso y/o componentes de gas de síntesis tales como CO, CO_2, y/o H_2. Además del gas de síntesis, otras fuentes de tales gases incluyen, pero no se limitan a, la atmósfera como se encuentra en la naturaleza o generada.

[094] El ciclo de ácidos tricarboxílicos reductores (RTCA), fijadores de CO_2, es una vía anabólica endoergónica de asimilación de CO_2 que utiliza equivalentes reductores y ATP (Figura 12). Un giro del ciclo RTCA asimila dos moles de CO_2 en un mol de acetil-CoA, o cuatro moles de CO_2 en un mol de oxaloacetato. Esta disponibilidad adicional de acetil-CoA mejora el rendimiento teórico máximo de moléculas de producto derivadas de material de alimentación de carbono a base de carbohidratos. Carbohidratos ejemplares incluyen pero no se limitan a glucosa, sacarosa, xilosa, arabinosa y glicerol.

[095] En algunas modalidades, el ciclo de los TCA reductores, acoplado con enzimas monóxido de carbono deshidrogenasa y/o hidrogenasa, puede emplearse para permitir la utilización de gas de síntesis, CO_2, CO, H_2, y/u otra fuente de carbono por microorganismos. El gas de síntesis (syngas), en

particular, es una mezcla de principalmente H_2 y CO, que incluye a veces algunas cantidades de CO_2, que puede obtenerse mediante gasificación de cualquier material de alimentación orgánico, tal como carbón, queroseno, gas natural, biomasa, o materia orgánica de desechos. Se han desarrollado numerosos procesos de gasificación, y la mayoría de los diseños se basan en oxidación parcial, en donde limitar el oxígeno evita la combustión completa, de materiales orgánicos a altas temperaturas (500-1500°C) para proporcionar gas de síntesis como una mezcla 0,5:1-3:1 H_2/CO. Además de carbón, se ha utilizado biomasa de muchos tipos para producción de gas de síntesis y representa una material de alimentación económico y flexible para la producción biológica de productos químicos y combustibles renovables. El dióxido de carbono puede proveerse de la atmósfera o en forma condensada, por ejemplo, del cilindro de un tanque, o mediante sublimación de CO_2 sólido. Análogamente, CO y gas hidrógeno pueden proporcionarse en forma de reactivo y/o mezclarse en cualquier razón deseada. Otras formas de carbono gaseoso pueden incluir, por ejemplo, metanol o solventes orgánicos volátiles similares.

[096] Los componentes del gas de síntesis y/u otras fuentes de carbono pueden proporcionar suficiente CO_2, equivalentes reductores, y ATP para que opere en el ciclo de los TCA reductores. Un giro del ciclo de RTCA asimila dos moles de CO_2 en un mol de acetil-CoA y requiere 2 ATP y 4 equivalentes reductores. CO y/o H_2 pueden aportar equivalentes reductores por medio de enzimas monóxido de carbono deshidrogenasa e hidrogenasa, respectivamente. Equivalentes reductores pueden venir en la forma de NADH, NADPH, FADH, quinonas reducidas, ferredoxinas reducidas, flavodoxinas reducidas y tiorredoxinas. Los equivalentes reductores, particularmente NADH, NADPH, y ferredoxina reducida, pueden servir como cofactores para las enzimas del ciclo de RTCA, por ejemplo, malato deshidrogenasa, fumarato reductasa, alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa (alternativamente conocida como 2-oxoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, alfa-ketoglutarato sintasa, o 2-oxoglutarato sintasa), piruvato:ferredoxina oxidorreductasa e isocitrato deshidrogenasa. Alternativamente, los electrones de estos equivalentes reductores pueden pasar a través de una cadena de transporte de electrones que produce un gradiente de iones donde se pasan a un aceptor tal como oxígeno, nitrato, iones de metal oxidados, protones, o un electrodo. El gradiente de iones puede usarse entonces para generación de ATP mediante una ATP sintasa o una enzima similar.

[097] El ciclo de los TCA reductores se reportó por primera vez en la bacteria fotosintética sulfurosa verde *Chlorobium limicola* (Evans et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 55:928-934 (1966)). Vías similares se han caracterizado en algunos procariotas (proteobacterias, bacterias sulfurosas verdes y bacterias termófilas de gas detonante) y arqueas dependientes de azufre (Hugler et al., *J. Bacteriol.* 187:3020-3027 (2005; Hugler et al., *Environ. Microbiol.* 9:81-92 (2007). En algunos casos, ciclos de TCA reductores y oxidativos (Krebs) están presentes en el mismo organismo (Hugler et al., *supra* (2007); Siebers et al., *J. Bacteriol.* 186:2179-2194 (2004)). Algunos metanógenos y anaerobios obligados poseen ciclos de TCA reductores u oxidativos incompletos que pueden funcionar para sintetizar intermediarios biosintéticos (Ekiel et al., *J. Bacteriol.* 162:905-908 (1985); Wood et al., *FEMS Microbiol. Rev.* 28:335-352 (2004)).

[098] Las enzimas claves para la fijación de carbono del ciclo de los TCA reductores son alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, piruvato:ferredoxina oxidorreductasa e isocitrato deshidrogenasa. Carbono adicional puede fijarse durante la conversión de fosfoenolpiruvato en oxaloacetato por fosfoenolpiruvato carboxilasa o fosfoenolpiruvato carboxicinasa o por conversión de piruvato en malato por una enzima málica.

[099] Muchas de las enzimas en el ciclo de los TCA son reversibles y pueden catalizar reacciones en las direcciones reductoras y oxidativas. No obstante, algunas reacciones del ciclo de los TCA son irreversibles *in vivo* y, en consecuencia, se usan diferentes enzimas para catalizar estas reacciones en las direcciones requeridas para el ciclo de los TCA inverso. Estas reacciones son: (1) conversión de citrato en oxaloacetato y acetil-CoA, (2) conversión de fumarato en succinato, y (3) conversión de succinil-CoA en alfa-ketoglutarato. En el ciclo de los TCA, se forma citrato a partir de la condensación de oxaloacetato y acetil-CoA. La reacción inversa, escisión de citrato a oxaloacetato y acetil-CoA, es dependiente de ATP y se cataliza por ATP-citrato liasa, o citril-CoA sintetasa y citril-CoA liasa. Alternativamente, citrato liasa puede acoplarse a acetil-CoA sintetasa, una acetil-CoA transferasa, o fosfotransacetilasa y acetato cinasa para formar acetil-CoA y oxaloacetato a partir de citrato. La conversión de succinato en fumarato se cataliza por succinato deshidrogenasa mientras que la reacción inversa se cataliza por fumarato reductasa. En el ciclo de los TCA se forma succinil-CoA a partir de la descarboxilación, dependiente de $NAD(P)^+$, de alfa-ketoglutarato por el complejo alfa-ketoglutarato deshidrogenasa. La reacción inversa se cataliza por alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa.

[0100] Un organismo capaz de utilizar el ciclo inverso de ácidos tricarboxílicos para permitir la producción de productos derivados de acetil-CoA en 1) CO, 2) CO_2 y H_2, 3) CO y CO_2, 4) gas de síntesis que incluye CO y H_2, y 5) gas de síntesis u otras fuentes de carbono gaseoso que comprenden CO, CO_2, y H_2 pueden incluir cualquiera de las siguientes actividades enzimáticas: ATP-citrato liasa, citrato liasa, aconitasa, isocitrato deshidrogenasa, alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, succinil-CoA sintetasa, succinil-CoA transferasa, fumarato reductasa, fumarasa, malato deshidrogenasa, acetato cinasa, fosfotransacetilasa, acetil-CoA sintetasa, acetil-CoA transferasa, piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, monóxido de carbono deshidrogenasa, hidrogenasa, y ferredoxina (véase Figura 13). Las enzimas y los correspondientes genes requeridos para estas actividades se describen aquí.

[0101] Carbono de gas de síntesis u otras fuentes de carbono gaseoso puede fijarse mediante el ciclo de los TCA inverso y sus componentes. Específicamente, la combinación de ciertos componentes de la vía de utilización de gas carbónico con las vías para la formación de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato a partir de acetil-CoA, tiene como resultado altos rendimientos de estos productos, facilitando un mecanismo eficiente para fijar el carbono presente en el dióxido de carbono, alimentado exógenamente o producido endógenamente a partir de CO, en acetil-CoA.

[0102] En algunas modalidades, una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato en un organismo microbiano no existente por naturaleza de la invención puede utilizar cualquier combinación de (1) CO, (2) CO_2, (3) H_2, o mezclas de los anteriores para aumentar los rendimientos de los pasos biosintéticos que involucran la reducción, incluyendo la adición para activar el ciclo de los TCA reductores.

[0103] En algunas modalidades un organismo microbiano no existente por naturaleza, que tiene una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores. El por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa; y por lo menos una enzima exógena seleccionada de una monóxido de carbono deshidrogenasa, una hidrogenasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, y una ferredoxina, expresada en una

cantidad suficiente para permitir la utilización de (1) CO, (2) CO_2, (3) H_2, (4) CO_2 y H_2, (5) CO y CO_2, (6) CO y H_2, o (7) CO, CO_2, y H_2.

[0104] En algunas modalidades un método incluye cultivar un organismo microbiano no existente por naturaleza que tiene una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, que contiene además por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores. El por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa. Adicionalmente, tal organismo puede incluir asimismo por lo menos una enzima exógena seleccionada de una monóxido de carbono deshidrogenasa, una hidrogenasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, y una ferredoxina, expresada en una cantidad suficiente para permitir la utilización de (1) CO, (2) CO_2, (3) H_2, (4) CO_2 y H_2, (5) CO y CO_2, (6) CO y H_2, o (7) CO, CO_2, y H_2 para producir un producto.

[0105] En algunas modalidades un organismo microbiano no existente por naturaleza, que tiene una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, incluye además por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores expresada en una cantidad suficiente para mejorar el flujo de carbono a través de acetil-CoA. El por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, isocitrato deshidrogenasa, aconitasa y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa.

[0106] En algunas modalidades un organismo microbiano no existente por naturaleza, que tiene una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima expresada en una cantidad suficiente para mejorar la disponibilidad de equivalentes reductores en la presencia de monóxido de carbono y/o hidrógeno, aumentando en esa forma el rendimiento de productos limitados por redox mediante material de alimentación de carbono a base de carbohidratos. El por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una monóxido de carbono deshidrogenasa, una hidrogenasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, y una ferredoxina. En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para mejorar la disponibilidad de equivalentes reductores en la presencia de monóxido de

carbono o hidrógeno aumentando en esa forma el rendimiento de productos limitados por redox mediante material de alimentación de carbono a base de carbohidratos, tales como azúcares o fuentes de carbono gaseoso, el método incluye cultivar este organismo microbiano no existente por naturaleza bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato.

[0107] En algunas modalidades, el organismo microbiano no existente por naturaleza, que tiene una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, incluye dos ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de los TCA reductores. En algunas modalidades, el organismo microbiano no existente por naturaleza, que tiene una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, incluye tres ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de los TCA reductores. En algunas modalidades, el organismo microbiano no existente por naturaleza incluye tres ácidos nucleicos exógenos que codifican una ATP-citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa. En algunas modalidades, el organismo microbiano no existente por naturaleza incluye tres ácidos nucleicos exógenos que codifican una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa. En algunas modalidades, el organismo microbiano no existente por naturaleza incluye cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa; una fosfoenolpiruvato carboxilasa o una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa; y una H_2 hidrogenasa. En algunas modalidades, el organismo microbiano no existente por naturaleza incluye dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una CO deshidrogenasa y una H_2 hidrogenasa.

[0108] En algunas modalidades, los organismos microbianos no existentes por naturaleza, que tienen una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, incluyen además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, y combinaciones de las anteriores.

[0109] En algunas modalidades, el organismo microbiano no existente por naturaleza, que tiene una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, incluye además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de monóxido de carbono deshidrogenasa, acetil-CoA sintasa, ferredoxina, NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa y combinaciones de las anteriores.

[0110] En algunas modalidades, el organismo microbiano no existente por naturaleza, que tiene una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, utiliza un material de alimentación de carbono seleccionado de (1) CO, (2) CO_2, (3) CO_2 y H_2, (4) CO y H_2, o (5) CO, CO_2, y H_2. En algunas modalidades, el organismo microbiano no existente por naturaleza, que tiene una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, utiliza hidrógeno para equivalentes reductores. En algunas modalidades, el organismo microbiano no existente por naturaleza, que tiene una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, utiliza CO para equivalentes reductores. En algunas modalidades, el organismo microbiano no existente por naturaleza, que tiene una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, utiliza combinaciones de CO e hidrógeno para equivalentes reductores.

[0111] En algunas modalidades, el organismo microbiano no existente por naturaleza, que tiene una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, incluye además uno o más ácidos nucleicos que codifican una enzima seleccionada de una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una piruvato carboxilasa, y una enzima málica.

[0112] En algunas modalidades, el organismo microbiano no existente por naturaleza, que tiene una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, incluye además uno o más ácidos nucleicos que codifican una enzima seleccionada de una malato deshidrogenasa, una fumarasa, una fumarato reductasa, una succinil-CoA sintetasa, y una succinil-CoA transferasa.

[0113] En algunas modalidades, el organismo microbiano no existente por naturaleza, que tiene una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, puede tener o incluir opcionalmente además por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una citrato liasa,

una ATP-citrato liasa, una citril-CoA sintetasa, una citril-CoA liasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, y una ferredoxina.

[0114] Se entiende por los expertos en el arte que las vías descritas aquí para aumentar el rendimiento del producto pueden combinarse con cualquiera de las vías divulgadas aquí, incluyendo las vías ilustradas en la figuras. Un experto en el arte entenderá que, dependiendo de la vía a un producto deseado y de los precursores e intermediarios de esa vía, una vía particular para mejorar el rendimiento del producto, como se discute aquí y en los Ejemplos, o una combinación de tales vías, puede usarse en combinación con una vía a un producto deseado para aumentar el rendimiento de ese producto o intermediario de la vía.

[0115] La invención proporciona asimismo un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo un organismo microbiano que tiene una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico; el citado organismo microbiano no existente por naturaleza comprendiendo además: (i) una vía de los TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, u opcionalmente isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, citril-CoA sintetasa o citril-CoA liasa; (ii) una vía de los TCA reductores que comprende por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o (iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores; en donde la citada vía de ácido metacrílico comprende una vía seleccionada de: (a) citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), y citraconato descarboxilasa; (b) citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa; (c) citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato),

citraconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa; (d) citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), y mesaconato descarboxilasa; (e) citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), y citraconato descarboxilasa; (f) citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa; (g) citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), y mesaconato descarboxilasa; (h) citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), citraconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa; (i) aconitato descarboxilasa, itaconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa; (j) aconitato descarboxilasa, itaconato isomerasa, citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa; (k) aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), y citraconato descarboxilasa; (l) aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa; (m) aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), y mesaconato descarboxilasa; (n) aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), citraconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa; (o) 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; (p) metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; (q) metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; (r) metilmalonil-CoA mutasa, alcohol/aldehído deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; (s) metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, alcohol/aldehído deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; (t) metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-amino-2-metilpropionato transaminasa, y 3-amino-2-metilpropionato amoníaco liasa; (u) metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa,

metilmalonil-CoA reductasa, 3-amino-2-metilpropionato transaminasa, y 3-amino-2-metilpropionato amoníaco liasa; (v) 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; (w) aspartato aminotransferasa, glutamato mutasa, 3-metilaspartasa, y mesaconato descarboxilasa; (x) alfa-ketoglutarato reductasa, 2-hidroxiglutamato mutasa, 3-metilmalato deshidratasa, y mesaconato descarboxilasa; (y) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y metacrilil-CoA transferasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA sintetasa; (z) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, enoil-CoA hidratasa, y 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; (aa) 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, vinilacetil-CoA □-isomerasa, crotonasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y cualquiera de metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA transferasa; (bb) 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa; (cc) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa, isobutiril-CoA mutasa, isobutiril-CoA deshidrogenasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa; (dd) lactato deshidrogenasa, lactato-CoA transferasa, lactoil-CoA deshidratasa, acil-CoA deshidrogenasa, propionil-CoA carboxilasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; (ee) valina aminotransferasa, 2-ketoisovalerato deshidrogenasa, isobutiril-CoA deshidrogenasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa; (ff) valina aminotransferasa, 2-ketoisovalerato deshidrogenasa, isobutiril-CoA deshidrogenasa, metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa, acetolactato sintasa, acetohidroxiácido isomerorreductasa y dihidroxiácido deshidratasa; (gg) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; y (hh) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA

deshidratasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa.

[0116] La invención provee adicionalmente un organismo microbiano no existente por naturaleza, que tiene una vía de ácido 2-hidroxiisobutírico que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido 2-hidroxiisobutírico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido 2-hidroxiisobutírico. Tal organismo microbiano no existente por naturaleza puede comprender además (i) una vía de los TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, u opcionalmente isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, citril-CoA sintetasa o citril-CoA liasa; (ii) una vía de los TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o (iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores; en donde la vía de ácido 2-hidroxiisobutírico comprende una vía seleccionada de (a) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, y 2-hidroxiisobutiril-CoA transferasa o 2-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 2-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa; y (b) 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, vinilacetil-CoA □-isomerasa, crotonasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, y cualquiera de 2-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 2-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 2-hidroxiisobutiril-CoA transferasa (véase Figuras 16C). El organismo microbiano no existente por naturaleza puede comprender dos, tres, cuatro o cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de ácido metacrílico, hasta todas las enzimas de la vía.

[0117] La invención proporciona además un organismo microbiano no existente por naturaleza comprendiendo un organismo microbiano que tiene una vía de ácido 3-hidroxiisobutírico que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido 3-hidroxiisobutírico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido 3-hidroxiisobutírico. El organismo microbiano no existente por naturaleza puede comprender además (i) una vía de los TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que

codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, u opcionalmente isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, citril-CoA sintetasa o citril-CoA liasa; (ii) una vía de los TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o (iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores; en donde la vía de ácido 3-hidroxiisobutírico comprende una vía seleccionada de (a) 4-hidroxibutiril-CoA mutasa; y (b) 4-hidroxibutiril-CoA mutasa y 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa (véase Figura 16B). El organismo microbiano no existente por naturaleza puede incluir dos ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de ácido metacrílico.

[0118] La invención proporciona asimismo un organismo microbiano no existente por naturaleza comprendiendo un organismo microbiano que tiene una vía de 3-hidroxiisobutiril-CoA que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido 3-hidroxiisobutírico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido 3-hidroxiisobutírico. El organismo microbiano no existente por naturaleza puede comprender además (i) una vía de los TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, u opcionalmente isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, citril-CoA sintetasa o citril-CoA liasa; (ii) una vía de los TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o (iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores;

en donde la vía de 3-hidroxiisobutiril-CoA comprende 4-hidroxibutiril-CoA mutasa (véase Figura 16B).

[0119] En una modalidad adicional, el organismo microbiano que incluye (i) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, ferredoxina, y combinaciones de las anteriores; un organismo microbiano que incluye (ii) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, y combinaciones de las anteriores.

[0120] Tal organismo microbiano puede comprender dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de ácido metacrílico, hasta todas las enzimas de una vía. Por ejemplo, el organismo microbiano puede comprender (a) tres ácidos nucleicos exógenos que codifican citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), y citraconato descarboxilasa; (b) cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa; (c) cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), citraconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa; (d) tres ácidos nucleicos exógenos que codifican citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), y mesaconato descarboxilasa; (e) cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), y citraconato descarboxilasa; (f) cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa; (g) cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), y mesaconato descarboxilasa; (h) cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), citraconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa; (i) tres ácidos

nucleicos exógenos que codifican aconitato descarboxilasa, itaconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa; (j) cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican aconitato descarboxilasa, itaconato isomerasa, citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa; (k) seis ácidos nucleicos exógenos que codifican aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), y citraconato descarboxilasa; (l) siete ácidos nucleicos exógenos que codifican aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa; (m) seis ácidos nucleicos exógenos que codifican aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), y mesaconato descarboxilasa; o (n) siete ácidos nucleicos exógenos que codifican aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), citraconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa; (o) un ácido nucleico exógeno que codifica 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; (p) cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; (q) cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; (r) tres ácidos nucleicos exógenos que codifican metilmalonil-CoA mutasa, alcohol/aldehído deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; (s) cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, alcohol/aldehído deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; (t) cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-amino-2-metilpropionato transaminasa, y 3-amino-2-metilpropionato amoníaco liasa; (u) cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-amino-2-metilpropionato transaminasa, y 3-amino-2-metilpropionato amoníaco liasa; (v) tres ácidos nucleicos exógenos que codifican 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-

hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; (w) cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican aspartato aminotransferasa, glutamato mutasa, 3-metilaspartasa, y mesaconato descarboxilasa; (x) cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican alfa-ketoglutarato reductasa, 2-hidroxiglutamato mutasa, 3-metilmalato deshidratasa, y mesaconato descarboxilasa; (y) cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y metacrilil-CoA transferasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA sintetasa; (z) siete ácidos nucleicos exógenos que codifica acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, enoil-CoA hidratasa, y 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; (aa) seis ácidos nucleicos exógenos que codifican 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, vinilacetil-CoA □-isomerasa, crotonasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y cualquiera de metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA transferasa; (bb) tres ácidos nucleicos exógenos que codifican 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa; (cc) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa, isobutiril-CoA mutasa, isobutiril-CoA deshidrogenasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa; (dd) lactato deshidrogenasa, lactato-CoA transferasa, lactoil-CoA deshidratasa, acil-CoA deshidrogenasa, propionil-CoA carboxilasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; (ee) valina aminotransferasa, 2-ketoisovalerato deshidrogenasa, isobutiril-CoA deshidrogenasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa; (ff) valina aminotransferasa, 2-ketoisovalerato deshidrogenasa, isobutiril-CoA deshidrogenasa, metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa, acetolactato sintasa, acetohidroxiácido isomeroreductasa y dihidroxiácido deshidratasa; (gg) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; y (hh) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA

deshidratasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa.

[0121] En otra modalidad, un organismo microbiano puede comprender dos, tres, cuatro o cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno enzimas de (i), (ii) o (iii). Por ejemplo, un organismo microbiano que incluye (i) puede comprender cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa; un organismo microbiano que incluye (ii) puede comprender cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o un organismo microbiano que incluye (iii) puede comprender dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una CO deshidrogenasa y una H_2 hidrogenasa.

[0122] La invención provee adicionalmente un organismo microbiano no existente por naturaleza comprendiendo un organismo microbiano que tiene una vía de ácido 2-hidroxiisobutírico que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido 2-hidroxiisobutírico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido 2-hidroxiisobutírico; en donde las citadas enzimas de la vía de ácido 2-hidroxiisobutírico se seleccionan de las mostradas en Figura 16C; el citado organismo microbiano no existente por naturaleza comprendiendo además: (i) una vía de los TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, u opcionalmente isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, citril-CoA sintetasa o citril-CoA liasa; (ii) una vía de los TCA reductores comprendiendo por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o (iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores.

[0123] En una modalidad adicional, la invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza comprendiendo un organismo microbiano que tiene una vía de ácido 3-hidroxiisobutírico que incluye por lo menos un ácido

nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido 3-hidroxiisobutírico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido 3-hidroxiisobutírico; en donde las citadas enzimas de la vía de ácido 2-hidroxiisobutírico se seleccionan de las mostradas en Figura 16B; el citado organismo microbiano no existente por naturaleza comprendiendo además (i) una vía de los TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, u opcionalmente isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, citril-CoA sintetasa o citril-CoA liasa; (ii) una vía de los TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o (iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores.

[0124] Esta invención se dirige, en parte, a mejorar los rendimientos teóricos de productos usando gas de síntesis o sus componentes, hidrógeno, dióxido de carbono y monóxido de carbono, como una fuente de equivalentes reductores. En numerosas vías generadas mediante ingeniería genética, la realización de rendimientos de producto máximos, basados en material de alimentación de carbohidratos se dificulta por equivalentes reductores insuficientes o por la pérdida de equivalentes reductores y/o carbono a subproductos. Los rendimientos teóricos de varios productos en materiales de alimentación de carbohidratos se incrementan sustancialmente si el hidrógeno y/o el monóxido de carbono pueden suministrar equivalentes reductores suficientes. Por ejemplo, los rendimientos teóricos de MAA, 2-hidroxiisobutirato y 3-hidroxiisobutirato aumentan a 2 mol/mol de glucosa en la presencia de H_2.

[0125] Equivalentes reductores, o electrones, pueden extraerse de componentes de gas de síntesis tales como CO y H_2 usando enzimas monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH) e hidrogenasa, respectivamente. Los equivalentes reductores se pasan luego a aceptores tales como ferredoxinas oxidadas, quinonas oxidadas, citocromos oxidados, NADP+, agua, o peróxido de hidrógeno para formar ferredoxina reducida, quinonas reducidas, citocromos reducidos, NAD(P)H, H_2, o agua, respectivamente. Ferredoxina reducida y

NAD(P)H son particularmente útiles ya que pueden servir como portadores redox para varias enzimas de la vía de Wood-Ljungdahl y el ciclo de los TCA reductores.

[0126] Aquí, mostramos ejemplos específicos de cómo la disponibilidad redox adicional de CO y/o H_2 puede mejorar los rendimientos de productos reducidos tales como ácido metacrílico, 2-hidroxiisobutirato y 3-hidroxiisobutirato.

[0127] Ácido metacrílico (MAA), ácido 3-hidroxibutírico y ácido 2-hidroxiisobutírico son productos reducidos ejemplares. La producción de MAA mediante fermentación tiene un rendimiento teórico de 1,33 moles MAA por mol de glucosa. Se produce muy comúnmente a partir de la vía de cianohidrina de acetona (ACH) usando las materias primas acetona y cianuro de hidrógeno. El intermediario cianohidrina se convierte con ácido sulfúrico en un éster de sulfato de la metacrilamida, cuya hidrólisis produce bisulfato de amonio y MAA. Otros productores comienzan con un isobutileno o, equivalentemente, *terc*-butanol, el cual se oxida a metacroleína, y nuevamente se oxida a ácido metacrílico. MAA se esterifica entonces con metanol a MMA. El ácido metacrílico se usa industrialmente en la preparación de sus ésteres, conocidos colectivamente como metacrilatos, tales como metacrilato de metilo. Los metacrilatos tienen numerosos usos, muy notablemente en la fabricación de polímeros.

$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 1{,}33\ C_4H_6O_2 + 0{,}67\ CO_2 + 2\ H_2O$

[0128] Cuando se aplica la estrategia de los materiales de alimentación combinados a la producción de MAA, los equivalentes reductores generados del gas de síntesis aumentan el rendimiento teórico del MAA a partir de glucosa a 2 moles MAA por mol de glucosa con las vías detalladas en Figura 16A y 16B.

$1\ C_6H_{12}O_6 + 2\ CO_2 + 6\ H_2 \rightarrow 2\ C_4H_6O_2 + 6\ H_2O$

o

$1\ C_6H_{12}O_6 + 2\ CO + 4\ H_2 \rightarrow 2\ C_4H_6O_2 + 4\ H_2O$

[0129] Análogamente, la producción de ácido 3-hidroxiisobutírico mediante fermentación puede mejorarse por la estrategia de materiales de alimentación combinados. La producción de ácido 3-hidroxiisobutírico mediante fermentación tiene un rendimiento teórico de 1,33 mol ácido 3-hidroxiisobutírico por mol de glucosa.

$3\ C_6H_{12}O_6 \rightarrow 4\ C_4H_8O_3 + 2\ CO_2 + 2\ H_2O$

[0130] Cuando la estrategia de materiales de alimentación combinados se aplica a la producción de ácido 3-hidroxiisobutírico, los equivalentes reductores generados a partir de gas de síntesis pueden aumentar el rendimiento teórico del ácido 3-hidroxiisobutírico a partir de glucosa a 2 moles ácido 3-hidroxiisobutírico por mol de glucosa con las vías detalladas en Figura 16A y 16B.

$1\ C_6H_{12}O_6 + 2\ CO_2 + 6\ H_2 \rightarrow 2\ C_4H_8O_3 + 4\ H_2O$

[0131] Análogamente, la producción de ácido 2-hidroxiisobutírico mediante fermentación puede mejorarse por la estrategia de materiales de alimentación combinados. La producción de ácido 2-hidroxiisobutírico mediante fermentación tiene un rendimiento teórico de 1,33 mol ácido 2-hidroxiisobutírico por mol de glucosa.

$3\ C_6H_{12}O_6 \rightarrow 4\ C_4H_8O_3 + 2\ CO_2 + 2\ H_2O$

[0132] Cuando la estrategia de materiales de alimentación combinados se aplica a la producción de ácido 3-hidroxiisobutírico, los equivalentes reductores generados a partir de gas de síntesis pueden aumentar el rendimiento teórico del ácido 3-hidroxiisobutírico a partir de glucosa a 2 moles ácido 2-hidroxiisobutírico por mol de glucosa con las vías detalladas en Figura 16B.

$1\ C_6H_{12}O_6 + 2\ CO_2 + 6\ H_2 \rightarrow 2\ C_4H_8O_3 + 4\ H_2O$

[0133] La invención se dirige igualmente en parte a aumentar el flujo de carbono a través del intermediario de metabolismo central, acetil-CoA, en camino a las moléculas de producto mejorando la fijación de carbono mediante el ciclo de los TCA reductores. Moléculas de producto ejemplares incluyen ácido metacrílico y 2-hidroxiisobutirato, aunque dadas las enseñanzas y la orientación ofrecidas aquí, se reconocerá por un experto en arte que cualquier molécula de producto que tenga acetil-CoA como bloque estructural puede exhibir una producción mejorada mediante el flujo incrementado de carbono a través de acetil-CoA. La presente invención provee organismos microbianos no existentes por naturaleza que tienen uno o más genes exógenos que codifican enzimas que pueden catalizar varias transformaciones enzimáticas en camino a la acetil-CoA. En algunas modalidades, estas transformaciones enzimáticas son parte del ciclo de los ácido tricarboxílicos reductores (RTCA) y se usan para mejorar los rendimientos del producto a partir de material de alimentación de carbono a base de carbohidratos. En otras modalidades, estas transformaciones enzimáticas son parte de la vía de Wood-Ljungdahl.

[0134] El ciclo de los ácidos tricarboxílicos reductores (RTCA) para la fijación de CO_2 es una vía anabólica endoergónica de la asimilación de CO_2 que utiliza NAD(P)H y ATP. Un giro del ciclo de los RTCA asimila dos moles de CO_2 en un mol de acetil-CoA, o cuatro moles de CO_2 en un mol de oxaloacetato. Esta disponibilidad adicional de acetil-CoA mejora el rendimiento teórico máximo de las moléculas de producto a partir de material de alimentación de carbono a base de carbohidratos. Carbohidratos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, glucosa, sacarosa, xilosa, arabinosa y glicerol. Nótese que las vías para las moléculas de producto ejemplares descritas aquí proceden todas a través de acetil-CoA.

[0135] La producción de MAA a partir de azúcares mediante las vías ilustradas en Figuras 16C, 16D y 16E tienen un rendimiento máximo de 1 mol MAA por mol de glucosa consumida, en la ausencia de actividad del ciclo de los TCA reductores. La fijación de carbono por el ciclo de los TCA reductores aumenta el rendimiento de estas vías al rendimiento teórico máximo de MAA a partir de azúcares. Figuras 16C y 16D son distribuciones de flujo ejemplares que muestran cómo carbono adicional generado por el ciclo de los TCA reductores incrementa el rendimiento del ácido metacrílico producido por estas vías desde 1 mol/mol glucosa a 1,33 mol por mol de glucosa.

$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 1{,}33\ C_4H_6O_2 + 0{,}67\ CO_2 + 2\ H_2O$

[0136] En una modalidad, la invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo un organismo microbiano que tiene una vía de éster de metacrilato que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de éster de metacrilato expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de metacrilato; el citado organismo microbiano no existente por naturaleza comprendiendo además: (i) una vía de los TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, u opcionalmente isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, citril-CoA sintetasa o citril-CoA liasa; (ii) una vía de los TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H2 hidrogenasa; o (iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada

de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores; en donde la citada vía de éster de metacrilato comprende una alcohol transferasa o una enzima formadora de éster, y una deshidratasa. En un aspecto, la deshidratasa convierte un éster de 3-hidroxiisobutirato o un éster de 2-hidroxiisobutirato en el citado éster de metacrilato. En un aspecto, la alcohol transferasa convierte 3-hidroxiisobutiril-CoA en un éster de 3-hidroxiisobutirato o 2-hidroxiisobutiril-CoA en un éster de 2-hidroxiisobutirato.

[0137] En una modalidad, la invención provee un organismo microbiano, en donde el organismo microbiano comprende además una vía de éster de metacrilato que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de éster de metacrilato expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de metacrilato, la citada vía de éster de metacrilato comprendiendo una vía seleccionada de: (a) a 3-hidroxiisobutirato-CoA transferasa o una 3-hidroxiisobutirato-CoA sintetasa; una alcohol transferasa; y una deshidratasa; (b) una enzima formadora de un éster de 3-hidroxiisobutirato y una deshidratasa; (c) una 2-hidroxiisobutirato-CoA transferasa o una 2-hidroxiisobutirato-CoA sintetasa; una alcohol transferasa; y una deshidratasa; o (d) una enzima formadora de un éster de 2-hidroxiisobutirato y una deshidratasa. En otro aspecto, el organismo microbiano que incluye (i) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, ferredoxina, y combinaciones de las anteriores. En otro aspecto, el organismo microbiano que incluye (ii) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, y combinaciones de las anteriores.

[0138] En un aspecto, el organismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de ácido metacrílico. En otro aspecto, los dos ácidos nucleicos exógenos codifican una alcohol transferasa y una deshidratasa o, alternativamente, una enzima formadora de éster y una deshidratasa.

[0139] En una modalidad la invención proporciona un organismo microbiano no existente en la naturaleza, en donde el citado organismo microbiano que incluye (i)

comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa; en donde el citado organismo microbiano que incluye (ii) comprende cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o en donde el citado organismo microbiano que incluye (iii) comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una CO deshidrogenasa y una H_2 hidrogenasa.

[0140] En una modalidad, la invención posibilita un método para producir un éster de metacrilato que incluye cultivar el organismo microbiano no existente por naturaleza, como se describe aquí, bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir éster de metacrilato.

[0141] La invención se describe aquí con referencia general a la reacción metabólica, su reactivo o producto, o con referencia específica a uno o más ácidos nucleicos o genes que codifican una enzima asociada con, o que cataliza, o una proteína asociada con, la reacción metabólica referenciada, reactivo o producto. A menos que expresamente se especifique aquí lo contrario, los expertos en el arte entenderán que la referencia a una reacción constituye asimismo referencia a los reactivos y productos de la reacción. De manera similar, a menos que expresamente se especifique aquí lo contrario, la referencia a un reactivo o producto hace igualmente alusión a la reacción, y la referencia a cualquiera de estos constituyentes metabólicos alude asimismo al gen o genes que codifica(n) las enzimas que catalizan o a las proteínas involucradas en la reacción referenciada, reactivo o producto. De igual modo, dados los campos bien conocidos de la bioquímica metabólica, la enzimología y la genómica, una referencia aquí a un gen de referencia o ácido nucleico codificante constituye asimismo una referencia a la correspondiente enzima codificada, y la reacción que cataliza, o a una proteína asociada con las reacciones, así como a los reactivos y productos de la reacción.

[0142] Como se divulga aquí, el producto ácido metacrílico, así como otros intermediarios, son ácidos carboxílicos, los cuales pueden existir en varias formas ionizadas, incluyendo formas completamente protonadas, parcialmente protonadas, y completamente desprotonadas. En consecuencia, el sufijo "-ato," o la forma de ácido, pueden usarse indistintamente para describir tanto la forma de ácido libre así como cualquier forma desprotonada, en particular, puesto que se sabe que la forma ionizada depende del pH en el cual se encuentra el compuesto.

Se entiende que los productos carboxilato o intermediarios incluyen formas de éster de productos carboxilato o intermediarios de la vía, tales como ésteres O-carboxilato y S-carboxilato. O- y S-carboxilatos pueden incluir alquilo inferior, es decir carboxilatos de cadena recta o ramificada C_1 a C_6. Algunos de tales O- o S-carboxilatos incluyen, sin limitación, O- o S-carboxilatos de metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, i-propilo, sec-butilo, y *terc*-butilo, pentilo, hexilo, cualquiera de los cuales puede poseer además una insaturación, que proporcione por ejemplo, O- o S-carboxilatos de propenilo, butenilo, pentilo, y hexenilo. O-carboxilatos pueden ser el producto de una vía biosintética. O-carboxilatos ejemplares a los que se accede por vías biosintéticas pueden incluir, sin limitación, metacrilato de metilo, metacrilato de etilo, y metacrilato de n-propilo. Otros O-carboxilatos accesibles biosintéticamente pueden incluir grupos de cadena mediana a larga, es decir C_7-C_{22}, ésteres O-carboxilato derivados de alcoholes grasos, tales como alcoholes heptílicos, octílicos, nonílicos, decílicos, undecílicos, laurílicos, tridecílicos, miristílicos, pentadecílicos, cetílicos, palmitolílicos, heptadecílicos, estearílicos, nonadecílicos, araquidílicos, heneicosílicos, y behenílicos, cualquiera de los cuales puede ser opcionalmente ramificado y/o contener insaturaciones. Ésteres O-carboxilato pueden accederse igualmente mediante un proceso químico, tal como esterificación de un producto de ácido carboxílico libre o transesterificación de un O- o S-carboxilato. S-carboxilatos se ejemplifican por CoA S-ésteres, cisteinil S-ésteres, alquiltioésteres, y varios aril y heteroaril tioésteres. Adicionalmente, se ha propuesto la formación de ésteres de ácido metacrílico mediante un intermediario metacril-CoA (WO/2007/039415 y la Patente de los Estados Unidos No. 7,901,915). Metacril-CoA puede formarse a partir de metacrilato usando una metacril-CoA sintetasa como se describe en WO/2007/039415 y la Patente de los Estados Unidos No. 7,901,915 o aplicando una metacril-CoA transferasa (véase Figura 2 y Ejemplo III). Una metacrilil-CoA transferasa puede transferir una fracción (*moiety*) CoA a metacrilato de varios donadores CoA incluyendo, pero no limitados a, acetil-CoA, succinil-CoA, butiril-CoA, y propionil-CoA. Metacrilato puede formarse a partir de las vías presentadas en Figura 1 o las vías descritas en WO/2009/135074 o la publicación de los Estados Unidos 2009/0275096. Metacrilil-CoA puede producirse alternativamente de 2-hidroxiisobutiril-CoA, 3-hidroxiisobutiril-CoA, 3-hidroxiisobutirato, o isobutiril-CoA mediante 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, 3-hidroxiisobutirato deshidratasa, o isobutiril-CoA deshidrogenasa, como se describe en WO/2009/135074.

[0143] Por consiguiente, la invención provee adicionalmente organismos microbianos para producir ésteres de metacrilato. Tales organismos pueden comprender una vía de éster de metacrilato que incluye metacrilil-CoA transferasa. Tal organismo microbiano puede comprender además una vía de éster de metacrilato que incluye metacrilil-CoA sintetasa y/o alcohol transferasa (véase Figura 2 y Ejemplo III). Se entiende que tal organismo que produce un éster de metacrilato puede generarse mediante ingeniería genética para contener un organismo microbiano que incluya una vía de ácido metacrílico o metacrilil-CoA, incluyendo pero no limitada, a las vías de ácido metacrílico divulgadas aquí (véase Ejemplos I y V-XIV y Figuras 1-11) o descritas en WO2009/135074 o publicación de los Estados Unidos 2009/0275096. En consecuencia, cualquiera de los organismos microbianos divulgados, que producen ácido metacrílico, puede comprender además por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de éster de metacrilato expresada en una cantidad suficiente para producir éster de metacrilato, la vía de éster de metacrilato comprendiendo metacrilil-CoA sintetasa, metacrilil-CoA transferasa y alcohol transferasa. La conversión química y enzimática ejemplar de ácido metacrílico en ésteres de metacrilato se describe en el Ejemplo IV.

[0144] Por lo tanto, la invención provee adicionalmente un organismo microbiano que contiene una vía de éster de metacrilato y comprende además una vía de ácido metacrílico divulgada aquí, incluyendo las vías de ácido metacrílico descritas en Figuras 1 y 3-11 y en los Ejemplos I y V-XIV. En una modalidad particular, el organismo microbiano que contiene una vía de éster de metacrilato comprende además una vía de ácido metacrílico seleccionada de 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; metilmalonil-CoA mutasa, alcohol/aldehído deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, alcohol/aldehído deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-amino-2-metilpropionato transaminasa, y 3-amino-2-metilpropionato amoníaco liasa; metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-amino-2-metilpropionato transaminasa, y 3-amino-2-metilpropionato amoníaco liasa; 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA

hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; aspartato aminotransferasa, glutamato mutasa, 3-metilaspartasa, y mesaconato descarboxilasa; alfa-ketoglutarato reductasa, 2-hidroxiglutamato mutasa, 3-metilmalato deshidratasa, y mesaconato descarboxilasa; acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y metacrilil-CoA transferasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA sintetasa; acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, enoil-CoA hidratasa, y 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, vinilacetil-CoA □-isomerasa, crotonasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y cualquiera de metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA transferasa; y 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa (véase Ejemplos V-XIV).

[0145] Organismos microbianos ejemplares no existentes por naturaleza, capaces de producir ácido metacrílico, se divulgan aquí. Por ejemplo, se provee una vía de ácido metacrílico en la cual succinil-CoA es un precursor (véase Ejemplos V-VI, Figuras 3 y 4). En una modalidad, un organismo microbiano no existente por naturaleza tiene una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa (véase Ejemplos V y VI y Figura 3). En otra modalidad, un organismo microbiano no existente por naturaleza tiene una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, alcohol/aldehído deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa (véase Ejemplo V). Adicionalmente, un organismo microbiano no existente por naturaleza puede tener una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de

ácido metacrílico comprendiendo metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-amino-2-metilpropionato transaminasa, y 3-amino-2-metilpropionato amoníaco liasa (véase Ejemplos VI y Figura 4).

[0146] Adicionalmente se provee un organismo microbiano no existente por naturaleza que contiene una vía de ácido metacrílico que tiene 4-hidroxibutiril-CoA como un precursor. Una tal modalidad es un organismo microbiano no existente por naturaleza que tiene una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa (véase Ejemplos VII y Figura 5). Alternativamente, la vía podría incluir 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa; y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa.

[0147] Se proporciona igualmente un organismo microbiano no existente por naturaleza que contiene una vía de ácido metacrílico que tiene alfa-ketoglutarato como un precursor. Una tal modalidad es un organismo microbiano no existente por naturaleza que tiene una vía de ácido metacrílico que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo aspartato aminotransferasa, glutamato mutasa, 3-metilaspartasa, y mesaconato descarboxilasa (véase Ejemplos VIII y Figura 6). En todavía otra modalidad, un organismo microbiano no existente por naturaleza tiene una vía de ácido metacrílico que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo alfa-ketoglutarato reductasa, 2-hidroxiglutamato mutasa, 3-metilmalato deshidratasa, y mesaconato descarboxilasa (véase Ejemplos IX y Figura 7).

[0148] En todavía otra modalidad, un organismo microbiano no existente por naturaleza que contiene una vía de ácido metacrílico tiene acetil-CoA como un precursor. Por ejemplo, un organismo microbiano no existente por naturaleza puede tener una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de

ácido metacrílico comprendiendo acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y metacrilil-CoA transferasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA sintetasa (véase Ejemplos X y Figura 8). En otra modalidad, un organismo microbiano no existente por naturaleza tiene una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, enoil-CoA hidratasa, y 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa (véase Ejemplo X).

[0149] En modalidades adicionales, organismos microbianos no existentes por naturaleza pueden contener un ácido metacrílico que tiene 4-hidroxibutiril-CoA como un precursor. Por ejemplo, un organismo microbiano no existente por naturaleza tiene una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa; vinilacetil-CoA Δ-isomerasa; crotonasa; 3-hidroxibutiril-CoA mutasa; 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa; y metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA transferasa (véase Ejemplo XIV y Figura 8).

[0150] En todavía otra modalidad, un organismo microbiano no existente por naturaleza tiene una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa, isobutiril-CoA mutasa, isobutiril-CoA deshidrogenasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa (véase Ejemplo XI y Figura 9).

[0151] Se proporciona además un organismo microbiano no existente por naturaleza que contiene una vía de ácido metacrílico que tiene piruvato como un precursor. Por ejemplo, un organismo microbiano no existente por naturaleza puede tener una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de

ácido metacrílico comprendiendo lactato deshidrogenasa, lactato-CoA transferasa, lactoil-CoA deshidratasa, acil-CoA deshidrogenasa, propionil-CoA carboxilasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa (véase Ejemplo XII y Figura 10).

[0152] Se provee igualmente un organismo microbiano no existente por naturaleza que contiene una vía de ácido metacrílico que tiene 2-ketoisovalerato como un precursor. Por ejemplo, un organismo microbiano no existente por naturaleza puede tener una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo valina aminotransferasa, 2-ketoisovalerato deshidrogenasa, isobutiril-CoA deshidrogenasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa (véase Ejemplo XIII y Figura 11). Tal vía de ácido metacrílico puede contener además valina aminotransferasa, la cual convierte valina en 2-ketoisovalerato (Figura 11). Adicionalmente, tal vía de ácido metacrílico puede contener asimismo enzimas que convierten piruvato en 2-ketoisovalerato (Figura 11), tal como acetolactato sintasa, acetohidroxiácido isomerorreductasa y dihidroxiácido deshidratasa (véase Ejemplo XIII).

[0153] La invención proporciona asimismo un organismo microbiano no existente por naturaleza que tiene una vía de éster de metacrilato que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de éster de metacrilato expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de metacrilato, la vía de éster de metacrilato comprendiendo una metacrilil-CoA transferasa y una alcohol transferasa. En una modalidad adicional, tal vía de éster de metacrilato puede comprender además metacrilil-CoA sintetasa. En una modalidad particular, el organismo microbiano que tiene una vía de éster de metacrilato puede comprender dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una metacrilil-CoA y alcohol transferasa. En todavía una modalidad adicional, la invención provee un organismo microbiano que tiene una vía de éster de metacrilato que puede comprender tres ácidos nucleicos exógenos que codifican una metacrilil-CoA sintetasa, metacrilil-CoA transferasa, y alcohol transferasa.

[0154] Los organismos microbianos no existentes por naturaleza de la invención pueden producirse introduciendo ácidos nucleicos expresables que codifican una o más de las enzimas o proteínas que participan en una o más vías biosintéticas de ácido metacrílico. Dependiendo del organismo microbiano hospedero escogido para la biosíntesis, pueden expresarse ácidos nucleicos para

algunas o todas de una vía biosintética de ácido metacrílico particular. Por ejemplo, si un hospedero elegido es deficiente en una o más enzimas o proteínas para una vía biosintética deseada, entonces ácidos nucleicos expresables para la enzima(s) o proteína(s) deficiente(s) se introducen en el hospedero para expresión exógena subsiguiente. Alternativamente, si el hospedero elegido exhibe expresión endógena de algunos genes de la vía, pero es deficiente en otros, entonces se necesita un ácido nucleico codificante de la enzima(s) o proteína(s) deficiente(s) para lograr la biosíntesis del ácido metacrílico. En consecuencia, un organismo microbiano no existente por naturaleza de la invención puede producirse introduciendo actividades de una enzima o proteína exógena para obtener una vía biosintética deseada o una vía biosintética deseada puede obtenerse introduciendo una o más actividades de una enzima o proteína exógena que, junto con una o más enzimas o proteínas endógenas, produce un producto deseado tal como ácido metacrílico.

[0155] Organismos microbianos hospederos pueden seleccionarse de, y los organismos microbianos no existentes por naturaleza generarse en, por ejemplo, bacterias, levadura, hongos o cualquiera de una variedad de otros microorganismos aplicables a los procesos de fermentación. 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*. Levaduras u hongos ejemplares incluyen especies seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces marxianus, Aspergillus terreus, Aspergillus niger*, *Pichia pastoris, Rhizopus arrhizus, Rhizobus oryzae*, *Yarrowia lipolytica*, y similares. *E. coli* es un organismo hospedero particularmente útil puesto que es un organismo microbiano perfectamente caracterizado, apropiado para ingeniería genética. Otros organismos hospederos particularmente útiles incluyen levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae*. Se entiende que cualquier organismo hospedero microbiano apropiado puede usarse para introducir modificaciones metabólicas y/o genéticas para producir un producto deseado.

[0156] Dependiendo de los constituyentes de la vía biosintética del ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato de un organismo microbiano hospedero seleccionado, los organismos microbianos no

existentes por naturaleza de la invención incluirán por lo menos un ácido nucleico que codifica una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato expresado exógenamente y hasta todos los ácidos nucleicos codificantes de una o más vías biosintéticas de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. Por ejemplo, la biosíntesis de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato puede establecerse en un hospedero deficiente en una enzima o proteína de la vía mediante expresión exógena del correspondiente ácido nucleico codificante. En un hospedero deficiente en todas las enzimas o proteínas de una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, puede incluirse la expresión exógena de todas las enzimas o proteínas en la vía, aunque se entiende que todas las enzimas o proteínas de una vía pueden expresarse incluso si el hospedero contiene por lo menos una de las enzimas o proteínas de la vía. Por ejemplo, puede incluirse la expresión exógena de todas las enzimas o proteínas en una vía para la producción de ácido metacrílico, tal como citramalato sintasa (A), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (1) A/B/C); citramalato sintasa (A), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), citraconato isomerasa (G), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (2) A/B/G/H); citramalato sintasa (A), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F) citraconato isomerasa (G), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (3) A/F/G/C); citramalato sintasa (A), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (4) A/F/H); citramalil-CoA liasa (D), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (5) D/E/B/C); citramalil-CoA liasa (D), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), citraconato isomerasa (G), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (6) D/E/B/G/H); citramalil-CoA liasa (D), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (7) D/E/F/H); citramalil-CoA liasa (D), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F), citraconato isomerasa (G), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (8) D/E/F/G/C); aconitato descarboxilasa (I), itaconato isomerasa (J), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (9) I/J/C); aconitato descarboxilasa (I), itaconato isomerasa (J),

citraconato isomerasa (G), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (10) I/J/G/H); aconitato descarboxilasa (I), itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (L), citramalil-CoA deshidratasa (K), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (11) I/L/K/E/B/C); aconitato descarboxilasa (I), itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (L), citramalil-CoA deshidratasa (K), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), citraconato isomerasa (G), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (12) I/L/K/E/B/G/H); aconitato descarboxilasa (I), itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (L), citramalil-CoA deshidratasa (K), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (13) I/L/K/E/F/H); y aconitato descarboxilasa (I), itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (L), citramalil-CoA deshidratasa (K), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F), citraconato isomerasa (G), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (14) I/L/K/E/F/G/C).

[0157] Dadas las enseñanzas y la orientación ofrecidas aquí, los expertos en el arte entenderán que el número de ácidos nucleicos codificantes a introducir en una forma expresable serán, por lo menos, equivalentes a las deficiencias de la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato del organismo microbiano hospedero seleccionado. Por consiguiente, un organismo microbiano no existente por naturaleza de la invención puede tener uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o siete, dependiendo de la vía, incluyendo hasta todos los ácidos nucleicos que codifican las enzimas o proteínas que constituyen una vía biosintética de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato divulgada aquí. En algunas modalidades, los organismos microbianos no existentes por naturaleza pueden incluir asimismo otras modificaciones genéticas que facilitan u optimizan la biosíntesis de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, o que confieren otras funciones útiles al organismo microbiano hospedero. Tal otra funcionalidad puede incluir, por ejemplo, aumento de la síntesis de una o más de los precursores de la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato tales como acetil-CoA, piruvato o aconitato.

[0158] Generalmente, se selecciona un organismo microbiano hospedero tal que produzca el precursor de una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, ya sea como una molécula producida naturalmente o como un producto generado mediante ingeniería genética que facilite la producción *de novo* de un precursor deseado o la producción incrementada de un precursor producido naturalmente por el organismo microbiano hospedero. Por ejemplo, aconitato, acetil-CoA, y piruvato se producen naturalmente en un organismo hospedero tal como *E. coli*. Un organismo hospedero puede generarse mediante ingeniería genética para aumentar la producción de un precursor, como se divulga aquí. Adicionalmente, un organismo microbiano, que se ha generado mediante ingeniería genética para producir un precursor deseado, puede usarse como un organismo hospedero y seguirse generando mediante ingeniería genética para expresar enzimas o proteínas de una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato.

[0159] En algunas modalidades, un organismo microbiano no existente por naturaleza de la invención se genera de un hospedero que contiene la capacidad enzimática de sintetizar ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. En esta modalidad específica puede ser útil aumentar la síntesis o acumulación de un producto de la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato para, por ejemplo, dirigir las reacciones de la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato hacia la producción de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. La síntesis incrementada o acumulación puede realizarse, por ejemplo, por sobreexpresión de ácidos nucleicos que codifican una o más de las enzimas o proteínas de la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato descritas aquí. La sobreexpresión de la enzima o enzimas y/o proteína o proteínas de la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato puede ocurrir, por ejemplo, mediante expresión exógena del gen o genes endógenos, o mediante expresión exógena del gen o genes heterólogos. En consecuencia, organismos existentes en la naturaleza pueden generarse para ser los organismos microbianos no existentes por naturaleza de la invención, por ejemplo, que produzcan ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, mediante la sobreexpresión de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete, dependiendo del número de enzimas en la vía, es decir, hasta

todos los ácidos nucleicos que codifican las enzimas o proteínas de la vía biosintética del ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. Adicionalmente, un organismo no existente por naturaleza puede generarse mediante mutagénesis de un gen endógeno que tiene como resultado un aumento en la actividad de una enzima en la vía biosintética del ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato.

[0160] En modalidades particularmente útiles, se emplea la expresión exógena de los ácidos nucleicos codificantes. La expresión exógena confiere la capacidad de hacer a la medida la expresión y/o los elementos reguladores al hospedero y la aplicación para lograr un nivel de expresión deseada que se controla por el usuario. Sin embargo, la expresión endógena también puede utilizarse en otras modalidades tales como eliminar un efector regulador negativo o inducción del promotor del gen cuando conectado a un promotor inducible u otro elemento regulador. En consecuencia, un gen endógeno que tiene un promotor inducible existente en la naturaleza puede regularse por aumento proporcionando el agente inductor apropiado, o la región reguladora de un gen endógeno puede generarse mediante ingeniería genética para incorporar un elemento regulador inducible, permitiendo en esa forma la regulación de una expresión creciente de un gen endógeno en un tiempo deseado. Análogamente, puede incluirse un promotor inducible como un elemento regulador para un gen exógeno introducido en un organismo microbiano no existente por naturaleza.

[0161] Se entiende que, en los métodos de la invención, cualquiera de los uno o más ácidos nucleicos exógenos puede introducirse en un organismo microbiano para producir un organismo microbiano no existente por naturaleza de la invención. Los ácidos nucleicos pueden introducirse así para conferir, por ejemplo, una vía biosintética de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato en el organismo microbiano. Alternativamente, ácidos nucleicos codificantes pueden introducirse para producir un organismo microbiano intermediario que tiene la capacidad biosintética de catalizar algunas de las reacciones requeridas para conferir capacidad biosintética de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. Por ejemplo, un organismo microbiano no existente por naturaleza que tiene una vía biosintética de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato puede comprender por lo menos dos ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas o proteínas deseadas, tales como la combinación de citramalato sintasa y citraconato descarboxilasa; citraconato isomerasa y mesaconato descarboxilasa; o

itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa e itaconato isomerasa, y similares. Por consiguiente, se entiende que cualquier combinación de dos o más enzimas de una vía biosintética puede incluirse en un organismo microbiano no existente por naturaleza de la invención. Análogamente, se entiende que cualquier combinación de tres o más enzimas de una vía biosintética puede incluirse en un organismo microbiano no existente por naturaleza de la invención, por ejemplo, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), citraconato isomerasa y mesaconato descarboxilasa; citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa y citramalato deshidratasa; o aconitato descarboxilasa, itaconato isomerasa y mesaconato descarboxilasa, y así sucesivamente, como se desee, en la medida en que la combinación de enzimas y/o proteínas de la vía biosintética deseada tenga como resultado la producción del correspondiente producto deseado. Análogamente, cualquier combinación de cuatro, por ejemplo, citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) y mesaconato descarboxilasa; aconitato descarboxilasa, itaconato isomerasa, citraconato isomerasa y mesaconato descarboxilasa, y similares, o más enzimas de una vía biosintética, como se divulga aquí, puede incluirse en un organismo microbiano no existente por naturaleza de la invención, como se desee, incluyendo hasta todas las enzimas en una vía, en la medida en que la combinación de enzimas de la vía biosintética deseada tenga como resultado la producción del correspondiente producto deseado.

[0162] Aparte de la biosíntesis de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato como se describe aquí, los organismos microbianos no existentes por naturaleza y los métodos de la invención pueden utilizarse asimismo en varias combinaciones entre sí y con otros organismos microbianos y métodos bien conocidos en el arte para lograr la biosíntesis de productos por otras vías. Por ejemplo, una alternativa para producir ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato distinta del uso de los productores de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato es mediante la adición de otro organismo microbiano capaz de convertir un intermediario de la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato en ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. Un procedimiento tal incluye, por ejemplo, la fermentación de un organismo microbiano que produce un intermediario de la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-

hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. El intermediario de la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato puede usarse entonces como sustrato para un segundo organismo microbiano que convierte el intermediario de la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato en ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. El intermediario de la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato puede agregarse directamente a otro cultivo del segundo organismo, o el cultivo original de los productores del intermediario de la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato puede agotarse de estos organismos microbianos, por ejemplo, mediante separación de células, y luego la adición subsiguiente del segundo organismo al caldo de fermentación puede utilizarse para producir el producto final, sin pasos de purificación del intermediario.

[0163] En otras modalidades, los organismos microbianos no existentes por naturaleza y los métodos de la invención pueden ensamblarse en una amplia variedad de subvías para lograr la biosíntesis de, por ejemplo, ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. En estas modalidades, vías biosintéticas para un producto deseado de la invención pueden separarse en diferentes organismos microbianos, y los diferentes organismos microbianos pueden co-cultivarse para producir el producto final. En tal esquema biosintético, el producto de un primer organismo microbiano es el sustrato para un segundo organismo microbiano hasta que se sintetice el producto final. Por ejemplo, la biosíntesis de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato puede llevarse a cabo construyendo un organismo microbiano que contiene vías biosintéticas para la conversión de un intermediario de la vía en otro intermediario de la vía o el producto. Alternativamente, ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato pueden producirse asimismo biosintéticamente a partir de organismos microbianos mediante co-cultivo o co-fermentación usando dos organismos en el mismo tanque, donde el primer organismo microbiano produce un intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, y el segundo organismo microbiano convierte el intermediario en ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato.

[0164] Dadas las enseñanzas y la orientación ofrecidas aquí, los expertos en el arte entenderán que existe una amplia variedad de combinaciones y permutaciones para los organismos microbianos no existentes por naturaleza y los métodos de la invención junto con organismos microbianos, con el co-cultivo de otros organismos microbianos no existentes por naturaleza que tienen subvías y con combinaciones de otros procedimientos químicos y/o bioquímicos bien conocidos en el arte para producir ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato.

[0165] Fuentes de ácidos nucleicos codificantes para una enzima o proteína de la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato pueden incluir, por ejemplo, cualquier especie en la que el producto del gen codificado es capaz de catalizar la reacción referenciada. Tales especies comprenden organismos procariotas y eucariotas incluyendo, pero no limitados a, bacterias, comprendidas arqueas y eubacterias, y eucariotes, incluyendo levadura, planta, insecto, animal, y mamífero, incluyendo humano. Especies ejemplares para tales fuentes incluyen, por ejemplo, la especie *Escherichia*, incluyendo *Escherichia coli, Escherichia fergusonii, Methanocaldococcus jannaschii, Leptospira interrrogans, Geobacter sulfurreducens, Chloroflexus aurantiacus, Roseiflexus sp. RS-1, Chloroflexus aggregans, Achromobacter xylosoxydans,* la especie *Clostridia*, incluyendo *Clostridium kluyveri, Clostridium symbiosum, Clostridium acetobutylicum, Clostridium saccharoperbutylacetonicum, Clostridium ljungdahlii, Trichomonas vaginalis G3, Trypanosoma brucei, Acidaminococcus fermentans,* la especie *Fusobacterium*, incluyendo *Fusobacterium nucleatum, Fusobacterium mortiferum, Corynebacterium glutamicum, Rattus norvegicus, Homo sapiens,* la especie *Saccharomyces*, incluyendo *Saccharomyces cerevisiae,* la especie *Aspergillus*, incluyendo *Aspergillus terreus, Aspergillus oryzae, Aspergillus niger, Gibberella zeae, Pichia stipitis,* la especie *Mycobacterium*, incluyendo *Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium avium,* incluyendo *subsp. pratuberculosis, Salinispora arenicola,* la especie *Pseudomonas*, incluyendo *Pseudomonas sp. CF600, Pseudomonas putida, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa,* la especie *Ralstonia*, incluyendo *Ralstonia eutropha, Ralstonia eutropha JMP134, Ralstonia eutropha H16, Ralstonia pickettii, Lactobacillus plantarum, Klebsiella oxytoca,* la especie *Bacillus*, incluyendo *Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, Bacillus megaterium, Pedicoccus pentosaceus,* la especie *Chlorofexus*, incluyendo *Chloroflexus aurantiacus, Chloroflexus aggregans, Rhodobacter sphaeroides,*

Methanocaldococcus jannaschii, Leptospira interrrogans, Candida maltosa, la especie *Salmonella*, incluyendo *Salmonella enterica serovar Typhimurium,* la especie *Shewanella*, incluyendo *Shewanella oneidensis, Shewanella sp.* MR-4, *Alcaligenes faecalis, Geobacillus stearothermophilus, Serratia marcescens, Vibrio cholerae, Eubacterium barkeri, Bacteroides capillosus, Archaeoglobus fulgidus, Archaeoglobus fulgidus, Haloarcula marismortui, Pyrobaculum aerophilum str. IM2,* la especie *Rhizobium*, incluyendo *Rhizobium leguminosarum*, así como otras especies ejemplares divulgadas aquí o disponibles como organismos fuente para genes correspondientes. Sin embargo, con la secuencia del genoma completo disponible para actualmente más de 550 especies (con más de la mitad de estas disponibles en bases de datos públicas tales como el NCBI - *Centro Nacional para la Información Biotecnológica*), incluyendo 395 genomas de microorganismos y una variedad de genomas de levadura, hongos, plantas, y genomas de mamíferos, la identificación de genes que codifican la actividad biosintética del ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato requerida para uno o más genes en especies relacionadas o distantes, incluyendo por ejemplo, desplazamientos de genes homólogos, ortólogos, parálogos y no ortólogos de genes conocidos, y el intercambio de alteraciones genéticas entre organismos es rutinaria y bien conocida en el arte. Por consiguiente, las alteraciones metabólicas que permiten la biosíntesis de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato descritas aquí con referencia a un organismo particular tal como *E. coli* pueden aplicarse fácilmente a otros microorganismos, incluyendo organismos procariotas y eucariotas de manera similar. Dadas las enseñanzas y la orientación ofrecidas aquí, los expertos en el arte sabrán que una alteración metabólica ejemplificada en un organismo puede aplicarse igualmente a otros organismos.

[0166] En algunos casos, tales como cuando una vía biosintética alternativa de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato existe en una especie no relacionada, la biosíntesis de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato puede conferirse a la especie hospedera, por ejemplo, mediante expresión exógena de un parálogo o parálogos de la especie no relacionada, que cataliza una reacción metabólica similar, pero no idéntica, para reemplazar la reacción referenciada. Debido a que existen ciertas diferencias entre redes metabólicas entre diferentes organismos, los expertos en el arte entenderán que la utilización de genes efectivos entre diferentes organismos puede diferir. No obstante, dadas las enseñanzas y la

orientación ofrecidas aquí, los expertos en el arte entenderán igualmente que las enseñanzas y los métodos de la invención pueden aplicarse a todos los organismos microbianos usando las alteraciones metabólicas afines a las ejemplificadas aquí para construir un organismo microbiano en una especie de interés, que sintetizará ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato.

[0167] Métodos para construir y analizar los niveles de expresión de un hospedero no existente por naturaleza, que produce ácido metacrílico-, éster de metacrilato-, 3-hidroxiisobutirato- y/o 2-hidroxiisobutirato, pueden realizarse, por ejemplo, por métodos recombinantes y de detección bien conocidos en el arte. Tales métodos pueden encontrarse descritos en, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001); y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999).

[0168] Secuencias de ácido nucleicos exógenos involucrados en una vía para la producción de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato pueden introducirse de manera estable o transitoria en una célula hospedera usando técnicas bien conocidas en el arte incluyendo, pero no limitadas a, conjugación, electroporación, transformación química, transducción, transfección, y transformación por ultrasonido. Para la expresión exógena en *E. co*li u otras células procariotas, algunas secuencias de ácidos nucleicos en los genes de ADNc de ácidos nucleicos eucariotas pueden codificar señales de focalización (*targeting signals*) tales como una señal mitocondrial N-terminal u otra señal de focalización, que pueden eliminarse antes de la transformación en células hospederas procariotas, si se desea. Por ejemplo, la eliminación de una secuencia líder mitocondrial llevó a una expresión creciente en *E. coli* (Hoffmeister et al., *J. Biol. Chem.* 280:4329-4338 (2005)). Para la expresión exógena en levadura u otras células eucariotas, pueden expresarse genes en el citosol sin la adición de una secuencia líder, o pueden dirigirse a la mitocondria u otros organelos, o dirigirse para secreción, mediante la adición de una secuencia de direccionamiento apropiada (*a suitable targeting sequence*), tal como una señal de direccionamiento mitocondrial o secreción apropiada para células hospederas. En consecuencia, se entiende que modificaciones apropiadas a una secuencia de ácido nucleico, para eliminar o incluir una secuencia de direccionamiento, pueden incorporarse en una secuencia de ácido nucleico exógeno para impartir propiedades deseables. Más aún, los genes pueden someterse a optimización de

codones con técnicas bien conocidas en el arte para conseguir la expresión optimizada de las proteínas.

[0169] Un vector de expresión o vectores puede(n) construirse para incluir uno o más ácidos nucleicos codificantes de la vía biosintética de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, como se ejemplifica aquí, conectados operacionalmente a secuencias de control de expresión en el organismo hospedero. Vectores de expresión aplicables para uso en los organismos microbianos hospederos de la invención comprenden, por ejemplo, plásmidos, vectores bacteriófagos, vectores víricos, episomas y cromosomas artificiales, incluyendo vectores y secuencias de selección o marcadores operables para integración estable en un cromosoma hospedero. Adicionalmente, los vectores de expresión pueden incluir uno o más genes marcadores seleccionables y secuencias apropiadas de control de expresión. Pueden incluirse igualmente genes marcadores seleccionables que, por ejemplo, proporcionen resistencia a antibióticos o toxinas, complementen deficiencias auxotróficas, o suministren nutrientes críticos no existentes en el medio de cultivo. Secuencias de control de expresión pueden incluir promotores constitutivos e inducibles, potenciadores de transcripción, terminadores de transcripción, y similares, los cuales son bien conocidos en el arte. Cuando tienen que co-expresarse dos o más ácidos nucleicos codificantes exógenos, los dos ácidos nucleicos pueden insertarse, por ejemplo, en un solo vector de expresión o en vectores de expresión separados. Para expresión de un solo vector, los ácidos nucleicos codificantes pueden conectarse operacionalmente a una secuencia de control de expresión común o conectarse a diferentes secuencias de control de expresión, tales como un promotor inducible y un promotor constitutivo. La transformación de secuencias de ácido nucleico exógeno involucradas en una vía sintética o metabólica puede confirmarse usando métodos bien conocidos en el arte. Tales métodos incluyen, por ejemplo, análisis de ácidos nucleicos tales como Northern blots o reacción en cadena de la polimerasa (PCR - *polymerase chain reaction*) amplificación de ARNm, o inmunotransferencia para expresión de productos génicos, u otros métodos analíticos apropiados para analizar la expresión de una secuencia de ácido nucleico introducida, o su correspondiente producto de genes. Se entiende por los expertos en el arte que el ácido nucleico exógeno se expresa en una cantidad suficiente para producir el producto deseado, y se entiende asimismo que pueden optimizarse los niveles de expresión para

obtener una expresión suficiente, usando métodos bien conocidos en el arte y como se divulga aquí.

[0170] La invención facilita adicionalmente métodos de producir ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato usando los organismos microbianos de la invención que contienen una vía de ácido metacrílico. En una modalidad particular, la invención provee un método para producir ácido metacrílico cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo un organismo microbiano que tiene una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo citramalato sintasa (A), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (1) A/B/C), bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico. Como se divulga aquí, el organismo microbiano puede contener más de un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, incluyendo hasta todas las enzimas en una vía, por ejemplo, tres ácidos nucleicos exógenos codifican citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), y citraconato descarboxilasa.

[0171] En una modalidad particular, un organismo microbiano no existente por naturaleza de la invención, que produce MAA, puede tener por lo menos un ácido nucleico exógeno que es un ácido nucleico heterólogo. En otra modalidad el organismo microbiano no existente por naturaleza, que produce MAA, puede estar en un medio de cultivo sustancialmente anaerobio.

[0172] En otra modalidad, la invención permite un método para producir ácido metacrílico cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza que comprende una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo citramalato sintasa (A), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), citraconato isomerasa (G), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (2) A/B/G/H), bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico. En todavía otra modalidad, la invención facilita un método para producir ácido metacrílico cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno

que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo citramalato sintasa (A), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F) citraconato isomerasa (G), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (3) A/F/G/C), bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico.

[0173] En una modalidad adicional, la invención provee un método para producir ácido metacrílico cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo citramalato sintasa (A), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (4) A/F/H), bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico. En todavía una modalidad adicional, la invención proporciona un método para producir ácido metacrílico cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo citramalil-CoA liasa (D), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (5) D/E/B/C), bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico.

[0174] En una modalidad adicional, la invención ofrece un método para producir ácido metacrílico cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo citramalil-CoA liasa (D), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), citraconato isomerasa (G), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (6) D/E/B/G/H), bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico. En todavía otra modalidad, la invención facilita un método para producir ácido metacrílico cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo una vía de ácido

metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo citramalil-CoA liasa (D), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (7) D/E/F/H), bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico.

[0175] En otra modalidad, la invención provee un método para producir ácido metacrílico cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo citramalil-CoA liasa (D), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F), citraconato isomerasa (G), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (8) D/E/F/G/C), bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico. Adicionalmente, la invención establece un método para producir ácido metacrílico cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo aconitato descarboxilasa (I), itaconato isomerasa (J), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (9) I/J/C), bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico.

[0176] En todavía una modalidad adicional, la invención indica un método para producir ácido metacrílico cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo aconitato descarboxilasa (I), itaconato isomerasa (J), citraconato isomerasa (G), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (10) I/J/G/H), bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico. En una modalidad adicional, la invención señala un método para producir ácido metacrílico cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo una vía de ácido

metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo aconitato descarboxilasa (I), itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (L), citramalil-CoA deshidratasa (K), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (11) I/L/K/E/B/C), bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico.

[0177] La invención facilita asimismo un método para producir ácido metacrílico cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo aconitato descarboxilasa (I), itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (L), citramalil-CoA deshidratasa (K), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (B), citraconato isomerasa (G), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (12) I/L/K/E/B/G/H), bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico. En todavía una modalidad adicional, la invención indica un método para producir ácido metacrílico cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo un organismo microbiano que tiene una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo aconitato descarboxilasa (I), itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (L), citramalil-CoA deshidratasa (K), citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F), y mesaconato descarboxilasa (H) (Figura 1, vía (13) I/L/K/E/F/H), bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico. En una modalidad adicional, la invención provee un método para producir ácido metacrílico cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo una vía de ácido metacrílico que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la vía de ácido metacrílico comprendiendo aconitato descarboxilasa (I), itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (L), citramalil-CoA deshidratasa (K), citramalil-

CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa (E), citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato) (F), citraconato isomerasa (G), y citraconato descarboxilasa (C) (Figura 1, vía (14) I/L/K/E/F/G/C), bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico.

[0178] La invención señala asimismo un método para producir un éster de metacrilato cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir un éster de 3-hidroxiisobutirato, en donde el organismo microbiano no existente por naturaleza incluye un ácido nucleico exógeno que codifica una alcohol transferasa o una enzima formadora de un éster de 3-hidroxiisobutirato, expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de 3-hidroxiisobutirato, y deshidratar químicamente el éster de 3-hidroxiisobutirato para producir un éster de metacrilato como se ejemplifica en Figura 28 y Figura 30, Pasos 6 y 7. En otra modalidad, la invención señala un método para producir metacrilato de metilo cultivando un organismo microbiano no existente por naturaleza bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir metil-3-hidroxiisobutirato, en donde el organismo microbiano no existente por naturaleza incluye un ácido nucleico exógeno que codifica una alcohol transferasa o una enzima formadora de éster, expresada en una cantidad suficiente para producir metil-3-hidroxiisobutirato, y deshidratar químicamente el citado metil-3-hidroxiisobutirato para producir metacrilato de metilo como se ejemplifica en Figura 30, Pasos 6 y 7. En algunos aspectos de la invención, los métodos para producir un éster de metacrilato o metacrilato de metilo, como se divulga aquí, incluyen además que el organismo microbiano no existente por naturaleza contenga por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica enzimas de la vía de 3-hidroxiisobutiril-CoA como se describe en Figuras 1-11 y 28-30 o cualquier combinación de las anteriores. En algunos aspectos, la invención contempla que el ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo. En algunos aspectos, la invención estipula que el organismo microbiano no existente por naturaleza esté en un medio de cultivo sustancialmente anaerobio.

[0179] En una modalidad, la invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza, comprendiendo un organismo microbiano que tiene una vía de metacrilato de metilo que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de metacrilato de metilo, expresada en una cantidad suficiente para producir metacrilato de metilo; el citado organismo microbiano no existente por naturaleza comprendiendo además: (i) una vía de los

TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, u opcionalmente isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, citril-CoA sintetasa o citril-CoA liasa; (ii) una vía de los TCA reductores comprendiendo por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o (iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores; en donde la citada vía de metacrilato de metilo comprende una alcohol transferasa o una enzima formadora de éster, y una deshidratasa. En otro aspecto, la invención facilita un método en donde el organismo microbiano que incluye (i) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, ferredoxina, y combinaciones de las anteriores. En otro aspecto, la invención proporciona un método en donde el organismo microbiano que incluye (ii) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, y combinaciones de las anteriores. En un aspecto, el organismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de metacrilato de metilo. En un aspecto adicional, los dos ácidos nucleicos exógenos codifican una alcohol transferasa y una deshidratasa o, alternativamente, una enzima formadora de éster y una deshidratasa.

[0180] En una modalidad, la invención ofrece un método, en donde el organismo microbiano que incluye (i) comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican una ATP-citrato liasa, citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa; en donde el citado organismo microbiano que incluye (ii) comprende cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato

carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o en donde el citado organismo microbiano que incluye (iii) comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una CO deshidrogenasa y una H_2 hidrogenasa.

[0181] En una modalidad, la invención señala un método para producir metacrilato de metilo que comprende cultivar el organismo microbiano no existente por naturaleza, como se divulga, aquí bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir metacrilato de metilo.

[0182] En otra modalidad, la invención establece un método para producir un éster de metacrilato que comprende cultivar un organismo microbiano no existente por naturaleza bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir a un éster de 3-hidroxiisobutirato, en donde el citado organismo microbiano no existente por naturaleza contiene un ácido nucleico exógeno que codifica una alcohol transferasa o una enzima formadora de un éster de 3-hidroxiisobutirato, expresada en una cantidad suficiente para producir a un éster de 3-hidroxiisobutirato y el citado organismo microbiano no existente por naturaleza comprende además: (i) una vía de los TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, u opcionalmente isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, citril-CoA sintetasa o citril-CoA liasa; (ii) una vía de los TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o (iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores, y deshidratar químicamente el citado éster de 3-hidroxiisobutirato para producir un éster de metacrilato. En otra modalidad, la invención facilita un método para producir un éster de metacrilato que comprende cultivar un organismo microbiano no existente por naturaleza bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir un éster de 2-hidroxiisobutirato, en donde el citado organismo microbiano no existente por naturaleza comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una alcohol transferasa o una enzima formadora de un éster

de 2-hidroxiisobutirato, expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de 2-hidroxiisobutirato y el citado organismo microbiano no existente por naturaleza comprende además: (i) una vía de los TCA reductores que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, u opcionalmente isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, citril-CoA sintetasa o citril-CoA liasa; (ii) una vía de los TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o (iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores, y deshidratar químicamente el citado éster de 2-hidroxi isobutirato para producir un éster de metacrilato. En todavía otra modalidad, la invención provee un método para producir metacrilato de metilo que comprende cultivar un organismo microbiano no existente por naturaleza bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir metil-3-hidroxiisobutirato, en donde el citado organismo microbiano no existente por naturaleza comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una alcohol transferasa o una enzima formadora de éster, expresada en una cantidad suficiente para producir metil-3-hidroxiisobutirato y el citado organismo microbiano no existente por naturaleza comprende además: (i) una vía de los TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, u opcionalmente isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, citril-CoA sintetasa o citril-CoA liasa; (ii) una vía de los TCA reductores que incluye por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o (iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una CO

deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores, y deshidratar químicamente el citado metil-3-hidroxiisobutirato para producir metacrilato de metilo. En un aspecto de los métodos ya mencionados, por lo menos uno de los citados ácidos nucleicos exógenos es un ácido nucleico heterólogo. En otro aspecto de los métodos ya mencionados, el organismo microbiano no existente por naturaleza está en un medio de cultivo sustancialmente anaerobio.

[0183] En una modalidad, la invención ofrece un método como se divulga más arriba y aquí, en donde el citado organismo microbiano que incluye (i) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, ferredoxina, y combinaciones de las anteriores. En otra modalidad, la invención provee un método como se divulga más arriba y aquí, en donde el citado organismo microbiano que incluye (ii) comprende además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, y combinaciones de las anteriores. En todavía otra modalidad, la invención indica un método como se divulga más arriba y aquí, en donde el citado organismo microbiano que incluye (i) comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa; en donde el citado organismo microbiano que incluye (ii) comprende cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o en donde el citado organismo microbiano que incluye (iii) comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una CO deshidrogenasa y una H_2 hidrogenasa.

[0184] En un aspecto, los métodos divulgados aquí pueden incluir además un organismo microbiano que comprende una vía de un éster de 3-hidroxiisobutirato que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de un éster de 3-hidroxiisobutirato expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de 3-hidroxiisobutirato, la citada vía del éster de 3-hidroxiisobutirato comprendiendo una vía seleccionada de: (a) una 3-

hidroxiisobutirato-CoA transferasa o una 3-hidroxiisobutirato-CoA sintetasa; y una alcohol transferasa; o (b) una enzima formadora de un éster de 3-hidroxiisobutirato. En un aspecto, los métodos divulgados aquí pueden incluir además un organismo microbiano que comprende una vía de un éster de 2-hidroxiisobutirato que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de un éster de 2-hidroxiisobutirato expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de 2-hidroxiisobutirato, la citada vía del éster de 2-hidroxiisobutirato comprendiendo una vía seleccionada de: (a) una 2-hidroxiisobutirato-CoA transferasa o una 2-hidroxiisobutirato-CoA sintetasa; y una alcohol transferasa; o (b) una enzima formadora de un éster de 2-hidroxiisobutirato.

[0185] Una purificación apropiada y/o ensayos para analizar la producción de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato pueden realizarse usando métodos bien conocidos. Réplicas apropiadas tales como cultivos en triplicado pueden criarse para cada cepa generada mediante ingeniería genética que se va a analizar. Por ejemplo, pueden monitorearse la formación de producto y subproductos en el hospedero de producción generada mediante ingeniería genética. El producto final y los intermediarios, y otros compuestos orgánicos, pueden analizarse por métodos tales como HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución), GC-MS (Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas) y LC-MS (Cromatografía Líquida – Espectroscopia de Masas) u otros métodos analíticos apropiados, usando procedimientos rutinarios bien conocidos en el arte. La liberación de producto en el caldo de fermentación puede examinarse también con el sobrenadante del cultivo. Subproductos y glucosa residual pueden cuantificarse por HPLC usando, por ejemplo, un detector de índice de refracción para glucosa y alcoholes, y un detector UV para ácidos orgánicos (Lin et al., *Biotechnol. Bioeng.* 90:775-779 (2005)), u otros métodos apropiados de análisis y detección bien conocidos en el arte. Las actividades de la enzima o proteína individual de las secuencias de ADN exógenas pueden analizarse igualmente usando métodos bien conocidos en el arte. Por ejemplo, la actividad citramalato sintasa puede analizarse monitoreando la producción de CoA en el transcurso del tiempo en una solución de proteína purificada, acetil-CoA, piruvato y solución amortiguadora (Atsumi et al., AEM74:7802-7808 (2008)).

[0186] El ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato pueden separarse de otros componentes en el cultivo usando una variedad de métodos bien conocidos en el arte. Tales métodos de separación

incluyen, por ejemplo, procedimientos de extracción así como métodos que comprenden extracción líquido-líquido continua, pervaporación, filtración de membrana, separación de membrana, ósmosis inversa, electrodiálisis, destilación, cristalización, centrifugación, filtración extractora, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de adsorción, y ultrafiltración. La totalidad de los métodos ya mencionados son bien conocidos en el arte.

[0187] Cualquiera de los organismos microbianos no existentes por naturaleza descritos aquí pueden cultivarse para producir y/o secretar los productos biosintéticos de la invención. Por ejemplo, los productores de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato pueden cultivarse para la producción biosintética de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato.

[0188] Para la producción de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, las cepas recombinantes se cultivan en un medio con fuente de carbono y otros nutrientes esenciales. A veces, es deseable y puede ser altamente deseable mantener condiciones anaerobias en el fermentador para reducir el costo del proceso en general. Tales condiciones pueden obtenerse, por ejemplo, rociando primero el medio con nitrógeno y luego sellando los frascos con un tabique y una tapa rizada hacia adentro. Para cepas en las que no se observa crecimiento anaerobiamente pueden aplicarse condiciones anaerobias, microaerobias o sustancialmente anaerobias perforando el tabique con un pequeño orificio para aireación limitada. Condiciones anaerobias ejemplares se han descrito previamente y son bien conocidas en el arte. Condiciones aerobias y anaerobias ejemplares se describen, por ejemplo, en la publicación de los Estados Unidos 2009/0047719, presentada el 10 de agosto de 2007. Las fermentaciones pueden realizarse en un lote, lote alimentado o manera continua, como se divulga aquí.

[0189] Si se desea, el pH del medio puede mantenerse en un pH deseado, en particular un pH neutro, tal como un pH de alrededor de 7, mediante adición de una base, tal como NaOH u otras bases, o ácido, según sea necesario para mantener el medio de cultivo en un pH deseable. La tasa de crecimiento puede determinarse midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (600 nm), y la tasa de absorción de glucosa monitoreando el agotamiento de la fuente de carbono en el transcurso del tiempo.

[0190] El medio de crecimiento puede incluir, por ejemplo, cualquier fuente de carbohidrato que pueda aportar una fuente de carbono al microorganismo no existente por naturaleza. Tales fuentes incluyen, por ejemplo, azúcares tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fructosa, sacarosa y almidón. Otras fuentes de carbohidrato incluyen, por ejemplo, materiales de alimentación renovables (*renewable feedstocks*) y biomasa. Tipos ejemplares de biomasas que pueden usarse como materiales de alimentación en los métodos de la invención incluyen materiales de alimentación de biomasa celulósica, biomasa hemicelulósica y lignina o porciones de materiales de alimentación. Tales materiales de alimentación de biomasa contienen, por ejemplo, sustratos de carbohidrato útiles como fuentes de carbono tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fructosa y almidón. Dadas las enseñanzas y la orientación ofrecidas aquí, los expertos en el arte entenderán que materiales de alimentación renovables y biomasa, distintos de los ya ejemplificados, pueden usarse igualmente para cultivar los organismos microbianos de la invención para la producción de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato.

[0191] En algunas modalidades, la presente invención provee ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato o un intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato que tiene una razón de carbono-12, carbono-13, y carbono-14 que refleja una fuente de captación de carbono atmosférico. En algunas de tales modalidades, la fuente de captación de carbono es CO_2. En algunas modalidades, la presente invención proporciona ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato o un intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato que tiene una razón de carbono-12, carbono-13, y carbono-14 que refleja una fuente de captación de carbono a base de petróleo. En algunas modalidades, la presente invención facilita ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato o un intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato que tiene una razón de carbono-12, carbono-13, y carbono-14, que se obtiene por una combinación de una fuente de captación de carbono atmosférico con una fuente de captación a base de petróleo. Tal combinación de fuentes de captación es un medio por el cual puede variarse la razón de carbono-12, carbono-13, y carbono-14.

[0192] Aparte de los materiales de alimentación renovables, tales como los ya ejemplificados y aquí, los organismos microbianos [productores] de ácido metacrílico ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato de la invención pueden modificarse asimismo para crecimiento en gas de síntesis como su fuente de carbono. En esta modalidad específica, una o más proteínas o enzimas se expresan en los organismos productores de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato para proporcionar una vía metabólica para la utilización de gas de síntesis u otra fuente de carbono.

[0193] El gas de síntesis, también conocido como syngas o gas productor, es el principal producto de la gasificación de carbón y de materiales carbonosos, tales como materiales de biomasa, incluyendo cultivos agrícolas y residuos. El gas de síntesis es una mezcla principalmente de H_2 y CO y puede obtenerse de la gasificación de cualquier material de alimentación orgánico, incluyendo pero no limitado a carbón, queroseno, gas natural, biomasa, y materia orgánica de desecho. La gasificación se lleva generalmente a cabo bajo una razón elevada de combustible a oxígeno. Aunque en gran medida H_2 y CO, el gas de síntesis puede incluir igualmente CO_2 y otros gases en cantidades más pequeñas. En consecuencia, el gas de síntesis ofrece una fuente rentable de carbono gaseoso tal como CO y, adicionalmente, CO_2.

[0194] La vía de Wood-Ljungdahl cataliza la conversión de CO y H_2 en acetil-CoA y otros productos tales como acetato. Organismos capaces de utilizar CO y gas de síntesis tienen también generalmente la capacidad de utilizar CO_2 y mezclas de CO_2/H_2 a través del mismo conjunto básico de enzimas y transformaciones comprendidas por la vía de Wood-Ljungdahl. La conversión, dependiente de H_2, de CO_2 en acetato por microorganismos se reconoció mucho antes de que se revelara que el CO podía usarse igualmente por los mismos organismos, y que estaban involucradas las mismas vías. Se ha demostrado que muchos acetógenos crecen en la presencia de CO_2 y producen compuestos tales como acetato, siempre y cuando esté presente hidrógeno para suministrar los equivalentes reductores necesarios (véase por ejemplo, Drake, *Acetogenesis*, pp. 3-60 Chapman and Hall, New York, (1994)). Esto puede resumirse por la siguiente ecuación:

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

Por lo tanto, microorganismos no existentes por naturaleza que poseen la vía de Wood-Ljungdahl pueden utilizar también mezclas de CO_2 y H_2 para la producción de acetil-CoA y otros productos deseados.

[0195] La vía de Wood-Ljungdahl es bien conocida en el arte y consta de 12 reacciones que pueden separarse en dos ramas: (1) rama metilo y (2) rama carbonilo. La rama metilo convierte gas de síntesis en metil-tetrahidrofolato (metil-THF), mientras que la rama carbonilo convierte metil-THF en acetil-CoA. Las reacciones en la rama metilo se catalizan en orden por las siguientes enzimas o proteínas: ferredoxina oxidorreductasa, formiato deshidrogenasa, formiltetrahidrofolato sintetasa, meteniltetrahidrofolato ciclodeshidratasa, metilentetrahidrofolato deshidrogenasa y metilentetrahidrofolato reductasa. Las reacciones en la rama carbonilo se catalizan en orden por las siguientes enzimas o proteínas: metiltetrahidrofolato:proteína corrinoide metiltransferasa (por ejemplo, AcsE), proteína ferro-sulfurosa corrinoide, proteína de ensamble de níquel (por ejemplo, AcsF), ferredoxina, acetil-CoA sintasa, monóxido de carbono deshidrogenasa y proteína de ensamble de níquel (por ejemplo, CooC). Siguiendo las enseñanzas y la orientación ofrecidas aquí para introducir un número suficiente de ácidos nucleicos codificantes, con el fin de generar una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, los expertos en el arte entenderán que el mismo diseño de ingeniería puede realizarse igualmente con respecto a introducir por lo menos los ácidos nucleicos que codifican las enzimas o proteínas de Wood-Ljungdahl, ausentes en el organismo hospedero. En consecuencia, la introducción de uno o más ácidos nucleicos codificantes en los organismos microbianos de la invención, de manera que el organismo modificado contenga la vía completa de Wood-Ljungdahl, conferirá capacidad de utilización de gas de síntesis.

[0196] Adicionalmente, el ciclo de ácidos tricarboxílicos reductores (inverso) y/o actividades hidrogenasa pueden usarse asimismo para la conversión de CO, CO_2 y/o H_2 en acetil-CoA y otros productos tales como acetato. Organismos capaces de fijar carbono mediante la vía de los TCA reductores pueden utilizar una o más de las siguientes enzimas: ATP citrato-liasa, citrato liasa, aconitasa, isocitrato deshidrogenasa, alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, succinil-CoA sintetasa, succinil-CoA transferasa, fumarato reductasa, fumarasa, malato deshidrogenasa, NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, monóxido de carbono deshidrogenasa, e hidrogenasa. Específicamente, los equivalentes reductores extraídos de CO y/o H_2 por monóxido de carbono deshidrogenasa e hidrogenasa

se utilizan para fijar CO_2 mediante el ciclo de los TCA reductores en acetil-CoA o acetato. Acetato puede convertirse en acetil-CoA por enzimas tales como acetil-CoA transferasa, acetato cinasa/fosfotransacetilasa, y acetil-CoA sintetasa. Acetil-CoA puede convertirse en precursores de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, por ejemplo, gliceraldehído-3-fosfato, fosfoenolpiruvato, y piruvato, por piruvato:ferredoxina oxidorreductasa y las enzimas de gluconeogénesis. Siguiendo las enseñanzas y la orientación indicadas aquí para introducir un número suficiente de ácidos nucleicos codificantes, con el fin de generar una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, los expertos en el arte entenderán que el mismo diseño de ingeniería puede realizarse también con respecto a introducir por lo menos los ácidos nucleicos que codifican las enzimas o proteínas de la vía de los TCA reductores, ausentes en el organismo hospedero. Por consiguiente, la introducción de uno o más ácidos nucleicos codificantes en los organismos microbianos de la invención de manera que el organismo modificado contenga la vía completa de los TCA reductores conferirá capacidad de utilización de gas de síntesis.

[0197] Por lo tanto, dadas las enseñanzas y la orientación ofrecidas aquí, los expertos en el arte entenderán que puede producirse un organismo microbiano no existente por naturaleza que secrete los compuestos biosintetizados de la invención cuando se cultiva en una fuente de carbono tal como un carbohidrato. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato y cualquiera de los metabolitos intermediarios en la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. Todo lo que se necesita es generar mediante ingeniería genética una o más de las actividades de la enzima o proteína requeridas para lograr la biosíntesis del compuesto o intermediario deseado incluyendo, por ejemplo, inclusión de alguna o la totalidad de las vías biosintéticas del ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. Como consecuencia, la invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza que produce y/o secreta ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato cuando se cultiva en un carbohidrato u otra fuente de carbono y produce y/o secreta cualquiera de los metabolitos intermediarios mostrados en la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, cuando se cultiva en un carbohidrato u otra fuente de carbono. Los organismos microbianos de la

invención productores de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato pueden iniciar la síntesis a partir de un intermediario, por ejemplo, citramalil-CoA, itaconil-CoA, itaconato, citramalato, mesaconato o citraconato.

[0198] Los organismos microbianos no existentes por naturaleza de la invención se construyen usando métodos bien conocidos en el arte, como se ejemplifica aquí, para expresar exógenamente por lo menos un ácido nucleico que codifica una enzima o proteína de la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato en cantidades suficientes para producir ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. Se entiende que los organismos microbianos de la invención se cultivan bajo condiciones suficientes para producir ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. Siguiendo las enseñanzas y la orientación indicadas aquí, los organismos microbianos no existentes por naturaleza de la invención pueden lograr la biosíntesis de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, resultante en concentraciones intracelulares entre alrededor de 0,1-200 mM o más. Generalmente, la concentración intracelular de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato está entre alrededor de 3-150 mM, particularmente entre alrededor de 5-125 mM y, más particularmente, entre alrededor de 8-100 mM, incluyendo alrededor de 10 mM, 20 mM, 50 mM, 80 mM, o más. Concentraciones intracelulares entre y por encima de estos intervalos ejemplares pueden conseguirse igualmente de los organismos microbianos no existentes por naturaleza de la invención.

[0199] En algunas modalidades, las condiciones de cultivo incluyen crecimiento anaerobio o sustancialmente anaerobio o condiciones de mantenimiento. Condiciones anaerobiass ejemplares se han descrito previamente y son bien conocidas en el arte. Condiciones anaerobias ejemplares para procesos de fermentación se describen aquí y se reseñan, por ejemplo, en la publicación de los Estados Unidos 2009/0047719, presentada el 10 de agosto de 2007. Cualquiera de estas condiciones puede emplearse con los organismos microbianos no existentes por naturaleza, así como otras condiciones anaerobias bien conocidas en el arte. Bajo tales condiciones anaerobias o sustancialmente anaerobias, los productores de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato pueden sintetizar ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato con concentraciones intracelulares de 5-

10 mM o más, así como todas las demás concentraciones ejemplificadas aquí. Se entiende que, incluso aunque la anterior descripción se refiere a concentraciones intracelulares, los organismos microbianos que producen ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato pueden producir ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato intracelularmente y/o secretar el producto en el medio de cultivo.

[0200] Además de las condiciones de cultivo y fermentación divulgadas aquí, la condición de crecimiento para lograr la biosíntesis de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato puede incluir la adición de un osmoprotector a las condiciones de cultivo. En ciertas modalidades, los organismos microbianos no existentes por naturaleza de la invención pueden sostenerse, cultivarse o fermentarse, como se describe aquí, en la presencia de un osmoprotector. Concretamente, un osmoprotector se refiere a un compuesto que actúa como un osmólito y ayuda a un organismo microbiano, como se describe aquí, a sobrevivir al estrés osmótico. Osmoprotectores incluyen, pero no se limitan a, betaínas, aminoácidos, y la trehalosa de azúcar. Ejemplos no limitantes de los mismos son glicina betaína, pralina betaína, dimetiltetina, dimetilsulfoniopropionato, 3-dimetilsulfonio-2-metilpropionato, ácido pipecólico, dimetilsulfonioacetato, colina, L-carnitina y ectoína. En un aspecto, el osmoprotector es glicina betaína. Se entiende por una persona de versación ordinaria en el arte que la cantidad y el tipo de osmoprotector apropiado para proteger un organismo microbiano, descrito aquí, del estrés osmótico dependerá del organismo microbiano usado. La cantidad de osmoprotector en las condiciones de cultivo pueden ser, por ejemplo, no más de alrededor de 0,1 mM, no más de alrededor de 0,5 mM, no más de alrededor de 1,0 mM, no más de alrededor de 1,5 mM, no más de alrededor de 2,0 mM, no más de alrededor de 2,5 mM, no más de alrededor de 3,0 mM, no más de alrededor de 5,0 mM, no más de alrededor de 7,0 mM, no más de alrededor de 10mM, no más de alrededor de 50mM, no más de alrededor de 100mM o no más de alrededor de 500mM.

[0201] En algunas modalidades, el material de alimentación de carbono y otras fuentes de captación celular tales como fosfato, amoníaco, sulfato, cloruro y otros halógenos pueden seleccionarse para alterar la distribución isotópica de los átomos presentes en el ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, o cualquier intermediario de la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. Los diferentes materiales de

alimentación de carbono y otras fuentes de captación enumeradas más arriba se designarán aquí, colectivamente, como "fuentes de captación." Fuentes de captación pueden proporcionar enriquecimiento isotópico para cualquier átomo presente en el intermediario de la vía de producto de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, o para productos secundarios, generados en reacciones que divergen de una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. El enriquecimiento isotópico puede obtenerse para cualquier átomo diana incluyendo, por ejemplo, carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, cloruro u otros halógenos.

[0202] En algunas modalidades, las fuentes de captación pueden seleccionarse para alterar las razones de carbono-12, carbono-13, y carbono-14. En algunas modalidades, las fuentes de captación pueden seleccionarse para alterar las razones de oxígeno-16, oxígeno-17, y oxígeno-18. En algunas modalidades, las fuentes de captación pueden seleccionarse para alterar las razones de hidrógeno, deuterio, y tritio. En algunas modalidades, las fuentes de captación pueden seleccionarse para alterar las razones de nitrógeno-14 y nitrógeno-15. En algunas modalidades, las fuentes de captación pueden seleccionarse para alterar las razones de azufre-32, azufre-33, azufre-34, y azufre-35. En algunas modalidades, las fuentes de captación pueden seleccionarse para alterar las razones de fósforo-31, fósforo-32, y fósforo-33. En algunas modalidades, las fuentes de captación pueden seleccionarse para alterar las razones de cloro-35, cloro-36, y cloro-37.

[0203] En algunas modalidades, la razón isotópica de un átomo diana puede variarse a una razón deseada seleccionando una o más fuentes de captación. Una fuente de captación puede derivarse de una fuente natural, como se encuentra en la naturaleza, o de una fuente artificial, y una persona experta en el arte puede seleccionar una fuente natural, una fuente artificial, o una combinación de las anteriores, para alcanzar una razón isotópica deseada de un átomo diana. Un ejemplo de una fuente de captación artificial incluye, por ejemplo, una fuente de captación que se deriva por lo menos parcialmente de una reacción sintética química. Tales fuentes de captación isotópicamente enriquecidas pueden adquirirse en el comercio o prepararse en el laboratorio y/u opcionalmente mezclarse con una fuente natural de la fuente de captación para conseguir una razón isotópica deseada. En algunas modalidades, una razón isotópica de un átomo diana de una fuente de captación puede lograrse seleccionando un origen deseado de la fuente de captación como se encuentra en la naturaleza. Por

ejemplo, como se discute aquí, una fuente natural puede ser biobasada, derivada de, o sintetizada por, un organismo biológico o una fuente tal como productos a base de petróleo o la atmósfera. En algunas modalidades similares, una fuente de carbono, por ejemplo, puede seleccionarse de una fuente de carbono derivada de un combustible fósil, la cual puede agotarse (*which can be depleted*) de carbono-14, o una fuente de carbono ambiental o atmosférico, tal como CO_2, que puede poseer una cantidad mayor de carbono-14 que su contraparte derivada de petróleo.

[0204] El isótopo de carbono inestable carbono-14 o radiocarbono constituye aproximadamente 1 en 10^{12} átomos de carbono en la atmósfera de la tierra y tiene una semi-vida de alrededor de 5700 años. Las existencias de carbono se reabastecen en la atmósfera superior por una reacción nuclear que involucra rayos cósmicos y nitrógeno ordinario (^{14}N). Los combustibles fósiles no contienen carbono-14, ya que se agotó hace mucho tiempo. La quema de combustibles fósiles reduce la fracción de carbono-14 atmosférico, el denominado "efecto Suess".

[0205] Métodos de determinar las razones isotópicas de los átomos de un compuesto son bien conocidos por los expertos en el arte. El enriquecimiento isotópico se evalúa fácilmente mediante espectrometría de masas usando técnicas conocidas en el arte de la espectrometría de masas con aceleración de iones (AMS - *Accelerated Mass Spectrometry*), espectrometría de masas de razones isotópicas estables (SIRMS - *Stable Isotope Ratio Mass Spectrometry*) y fraccionamiento isotópico natural específico de sitio, determinado por resonancia magnética nuclear (SNIF-NMR - *Site-Specific Natural Isotopic Fractionation by Nuclear Magnetic Resonance*). Tales técnicas espectrales de masas pueden integrarse con técnicas de separación tales como cromatografía líquida (LC - *Liquid Chromatography*), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y/o cromatografía de gases, y similares.

[0206] En el caso del carbono, ASTM D6866 se desarrolló en los Estados Unidos como un método analítico estandarizado para determinar el contenido biobasado de muestras sólidas líquidas y gaseosas usando datación de radiocarbono por la American Society for Testing and Materials (ASTM) International. El estándar se basa en el uso de la datación de radiocarbono para la determinación del contenido biobasado de un producto. ASTM D6866 se publicó por primera vez en 2004, y la versión activa actual del estándar es ASTM D6866-11 (con efectividad al 1 de abril de 2011). Las técnicas de datación de

radiocarbono son bien conocidas por los expertos en el arte, incluyendo las descritas aquí.

[0207] El contenido biobasado de un compuesto se calcula por la razón 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 razones $^{14}C/^{12}C$ del blanco, la muestra y la referencia moderna, respectivamente. La Fracción Moderna es una medición de la desviación de la razón $^{14}C/^{12}C$ de una muestra de "Moderna." Moderna se define como el 95% de la concentración de radiocarbono (en AD 1950) del Ácido Oxálico I del National Bureau of Standards (NBS) (es decir, materiales de referencia estándar (SRM - *standard reference materials*) 4990b) normalizado a $\delta^{13}C_{VPDB}$=-19 per mille (Olsson, *The use of Oxalic acid as a Standard.* In, Radiocarbon Variations and Absolute Chronology, Nobel Symposium, 12th Proc., John Wiley & Sons, New York (1970)). Los resultados de la espectrometría de masas, por ejemplo, medidos por ASM, se calculan usando la definición acordada internacionalmente de 0,95 veces la actividad específica de Ácido Oxálico I NBS (SRM 4990b) normalizado a $\delta^{13}C_{VPDB}$=-19 per mille. Esto es equivalente a una razón absoluta $^{14}C/^{12}C$ (AD 1950) de 1,176 ± 0,010 x 10^{-12} (Karlen et al., *Arkiv Geofysik*, 4:465-471 (1968)). Los cálculos estándar toman en cuenta la captación diferencial de un isótopo con respecto al otro, por ejemplo, la captación preferencial en sistemas biológicos de C^{12} sobre C^{13} sobre C^{14}, y estas correcciones se reflejan como una Fm corregida para δ^{13}.

[0208] Se elaboró un estándar de ácido oxálico (SRM 4990b o HOx 1) de una cosecha de remolacha azucarera de 1955. Aunque se fabricaron 1000 lbs, este estándar de ácido oxálico ya no se encuentra disponible en el comercio. El estándar Ácido Oxálico II (HOx 2; designación SRM 4990 C de N.I.S.T.) se elaboró de una cosecha de molasas de remolacha francesa de 1977. A comienzos de la década de 1980, un grupo de 12 laboratorios midieron las razones de los dos estándares. La razón de la actividad del Ácido Oxálico II a 1 es 1,2933±0.001 (la media ponderada). La razón isotópica de HOx II es -17,8 per mille. ASTM D6866-11 sugiere el uso del estándar de Ácido Oxálico II disponible SRM 4990 C (Hox2) para el estándar moderno (véase discusión de los estándares de ácido oxálico original vs. actualmente disponible en Mann, *Radiocarbon*, 25(2):519-527 (1983)). Una Fm = 0% representa la carencia total de átomos de carbono-14 en un material, indicando en esa forma una fuente de carbono fósil (por ejemplo, a base de petróleo). Una Fm = 100%, luego de la corrección para la inyección pos-1950

de carbono-14 en la atmósfera a partir de las pruebas con la bomba atómica, indica una fuente de carbono totalmente moderna. Como se describe aquí, tal fuente "moderna" incluye fuentes biobasadas.

[0209] Como se describe en ASTM D6866, el carbono moderno porcentual (pMC - *percent modern carbon*) puede ser mayor que 100% debido a los continuos, aunque cada vez menores, efectos de los programas de pruebas nucleares de la década de 1950, los cuales tuvieron como resultado un considerable enriquecimiento de carbono-14 en la atmósfera, como se describe en ASTM D6866-11. Puesto que todas las actividades de carbono-14 de muestra están referenciadas como un estándar "pre-bomba", y como casi todos los productos biobasados nuevos se producen en un ambiente pos-bomba, todos los valores pMC (luego de la corrección para la fracción isotópica) tienen que multiplicarse por 0,95 (a partir de 2010) para reflejar mejor el verdadero contenido biobasado de la muestra. Un contenido biobasado que es mayor que 103% sugiere que ha ocurrido un error analítico, o que la fuente de carbono biobasado tiene una antigüedad mayor que algunos años.

[0210] ASTM D6866 cuantifica el contenido biobasado relativo al contenido orgánico total del material y no considera el carbono inorgánico y otras sustancias presentes que no contienen carbono. Por ejemplo, un producto que es un material basado 50% en almidón y 50% en agua se consideraría que tiene un Contenido Biobasado = 100% (50% de contenido orgánico que es 100% biobasado) con base en ASTM D6866. En otro Ejemplo, un producto que es un material basado 50% en almidón, 25% basado en petróleo, y 25% en agua tendría un Contenido Biobasado = 66,7% (75% de contenido orgánico pero únicamente 50% del producto es biobasado). En otro Ejemplo, un producto que es 50% carbono orgánico y es un producto basado en petróleo se consideraría que tiene un Contenido Biobasado = 0% (50% de carbono orgánico pero de fuentes fósiles). Por consiguiente, basándose en los métodos y estándares bien conocidos para determinar el contenido biobasado de un compuesto o material, una persona experta en el arte puede determinar fácilmente el contenido biobasado y/o preparar productos corriente abajo que utilizan la invención y que tienen un contenido biobasado deseado.

[0211] Aplicaciones de técnicas de datación de carbono-14 para cuantificar el contenido biobasado de materiales son conocidas en el arte (Currie et al., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B,* 172:281-287 (2000)). Por ejemplo, la datación de carbono-14 se ha usado para cuantificar el contenido

biobasado en materiales con contenido de tereftalato (Colonna et al., *Green Chemistry*, 13:2543-2548 (2011)). Notablemente, polímeros de polipropilen tereftalato (PPT) derivados de 1,3-propanodiol renovable y ácido tereftálico derivado de petróleo tuvieron como resultado valores Fm cercanos a 30% (es decir, puesto que 3/11 del carbono polimérico se deriva de 1,3-propanodiol renovable y 8/11 del miembro final fósil ácido tereftálico) (Currie et al., *supra*, 2000). Por el contrario, el polímero de polibutilen tereftalato derivado de 1,4-butanodiol renovable y ácido tereftálico renovable tuvo como resultado un contenido biobasado que excedía el 90% (Colonna et al., *supra*, 2011).

[0212] Por consiguiente, en algunas modalidades, la presente invención provee ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato o un intermediario de la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, que tiene una razón de carbono-12, carbono-13, y carbono-14 que refleja una fuente de captación de carbono atmosférico, también denominado como carbono ambiental. Por ejemplo, en algunos aspectos el ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato o un intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato puede tener un valor Fm de por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98% o tanto como 100%. En algunas modalidades similares, la fuente de captación es CO_2. En algunas modalidades, la presente invención proporciona ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato o un intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato que tiene una razón de carbono-12, carbono-13, y carbono-14 que refleja una fuente de captación de carbono basada en petróleo. En este aspecto, el ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato o un intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato puede tener un valor Fm de menos que 95%, menos que 90%, menos que 85%, menos que 80%, menos que 75%, menos que 70%, menos que 65%, menos que 60%, menos que 55%, menos que 50%, menos que 45%, menos

que 40%, menos que 35%, menos que 30%, menos que 25%, menos que 20%, menos que 15%, menos que 10%, menos que 5%, menos que 2% o menos que 1%. En algunas modalidades, la presente invención provee ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato o un intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato que tiene una razón de carbono-12, carbono-13, y carbono-14, que se obtiene por una combinación de una fuente de captación de carbono atmosférico con una fuente de captación basada en petróleo. Usar tal combinación de fuentes de captación es una manera por la cual puede variarse la razón de carbono-12, carbono-13, y carbono-14, y las respectivas razones reflejarían las proporciones de las fuentes de captación.

[0213] Además, la presente invención se relaciona con el ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato o el intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato producidos biológicamente, como se divulga aquí, y con los productos derivados de ellos, en donde el ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato o un intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato tienen una razón isotópica de carbono-12, carbono-13, y carbono-14 de alrededor del mismo valor que el CO_2 que existe en el ambiente. Por ejemplo, en algunos aspectos la invención proporciona ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivado o un intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivado que tienen una razón isotópica de carbono-12 versus carbono-13 versus carbono-14 de alrededor del mismo valor que el CO_2 que existe en el ambiente, o cualquiera de las otras razones divulgadas aquí. Se entiende, como se divulga aquí, que un producto puede tener una razón isotópica de carbono-12 versus carbono-13 versus carbono-14 de alrededor el mismo valor que el CO_2 que existe en el ambiente, o cualquiera de las razones divulgadas aquí, en donde el producto se genera de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivado o un intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivado, como se divulga aquí, en donde el producto

bioderivado se modifica químicamente para generar un producto final. Métodos de modificar químicamente un producto bioderivado de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, o un intermediario de los anteriores, para generar un producto deseado son bien conocidos por los expertos en el arte, como se describe aquí. La invención proporciona asimismo polímeros, incluyendo polimetacrilato de metilo (PMMA), plásticos acrílicos, y co-polímeros, tales como el co-polímero metacrilato de metilo-butadieno-estireno (MBS), y similares, que tienen una razón isotópica carbono-12 versus carbono-13 versus carbono-14 de alrededor el mismo valor que el CO_2 que existe en el ambiente, en donde los polímeros, incluyendo polimetacrilato de metilo, plásticos acrílicos y el co-polímero metacrilato de metilo-butadieno-estireno (MBS), se generan directamente de, o en combinación con, el ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivado o un intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivado, como se divulga aquí.

[0214] Ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato son productos químicos usados en aplicaciones comerciales e industriales. Ejemplos no limitantes de tales aplicaciones comprenden la producción de polímeros, incluyendo polimetacrilato de metilo (PMMA), también designado como vidrio acrílico, Lucite™ o Plexiglas™, plásticos acrílicos y co-polímeros, tales como el co-polímero metacrilato de metilo-butadieno-estireno (MBS). Más aún, el ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato se usan igualmente como materias primas en la producción de una amplia gama de productos que engloban polímeros, incluyendo polimetacrilato de metilo, plásticos acrílicos y el co-polímero metacrilato de metilo-butadieno-estireno (MBS). Por consiguiente, en algunas modalidades, la invención proporciona polímeros biobasados, incluyendo polimetacrilato de metilo, plásticos acrílicos y el co-polímero metacrilato de metilo-butadieno-estireno (MBS), que contienen uno o más ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivado, o un intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivado, producido de un microorganismo no existente por naturaleza de la invención, o producido usando los métodos divulgados aquí. Tales polímeros, incluyendo polimetacrilato de metilo, plásticos acrílicos, y co-

polímeros, incluyendo metacrilato de metilo-butadieno-estireno, pueden tener una mezcla de precursores bioderivados y basados en petróleo, en razones deseadas, como ya se describió.

[0215] Tal como se emplea aquí, el término "bioderivado" significa derivado de, o sintetizado por, un organismo biológico y puede considerarse un recurso renovable, puesto que puede generarse por un organismo biológico. Tal organismo biológico, en particular los organismos microbianos de la invención divulgados aquí, pueden utilizar material de alimentación o biomasa, tales como, azúcares o carbohidratos obtenidos de una fuente agrícola, vegetal, bacteriana, o animal. Alternativamente, el organismo biológico puede utilizar carbono atmosférico. Tal como se emplea aquí, el término "biobasado" significa un producto, como ya se describió que se compone, en todo o en parte, de un compuesto bioderivado de la invención. Un producto biobasado o bioderivado se contrapone a un producto derivado del petróleo, en donde tal producto se deriva o se sintetiza de petróleo o un material de alimentación petroquímico.

[0216] En algunas modalidades, la invención proporciona polímeros, incluyendo polimetacrilato de metilo, plásticos acrílicos y el co-polímero metacrilato de metilo-butadieno-estireno (MBS), que contienen ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivado, o un intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivado, en donde el ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivado, o el intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivado incluyen todo o parte del ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato o intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato usado en la producción de polímeros, incluyendo polimetacrilato de metilo, plásticos acrílicos, y el co-polímero metacrilato de metilo-butadieno-estireno (MBS). Por consiguiente, en algunos aspectos, la invención provee polímeros biobasados, incluyendo polimetacrilato de metilo, plásticos acrílicos y el co-polímero metacrilato de metilo-butadieno-estireno (MBS), que contienen por lo menos 2%, por lo menos 3%, por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo

menos 95%, por lo menos 98% o 100% de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivado, o el intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivado, como se divulga aquí. Adicionalmente, en algunos aspectos, la invención facilita polímeros biobasados, incluyendo polimetacrilato de metilo, plásticos acrílicos y el co-polímero metacrilato de metilo-butadieno-estireno (MBS), en donde el ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, o el intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, usado en su producción, es una combinación de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivados y derivados de petróleo, o el intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. Por ejemplo, polímeros biobasados, incluyendo polimetacrilato de metilo, plásticos acrílicos y el co-polímero metacrilato de metilo-butadieno-estireno (MBS), pueden producirse usando 50% de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivado y 50% de intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato derivado del petróleo tal como metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, u otras razones 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, en la medida en que por lo menos una porción del producto comprenda un producto bioderivado, producido por los organismos microbianos divulgados aquí. Se entiende que métodos para producir polímeros, incluyendo polimetacrilato de metilo, plásticos acrílicos y el co-polímero metacrilato de metilo-butadieno-estireno (MBS), usando del ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivado, o el intermediario de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato bioderivado de la invención son bien conocidos en el arte.

[0217] Las condiciones de cultivo pueden incluir, por ejemplo, procedimientos de cultivo líquido así como fermentación y otros procedimientos de cultivo a gran escala. Como se describe aquí, rendimientos particularmente útiles de los productos biosintéticos de la invención pueden obtenerse bajo condiciones de cultivo anaerobias o sustancialmente anaerobias.

[0218] Como se describe aquí, una condición de crecimiento ejemplar para lograr la biosíntesis de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato incluye condiciones de cultivo anaerobio o fermentación. En ciertas modalidades, los organismos microbianos no existentes por naturaleza de la invención pueden sostenerse, cultivarse o fermentarse bajo condiciones anaerobias o sustancialmente anaerobias. Concretamente, condiciones anaerobias se refieren a un ambiente desprovisto de oxígeno. Condiciones sustancialmente anaerobias incluyen, por ejemplo, un cultivo, fermentación de lote o fermentación continua tales que la concentración de oxígeno disuelto en el medio permanezca entre 0 y 10% de saturación. Condiciones sustancialmente anaerobias incluyen igualmente cultivar o depositar células en un medio líquido o en agar sólido dentro de una cámara sellada, mantenida con una atmósfera de menos de 1% de oxígeno. El porcentaje de oxígeno puede mantenerse, por ejemplo, rociando el cultivo con una mezcla de N_2/CO_2 u otro gas o gases apropiados distintos de oxígeno.

[0219] Las condiciones de cultivo descritas aquí pueden aumentarse progresivamente y desarrollarse continuamente para la fabricación de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. Procedimientos de crecimiento ejemplares incluyen, por ejemplo, fermentación de lote alimentado y separación de lote; fermentación de lote alimentado y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Todos estos procesos son bien conocidos en el arte. Los procedimientos de fermentación son particularmente útiles para la producción biosintética de cantidades comerciales de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. Generalmente, y al igual que con los procedimientos de cultivo no continuo, la producción continua y/o cuasi-continua de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato incluirán cultivar un organismo no existente por naturaleza, productor de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato de la invención, en nutrientes y medio suficientes para sostener y/o cuasi-sostener el crecimiento en una fase exponencial. El cultivo continuo bajo tales condiciones puede incluir, por ejemplo, crecimiento durante 1 día, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días o más. Adicionalmente, el cultivo continuo puede incluir períodos de tiempo superiores a 1 semana, 2, 3, 4 o 5 o más semanas y hasta varios meses. Alternativamente, los organismos de la invención pueden cultivarse durante horas, si es apropiado, para una aplicación a particular. Hay que entender que las condiciones de cultivo continuo y/o cuasi-

continuo pueden incluir asimismo todos los intervalos de tiempo entre estos períodos ejemplares. Se entiende además que el tiempo de cultivar el organismo microbiano de la invención es durante un período suficiente para producir una cantidad suficiente de producto para un propósito deseado.

[0220] Los procedimientos de fermentación son bien conocidos en el arte. Concretamente, la fermentación para la producción biosintética de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato puede utilizarse en, por ejemplo, fermentación de lote alimentado y separación de lote; la fermentación de lote alimentado y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Ejemplos de procedimientos de fermentación de lote y continua son bien conocidos en el arte.

[0221] Además de los procedimientos de fermentación ya mencionados usando los productores de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato, éster de 3-hidroxiisobutirato, 2-hidroxiisobutirato y/o éster de 2-hidroxiisobutirato de la invención para la producción continua de cantidades sustanciales de ácido metacrílico, éster de metacrilato, metacrilato de metilo, 3-hidroxiisobutirato, éster de 3-hidroxiisobutirato, 2-hidroxiisobutirato y/o éster de 2-hidroxiisobutirato, los productores pueden, por ejemplo, someterse simultáneamente a procedimientos de síntesis química para convertir el producto en otros compuestos, o el producto puede separarse del cultivo de fermentación y someterse secuencialmente a conversión química o enzimática para convertir el producto en otros compuestos, si se desea. Por ejemplo, en algunas modalidades, la invención provee la deshidratación química de un éster de 3-hidroxiisobutirato tal como metil-3-hidroxiisobutirato o un éster de 2-hidroxiisobutirato tal como metil-2-hidroxiisobutirato a un éster de metacrilato tal como metacrilato de metilo. Se entiende que los métodos y los compuestos químicos para catalizar la deshidratación de tales compuestos son bien conocidos en el arte.

[0222] Ésteres de 3-hidroxiisobutirato y ésteres de 2-hidroxiisobutirato pueden deshidratarse químicamente con la formación de ésteres de metacrilato, comenzando con 3-hidroxiisobutirato o 2-hidroxiisobutirato puro, aislado de la solución de fermentación, o comenzando con soluciones acuosas u orgánicas de un éster de 3-hidroxiisobutirato o éster de 2-hidroxiisobutirato, aislado en el proceso de purificación y separación (*work up*) de la solución de fermentación. Tales soluciones de un éster de 3-hidroxiisobutirato o éster de 2-hidroxiisobutirato pueden concentrarse asimismo antes del paso de deshidratación, por ejemplo, mediante destilación, opcionalmente en la presencia de un arrastrante apropiado.

[0223] La reacción de deshidratación puede llevarse a cabo en la fase líquida o en la fase gaseosa. La reacción de deshidratación puede realizarse en la presencia de un catalizador, dependiendo la naturaleza del catalizador empleado de si se efectúa una reacción de fase gaseosa o fase líquida.

[0224] Catalizadores de deshidratación apropiados incluyen tanto catalizadores ácidos como catalizadores alcalinos. Los catalizadores ácidos, en particular, pueden exhibir una tendencia decreciente a formar oligómeros. El catalizador de deshidratación puede emplearse como un catalizador homogéneo, un catalizador heterogéneo, o combinaciones de los anteriores. Los catalizadores heterogéneos pueden usarse conjuntamente con un material de soporte apropiado. Tal soporte puede ser en sí mismo ácido o alcalino y proporcionar el catalizador de deshidratación ácido o alcalino, o un catalizador puede aplicarse a un soporte inerte.

[0225] Soportes apropiados que sirven como catalizadores de deshidratación incluyen silicatos sintéticos o naturales, tales como mordenita, montmorillonita, zeolitas ácidas; soportes que están recubiertos con ácidos inorgánicos monobásicos, dibásicos o polibásicos, tales como ácido fosfórico, o con sales ácidas de ácidos inorgánicos, tales como óxidos o silicatos, por ejemplo Al_2O_3, TiO_2; óxidos y óxidos mixtos tales como óxidos mixtos γ-Al_2O_3 y ZnO—Al_2O_3 de heteropoliácidos. Sustancias alcalinas que actúan igualmente como catalizador de deshidratación y como material de soporte incluyen álcalis, alcalinotérreos, lantano, lantanoides o combinaciones de los anteriores, como sus óxidos. Una clase adicional de materiales que pueden efectuar deshidratación son intercambiadores de iones, los cuales pueden usarse en las formas alcalina o ácida.

[0226] Catalizadores apropiados de deshidratación homogénea incluyen ácidos inorgánicos, tales como ácidos con contenido de fósforo, tal como ácido fosfórico. Ácidos inorgánicos pueden inmovilizarse en el material de soporte mediante inmersión o impregnación.

[0227] En algunas modalidades, la reacción de deshidratación se lleva a cabo en la fase gaseosa usando aparatos convencionales conocidos en el arte, por ejemplo reactores tubulares, intercambiadores de calor de casco y tubos y reactores, que comprenden termoplacas como intercambiadores de calor. En algunas modalidades, deshidratación de fase gaseosa puede utilizar ésteres de 3-hidroxiisobutirato aislados o soluciones del éster, introduciéndose el éster en un reactor con catalizadores de lecho fijo. La deshidratación térmica en la fase líquida

puede llevarse a cabo en un intervalo de temperatura de entre 200 °C y 350 °C y, en algunas modalidades, entre 250 y 300° C.

[0228] Para generar mejores productores, puede utilizarse modelamiento metabólico para optimizar las condiciones de crecimiento. Asimismo puede emplearse modelamiento para diseñar desactivaciones de genes (*gene knockouts*) que optimicen adicionalmente la utilización de la vía (véase, por ejemplo, las publicaciones de Patente de los 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 Patente de los Estados Unidos No. 7,127,379). El análisis de modelamiento permite predicciones confiables de los efectos sobre el crecimiento celular de cambiar el metabolismo hacia una producción más eficiente de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato.

[0229] Un método computacional para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorecen la biosíntesis de un producto deseado es el marco computacional OptKnock (Burgard et al., *Biotechnol. Bioeng.* 84:647-657 (2003)). OptKnock es un programa de modelamiento y simulación metabólicos, que sugiere estrategias de deleción o alteración génicas, que tienen como resultado microorganismos genéticamente estables, que producen en exceso el producto diana. Específicamente, el marco examina la red metabólica y/o bioquímica completa de un microorganismo, con el fin de sugerir manipulaciones genéticas que fuerzan al producto bioquímico deseado a convertirse en un subproducto obligatorio de crecimiento celular. Al acoplar la producción bioquímica con el crecimiento celular mediante deleciones génicas estratégicamente ubicadas, u otra alteración génica funcional, las presiones de selección de crecimiento impuestas a las cepas generadas mediante ingeniería genética después de largos períodos de tiempo en un biorreactor conducen a mejoras en el desempeño, como resultado de la producción bioquímica acoplada a un crecimiento obligatorio. Por último, cuando se construyen deleciones génicas, existe una posibilidad insignificante de que las cepas diseñadas reviertan a sus estados silvestres, porque los genes seleccionados por OptKnock tienen que eliminarse completamente del genoma. En consecuencia, esta metodología computacional puede usarse para identificar vías alternativas que llevan a la biosíntesis de un producto deseado o usado en conexión con los organismos microbianos no existentes por naturaleza para optimización adicional de la biosíntesis de un producto deseado.

[0230] Concretamente, OptKnock es un término utilizado aquí para referirse a un método y a un sistema computacional para modelar el metabolismo celular. El programa OptKnock se refiere a un marco de modelos y métodos que incorporan restricciones particulares en los modelos de análisis de balance de flujo (FBA - *flux balance analysis*). Estas restricciones incluyen, por ejemplo, información cinética cualitativa, información reguladora cualitativa, y/o datos experimentales de microarreglos de ADN. OptKnock computa también soluciones a varios problemas metabólicos, por ejemplo, haciendo más estrictas las fronteras de flujo derivadas mediante modelos de balance de flujo y, subsiguientemente, examinando más a fondo los límites de desempeño de las redes metabólicas en la presencia de adiciones o deleciones génicas. El marco computacional OptKnock permite la construcción de formulaciones de modelos que posibilitan una búsqueda efectiva de los límites de desempeño de redes metabólicas y proporciona métodos para resolver los problemas resultantes de programación lineal de enteros mixtos. Los métodos de modelamiento y simulación metabólicos mencionados aquí, como OptKnock, se describen en, por ejemplo, la publicación de los 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 los Estados Unidos 2009/0047719, presentada el 10 de agosto de 2007.

[0231] Otro método computacional para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorecen la producción biosintética de un producto es un sistema de modelamiento y simulación metabólicos denominado SimPheny®. Este método y sistema computacional se describe en, por ejemplo, la publicación de los 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 puede usarse para producir un modelo de redes *in silico* y simular el flujo de masa, energía o carga a través de reacciones químicas de un sistema biológico para definir un espacio de solución que contiene cualquiera y todas las funcionalidades posibles de las reacciones químicas en el sistema, determinando en esa forma una gama de actividades permitidas para el sistema biológico. Este enfoque se designa como un modelamiento basado en restricciones, porque el espacio de soluciones se define por restricciones tales como la estequiometría conocida de las reacciones incluidas, así como las restricciones termodinámicas de reacción y capacidad asociadas con flujos máximos a través de las reacciones. El espacio definido por

estas limitaciones puede interrogarse para determinar las capacidades fenotípicas y el comportamiento del sistema biológico o de sus componentes bioquímicos.

[0232] Estos enfoques computacionales son consistentes con las realidades biológicas, porque los sistemas biológicos son flexibles y pueden alcanzar el mismo resultado en muchos modos diferentes. Sistemas biológicos se diseñan a través de mecanismos evolutivos que se han restringido por limitaciones fundamentales que todos los sistemas vivos tienen que enfrentar. En consecuencia, la estrategia de modelamiento basado en restricciones abarca estas realidades generales. Por lo demás, la capacidad de imponer continuamente restricciones adicionales a un modelo de redes mediante el endurecimiento de las restricciones tiene como resultado una reducción en el tamaño del espacio de soluciones, mejorando en esa forma la precisión con la cual puede predecirse el desempeño o fenotipo fisiológico.

[0233] Dadas las enseñanzas y la orientación ofrecidas aquí, los expertos en el arte estarán en capacidad de aplicar varios marcos computacionales para el modelamiento y simulación metabólicos, con el fin de diseñar e implementar la biosíntesis de un compuesto deseado en organismos hospederos microbianos. Tales métodos de modelamiento y simulación metabólicos incluyen, por ejemplo, los sistemas computacionales ya ejemplificados, como SimPheny® y OptKnock. Para ilustración de la invención, se describen aquí algunos métodos con referencia al marco de computación OptKnock para modelamiento y simulación. Los expertos en el arte sabrán cómo aplicar la identificación, diseño e implementación de las alteraciones metabólicas usando OptKnock a cualquiera de otros marcos computacionales similares de modelamiento y simulación metabólicos y métodos bien conocidos en el arte.

[0234] Los métodos ya descritos ofrecerán un conjunto de reacciones metabólicas a alterar. La eliminación de cada reacción dentro del conjunto, o modificación metabólica, puede tener como resultado un producto deseado como un producto obligatorio durante la fase de crecimiento del organismo. Puesto que las reacciones son conocidas, una solución al problema OptKnock de dos niveles proporcionará igualmente el gen o genes asociados que codifican una o más enzimas que catalizan cada reacción dentro del conjunto de reacciones. La identificación de un conjunto de reacciones y sus correspondientes genes, que codifican las enzimas que participan en cada reacción, es generalmente un proceso automático, realizado mediante la correlación de las reacciones con una

base de datos de reacciones que tiene una relación entre enzimas y genes codificantes.

[0235] Una vez identificadas, el conjunto de reacciones que se van a alterar, con el fin de alcanzar la producción de un producto deseado, se implementan en la célula u organismo diana por alteración funcional de por lo menos un gen que codifica cada reacción metabólica dentro del conjunto. Un medio particularmente útil para lograr una alteración funcional del conjunto de reacciones es por deleción de cada gen codificante. No obstante, en algunos casos, puede ser beneficioso alterar la reacción por otras aberraciones genéticas incluyendo, por ejemplo, mutación, deleción de regiones reguladoras tales como promotores o sitios de unión *cis* para factores reguladores, o por truncamiento de la secuencia codificante en cualquiera de un número de localizaciones. Estas últimas aberraciones, que tienen como resultado una deleción menos que total del conjunto de genes, pueden ser útiles, por ejemplo, cuando se desean evaluaciones rápidas del acoplamiento de un producto, o cuando es menos probable que ocurra una reversión genética.

[0236] Para identificar soluciones productivas adicionales al problema OptKnock descrito de dos niveles, que lleven a conjuntos adicionales de reacciones para alterar modificaciones metabólicas, las cuales pueden tener como resultado la biosíntesis, incluyendo la biosíntesis acoplada al crecimiento de un producto deseado, puede implementarse un método de optimización, denominado recortes de enteros (*integer cuts*). Este método procede resolviendo iterativamente el problema OptKnock ya ejemplificado con la incorporación de una restricción adicional, designada como un recorte de enteros en cada iteración. Las restricciones de recortes de enteros impiden efectivamente que el procedimiento de solución elija el mismo conjunto exacto de reacciones identificadas en cualquier iteración previa, que obligatoriamente acople la biosíntesis de un producto al crecimiento. Por ejemplo, si una modificación metabólica, acoplada al crecimiento, identificada previamente, especifica las reacciones 1, 2, y 3 para alteración, entonces la siguiente restricción impide que se consideren simultáneamente las mismas reacciones en soluciones subsiguientes. El método de recortes de enteros es bien conocido en el arte y puede encontrarse descrito en, por ejemplo, Burgard et al., *Biotechnol. Prog.* 17:791-797 (2001). Al igual que con todos los métodos descritos aquí con referencia a su uso en combinación con el marco computacional OptKnock para modelamiento y simulación metabólicos, el método de recortes de enteros de reducir redundancia en análisis computacional iterativo

puede aplicarse igualmente con otros marcos computacionales bien conocidos en el arte incluyendo, por ejemplo, SimPheny®.

[0237] Los métodos ejemplificados aquí permiten la construcción de células y organismos que producen biosintéticamente un producto deseado, incluyendo el acoplamiento obligatorio de la producción de un producto bioquímico diana al crecimiento de la célula u organismo generado mediante ingeniería genética para albergar las alteraciones genéticas identificadas. En consecuencia, los métodos computacionales descritos aquí permiten la identificación e implementación de modificaciones metabólicas que se identifican por un método *in silico* seleccionado de OptKnock o SimPheny®. El conjunto de modificaciones metabólicas puede incluir, por ejemplo, adición de una o más enzimas de la vía biosintética y/o alteración funcional de una o más reacciones metabólicas incluyendo, por ejemplo, alteración por deleción de genes.

[0238] Como se discute más arriba, la metodología OptKnock se desarrolló sobre la premisa de que redes microbianas mutantes pueden evolucionar hacia sus genotipos de crecimiento máximo predichos computacionalmente cuando se someten a largos períodos de selección de crecimiento. Concretamente, el enfoque apalanca la capacidad de un organismo para auto-optimizarse bajo presiones selectivas. El marco OptKnock posibilita la enumeración exhaustiva de combinaciones de deleción génica que fuerzan un acoplamiento entre producción bioquímica y crecimiento, basado en estequiometria de redes. La identificación de desactivaciones (*knockouts*) óptimas de reacciones/genes requiere la solución de un problema de optimización de dos niveles, que selecciona el conjunto de reacciones activas, de manera que una solución de crecimiento óptimo para la red resultante produzca en exceso el producto bioquímico de interée (Burgard et al., *Biotechnol. Bioeng.* 84:647-657 (2003)).

[0239] Un modelo estequiométrico *in silico* del metabolismo de *E. coli* puede emplearse para identificar genes esenciales para las vías metabólicas, como se ejemplifican previamente y se describen en, por ejemplo, las publicaciones de Patente de los 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 los Estados Unidos No. 7,127,379. Como se divulga aquí, el marco matemático OptKnock puede aplicarse para precisar deleciones de genes que llevan a una producción acoplada a crecimiento de un producto deseado. Además, la solución del problema OptKnock de dos niveles ofrece únicamente un conjunto de deleciones. Para enumerar todas las soluciones

significativas, es decir, todos los conjuntos de desactivaciones que llevan a la formación de producción acoplada a crecimiento, puede implementarse una técnica de optimización, designada como recortes de enteros. Esto incluye resolver iterativamente el problema OptKnock con la incorporación de una restricción adicional, designada como un recorte de enteros en cada iteración, como ya se discutió.

[0240] Como se divulga aquí, un ácido nucleico que codifica una actividad deseada de una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato puede introducirse en un organismo hospedero. En algunos casos, puede ser deseable modificar una actividad de una enzima o proteína de una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato para aumentar la producción de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. Por ejemplo, mutaciones conocidas, que incrementan la actividad de una enzima o proteína, pueden introducirse en una molécula de ácido nucleico codificante. Adicionalmente, pueden aplicarse métodos de optimización para aumentar la actividad de una enzima o proteína y/o disminuir una actividad inhibitoria, por ejemplo, disminuir la actividad de un regulador negativo.

[0241] Un método de optimización similar es la evolución dirigida. La evolución dirigida es un poderoso enfoque que implica la introducción de mutaciones direccionadas (*targeted*) a un gen específico, con el fin de mejorar y/o alterar las propiedades de una enzima. Enzimas mejoradas y/o alteradas pueden identificarse mediante el desarrollo e implementación de análisis sensibles de detección selectiva de alto rendimiento, los cuales permiten la identificación selectiva automática de muchas variantes de enzimas (por ejemplo, $>10^4$). Rondas iterativas de mutagénesis e identificación selectiva se realizan típicamente para proporcionar una enzima con propiedades optimizadas. Se han desarrollado asimismo algoritmos computacionales que pueden ayudar a identificar áreas del gen para mutagénesis y pueden reducir significativamente el número de variantes de enzimas que necesitan generarse y seleccionarse selectivamente. Se han desarrollado numerosas tecnologías de evolución dirigida (para reseñas, véase Hibbert et al., *Biomol.Eng* 22:11-19 (2005); Huisman and Lalonde, *In* Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries pgs. 717-742 (2007), Patel (ed.), CRC Press; Otten and Quax. *Biomol.Eng* 22:1-9 (2005); y Sen et al., *Appl Biochem.Biotechnol* 143:212-223 (2007)) para que sean efectivas en crear diversas bibliotecas de variantes, y estos métodos se han aplicado exitosamente

al mejoramiento de una amplia gama de propiedades a través de muchas clases de enzimas. Características enzimáticas que se han mejorado y/o alterado por tecnologías de evolución dirigida incluyen, por ejemplo: selectividad/especificidad, para la conversión de sustratos no naturales; estabilidad a la temperatura, para procesamiento robusto a altas temperaturas; estabilidad del pH, para bioprocesamiento bajo condiciones de pH más bajas o más altas; tolerancia del sustrato o producto, de manera que puedan alcanzarse altas concentraciones del producto; unión (K_m), incluyendo ampliar la unión al sustrato para incluir sustratos no naturales; inhibición (K_i), para eliminar la inhibición por productos, sustratos, o intermediarios claves; actividad (kcat), para aumentar las tasas de reacción enzimática, con el fin de lograr un flujo deseado; niveles de expresión, para incrementar los rendimientos de proteínas y el flujo de la vía general; estabilidad al oxígeno, para operación de enzimas sensibles al aire bajo condiciones aerobias; y actividad anaerobia, para operación de una enzima aerobia en la ausencia de oxígeno.

[0242] A continuación se describen con más detalle métodos ejemplares que se han desarrollado para la mutagénesis y diversificación de genes para direccionar (*to target*) propiedades deseadas de enzimas específicas. Tales métodos son bien conocidos por los expertos en el arte. Cualquiera de estos puede usarse para alterar y/o optimizar la actividad de una enzima o proteína de la vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato.

[0243] EpPCR (Pritchard et al., *J Theor.Biol.* 234:497-509 (2005)) introduce mutaciones puntuales aleatorias reduciendo la fidelidad de ADN polimerasa en reacciones PCR mediante la adición de iones de Mn^{2+}, desviando las concentraciones de dNTP (*by biasing dNTP concentrations)*, o mediante otras variaciones condicionales. El proceso de clonación de cinco pasos para confinar la mutagénesis al gen diana de interés involucra: 1) amplificación de PCR propensa a error del gen de interés; 2) digestión con enzimas de restricción; 3) purificación en gel del fragmento de ADN deseado; 4) ligamiento en un vector; 5) transformación de las variantes del gen en un hospedero apropiado y detección selectiva de la biblioteca para un desempeño mejorado. Este método puede generar mutaciones múltiples en un solo gen simultáneamente, las cuales pueden ser útiles para identificar selectivamente (*to screen*) un número más grande de variantes potenciales que tienen una actividad deseada. Un alto número de mutantes pueden generarse por EpPCR, de manera que un análisis de detección

selectiva de alto rendimiento o un método de selección, por ejemplo, usando robótica, es útil para identificar aquellos con características deseadas.

[0244] Amplificación por Círculo Rodante Propensa a Error (epRCA *error-prone Rolling Circle Amplification*) (Fujii et al., *Nucleic Acids Res.* 32:e145 (2004); y Fujii et al., *Nat. Protoc.* 1:2493-2497 (2006)) tiene muchos de los mismos elementos de una epPCR excepto que se usa un plásmido circular entero como el molde, y 6-meros aleatorios con enlaces de tiofosfato resistentes a exonucleasa en los últimos 2 nucleótidos se utilizan para amplificar el plásmido, seguidos por transformación en células en las cuales el plásmido se re-circulariza en repeticiones en tándem. Ajustar la concentración de Mn^{2+} puede variar la tasa de mutación en cierta forma. Esta técnica emplea un método sencillo de un solo paso, propenso a error, para crear una copia completa del plásmido con 3 - 4 mutaciones/kbp. No se requiere digestión con enzimas de restricción o cebadores específicos. Adicionalmente, este método se encuentra normalmente disponible como un kit que se obtiene en el comercio.

[0245] Barajado de ADN o Familias (*DNA or Family Shuffling*) (Stemmer, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10747-10751 (1994)); y Stemmer, *Nature* 370:389-391 (1994)) implica por lo general la digestión de dos o más genes de variantes con nucleasas tales como ADNasa I o EndoV para generar un conjunto (*pool*) de fragmentos aleatorios que se re-ensamblan por ciclos de hibridación y extensión en la presencia de ADN polimerasa, para crear una biblioteca de genes quiméricos. Los fragmentos se ceban unos a otros y ocurre recombinación cuando una copia ceba otra copia (cambio de molde). Este método puede usarse con secuencias de ADN >1kbp. Aparte de los recombinantes mutacionales creados por re-ensamblado de fragmentos, este método introduce mutaciones puntuales en los pasos de extensión a una tasa similar a la PCR propensa a error. El método puede usarse para eliminar mutaciones destructivas, aleatorias y neutras.

[0246] Extensión Escalonada (StEP – *Staggered Extension*) (Zhao et al., *Nat. Biotechnol.* 16:258-261 (1998)) implica el cebado de moldes seguido por ciclos repetidos de PCR de 2 pasos con desnaturalización y duración muy corta de hibridación/extensión (tan breve como 5 segundos). Fragmentos en crecimiento se hibridan a diferentes moldes y se extienden adicionalmente, lo cual se repite hasta que se fabrican secuencias de longitud completa. El cambio de moldes (*template switching*) significa que los fragmentos resultantes tienen muchos progenitores. Combinaciones de polimerasas de baja fidelidad (Taq y Mutazyme) reducen los

sesgos propensos a error (*error-prone biases*) debido a espectros mutacionales opuestos.

[0247] En Recombinación por Cebado al Azar (RPR - *Random Priming Recombination*), cebadores de secuencia aleatorios se usan para para generar muchos fragmentos cortos de ADN complementario a diferentes segmentos del molde (Shao et al., *Nucleic Acids Res* 26:681-683 (1998)). La incorporación errónea de bases y el cebado incorrecto mediante epPCR producen mutaciones puntuales. Fragmentos cortos de ADN se ceban unos con otros basados en homología y se recombinan y re-ensamblan en termociclado repetido de longitud completa. La eliminación de moldes antes de este paso garantiza recombinantes con bajo número de progenitores. Este método, como la mayoría de otros, puede llevarse a cabo sobre múltiples iteraciones para desarrollar distintas propiedades. Esta tecnología impide el sesgo de secuencias, es independiente de la longitud del gen y requiere muy poco ADN progenitor para la aplicación.

[0248] En Recombinación Heterodúplex, se utiliza ADN de plásmido linearizado para formar heterodúplexes que se reparan por reparación de apareamientos erróneos (Volkov et al, *Nucleic Acids Res.* 27:e18 (1999); y Volkov et al., *Methods Enzymol.* 328:456-463 (2000)). El paso de reparación de apareamientos erróneos es por lo menos en alguna manera mutagénico. Los heterodúplexes se transforman más eficientemente que los homodúplexes lineales. Este método es apropiado para genes y operones grandes.

[0249] Quimeragénesis Aleatoria en Moldes Transitorios (RACHITT – *Random Chimeragenesis on Transient Templates*) (Coco et al., *Nat. Biotechnol.* 19:354-359 (2001)) emplea fragmentación de Dnasa I y fraccionamiento de tamaños de ADN monocatenario (ssDNA - *single stranded DNA*). Fragmentos homólogos se hibridan en la ausencia de polimerasa a un andamio de ADN monocatenario (*ssDNA scaffold*) complementario. Todos los extremos de fragmentos no hibridados, traslapantes, se recortan por una exonucleasa. Los vacíos (*gaps*) entre fragmentos se llenan y luego se ligan para producir un conjunto de hebras diversas de longitud completa, hibridadas al andamio, que contiene U para imposibilitar la amplificación. A continuación, se destruye el andamio y se reemplaza por una nueva hebra complementaria a la hebra diversa mediante amplificación por PCR. El método implica una hebra (andamio) que proviene de un solo progenitor, mientras que los fragmentos cebadores se derivan de otros genes, y el andamio progenitor se selecciona contra. En consecuencia, no ocurre re-hibridación con fragmentos progenitores. Los fragmentos traslapantes se recortan

con una exonucleasa. Por lo demás, esto es conceptualmente similar al barajado de ADN y StEP. En consecuencia, no debe haber hermanos, pocos inactivos, y progenitores sin barajar. Esta técnica tiene ventajas en que se crean pocos o ningunos genes progenitores, y pueden resultar más intercambios de material genético (*crossovers*) relativos al barajado de ADN estándar.

[0250] Extensión Recombinada en Moldes Truncados (RETT - *Recombined Extension on Truncated templates*) conlleva EL cambio de moldes de hebras que crecen unidireccionalmente a partir de cebadores en la presencia de fragmentos de ADN monocatenario unidireccional (*unidirectional ssDNA fragments*), usados como un conjunto de moldes (Lee et al., *J. Molec. Catalysis* 26:119-129 (2003)). No se usan ADN endonucleasas. El ADN monocatenario unidireccional se elabora por ADN polimerasa con cebadores aleatorios o deleción serial con exonucleasa. El ADN monocatenario unidireccional son únicamente moldes y no cebadores. El cebado aleatorio y las exonucleasas no introducen sesgo de secuencias (*sequence bias*) como es cierto de la escisión enzimática de barajado de ADN/RACHITT. RETT puede ser más fácil de optimizar que StEP, porque usa condiciones de PCR normal en lugar de extensiones muy cortas. La recombinación ocurre como un componente de los pasos de PCR, es decir, sin barajado directo. Este método puede ser asimismo más aleatorio que StEP, debido a la ausencia de pausas.

[0251] En Barajado de Genes con Oligonucleótidos Degenerados (DOGS - *Degenerate Oligonucleotide Gene Shuffling*), se usan cebadores degenerados para controlar la recombinación entre 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)) esto puede utilizarse para controlar la tendencia de otros métodos, tales como barajado de ADN, para regenerar genes progenitores. Este método puede combinarse con mutagenesis aleatoria (epPCR) de segmentos de genes seleccionados. Este puede ser un método excelente para bloquear la reformación de secuencias progenitoras. No se necesitan endonucleasas. Ajustando las concentraciones de entrada de los segmentos elaborados, se puede sesgar hacia un esqueleto deseado. Este método permite el barajado de ADN de progenitores no relacionados sin digestiones con enzimas de restricción y posibilita una elección de métodos de mutagénesis aleatoria.

[0252] Truncamiento Incremental para la Creación de Enzimas Híbridas (ITCHY - *Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzymes*) crea una biblioteca combinatoria con deleciones de 1 par de bases de un gen o fragmento

del 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)). Los truncamientos se introducen en dirección opuesta en piezas de 2 diferentes genes. Estos se ligan entre sí y las fusiones se clonan. Esta técnica no requiere homología entre los 2 genes progenitores. Cuando ITCHY se combina con barajado de ADN, el sistema se denomina SCRATCHY (véase a continuación). Una ventaja principal de los dos es el no requerimiento de homología entre genes progenitores; por ejemplo, fusiones funcionales entre *E. coli* y un gen humano se crearon mediante ITCHY. Cuando se elaboran bibliotecas ITCHY, se capturan todos los posibles intercambios de material genético (*crossovers*).

[0253] Truncamiento Tio-Incremental para la Creación de Enzimas Híbridas (THIO-ITCHY - *Thio-Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzymes*) es similar a ITCHY excepto que se usan dNTPs de fosfotioato para generar truncamientos (Lutz et al., *Nucleic Acids Res* 29:E16 (2001)). En relación con ITCHY, THIO-ITCHY puede ser más fácil de optimizar y aportar más reproducibilidad y ajustabilidad.

[0254] SCRATCHY combina dos métodos para recombinar genes, ITCHY y barajado de ADN (Lutz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11248-11253 (2001)). SCRATCHY combina las mejores características de ITCHY y el barajado de ADN. En primer lugar, ITCHY se usa para crear un conjunto exhaustivo de fusiones entre fragmentos de genes en una manera independiente de la homología del ADN. Esta familia artificial se somete entonces al paso de barajado de ADN para aumentar el número de intercambios de material genético (*crossovers*). Pueden usarse predicciones computacionales en la optimización. SCRATCHY es más efectivo que el barajado de ADN, cuando la identidad de secuencias está por debajo del 80%.

[0255] En Mutagénesis de Deriva Aleatoria (RNDM - *Random Drift Mutagenesis*) se hacen mutaciones mediante epPCR, seguidas por identificación selectiva/selección para aquellas que conservan actividad utilizable (Bergquist et al., *Biomol. Eng.* 22:63-72 (2005)). Luego, estas se usan en DOGS para generar recombinantes con fusiones entre múltiples mutantes activos o entre mutantes activos y algún otro progenitor deseable. Diseñada para promover el aislamiento de mutaciones neutras, su propósito es identificar selectivamente la actividad catalítica conservada, sin importar si esta actividad es más alta o más baja que en el gen original. RNDM es utilizable en análisis de alto rendimiento, cuando la detección selectiva es capaz de detectar actividad por encima del fondo. RNDM se

ha usado como un estado inicial (*front end*) a DOGS en generar diversidad. La técnica impone un requerimiento de actividad antes del barajado u otros pasos subsiguientes; las bibliotecas de deriva neutra son indicadas para tener como resultado mejoras más altas/más rápidas en actividad de bibliotecas más pequeñas. Aunque publicada usando epPCR, esto podría aplicarse a otros métodos de mutagénesis a gran escala.

[0256] Mutagénesis de Saturación de Secuencia (SeSaM - *Sequence Saturation Mutagenesis*) es un método de mutagénesis aleatoria que: 1) genera un conjunto de fragmentos de longitud aleatoria usando incorporación aleatoria de un nucleótido fosfotioato y escisión; este conjunto se utiliza como molde para 2) extender en la presencia de bases "universales" tales como inosina; 3) replicación de un complemento con contenido de inosina produce incorporación de bases aleatorias y, consecuentemente, mutagénesis (Wong et al., *Biotechnol. J.* 3:74-82 (2008); Wong et al., *Nucleic Acids Res.* 32:e26 (2004); y Wong et al., *Anal. Biochem.* 341:187-189 (2005)). Usando esta técnica puede ser posible generar una gran biblioteca de mutantes en 2 a 3 días empleando métodos sencillos. Esta técnica es no dirigida, en comparación con el sesgo mutacional de las ADN polimerasas. Diferencias en este enfoque hacen esta técnica complementaria (o una alternativa) a epPCR.

[0257] En el Barajado Sintético, se diseñan oligonucleótidos traslapantes para codificar "toda la diversidad genética en dianas" y permitir una diversidad muy alta para la progenie barajada (Ness et al., *Nat. Biotechnol.* 20:1251-1255 (2002)). En esta técnica, se pueden diseñar los fragmentos que se van a barajar. Esto ayuda a incrementar la diversidad resultante de la progenie. Se pueden diseñar sesgos de secuencias/codones para hacer que secuencias más distantemente relacionadas se recombinen en porcentajes que se aproximan a los observadas con secuencias más cercanamente relacionadas. Además, la técnica no requiere poseer físicamente los genes del molde.

[0258] La Tecnología de Escisión e Intercambio de Nucleótidos NexT (*Nucleotide Exchange and Excision Technology*) aprovecha una combinación de la incorporación de dUTP, seguida por tratamiento con uracil ADN glucosilasa y, luego, piperidina para realizar fragmentación de ADN de punto final (Muller et al., *Nucleic Acids Res.* 33:e117 (2005)). El gen se re-ensambla usando extensión de cebadores de PCR interna con polimerasa con lectura de prueba (*proofreading polymerase*). Los tamaños para el barajado se pueden controlar directamente usando razones dUPT::dTTP variables. Esta es una reacción de punto final que

emplea métodos sencillos para la incorporación y escisión de uracilo. Con este método pueden usarse otros análogos de nucleótidos, tales como 8-oxo-guanina. Adicionalmente, la técnica funciona bien con fragmentos muy cortos (86 bp) y tiene un bajo índice de error. La escisión química de ADN utilizada en esta técnica tiene como resultado muy pocos clones sin barajar.

[0259] En Recombinación de Proteínas Independiente de la Homología de Secuencia (SHIPREC - *Sequence Homology-Independent Protein Recombination*), se utiliza un conector (*linker*) para facilitar la fusión entre dos genes distantemente relacionados o no relacionados. Se emplea tratamiento con nucleasa para generar una gama de quimeras entre los dos genes. Estas fusiones tienen como resultado bibliotecas de híbridos de intercambio único de material genético (Sieber et al., *Nat. Biotechnol.* 19:456-460 (2001)). Esto produce un tipo limitado de barajado y se requiere un proceso separado para la mutagénesis. Adicionalmente, puesto que no se requiere homología, esta técnica puede crear una biblioteca de quimeras con funciones variables de cada uno de los dos genes progenitores no relacionados. SHIPREC fue ensayado con un dominio de unión al grupo hemo de un CP450 bacteriano fusionado a regiones N-terminales de un CP450 de mamífero; este produjo actividad de mamífero en una enzima más soluble.

[0260] En Gene Site Saturation Mutagenesis™ (GSSM™) los materiales de partida son un plásmido de ADN monocatenario superenrollado (*supercoiled dsDNA plasmid*) que contiene un inserto y dos cebadores que son degenerados en el sitio deseado de las mutaciones (Kretz et al., *Methods Enzymol.* 388:3-11 (2004)). Cebadores que portan la mutación de interés se hibridan a la misma secuencia en hebras opuestas de ADN. La mutación está normalmente en el centro del cebador y se flanquea en cada lado por aproximadamente 20 nucleótidos de la secuencia correcta. La secuencia en el cebador es NNN o NNK (codificante) y MNN (no codificante) (N = todos 4, K = G, T, M = A, C). Luego de la extensión, se usa DpnI para digerir ADN dam-metilado para eliminar el molde silvestre (*wild-type template*). Esta técnica explora todas las posibles sustituciones de aminoácidos en un locus dado (es decir, un codón). La técnica facilita la generación de todos los posibles reemplazos en un sitio único sin codones de terminación (*nonsense codons*) y tiene como resultado una representación igual o cuasi-igual de la mayoría de alelos posibles. Esta técnica no requiere el conocimiento previo de la estructura, mecanismo, o dominios de la enzima diana. Si es seguida por barajado o reensamblado de genes, esta tecnología crea una biblioteca diversa de recombinantes que contienen todas las combinaciones

posibles de mutaciones puntuales, que aumentan la tasa de transcripción (*single-site up-mutations*). La utilidad de esta combinación de tecnologías se ha demostrado para la exitosa evolución de más de 50 enzimas diferentes e, igualmente, para más de una propiedad en una enzima dada.

[0261] Mutagénesis con Inserción de Casete Combinatorio (CCM - *Combinatorial Cassette Mutagenesis*) implica el uso de casetes de oligonucleótidos cortos para reemplazar regiones limitadas con un gran número de posibles alteraciones de secuencia de aminoácidos (Reidhaar-Olson et al. *Methods Enzymol.* 208:564-586 (1991); y Reidhaar-Olson et al. *Science* 241:53-57 (1988)). Usando está técnica son posibles sustituciones simultáneas en dos o tres sitios. Adicionalmente, el método analiza una gran multiplicidad de posibles cambios de secuencia en una gama limitada de sitios. Esta técnica se ha utilizado para explorar el contenido de información del dominio de unión de ADN del represor lambda.

[0262] Mutagénesis de Casete Múltiple Combinatorio (CMCM - *Combinatorial Multiple Cassette Mutagenesis*) es esencialmente similar a CCM, excepto que se emplea como parte de un programa más amplio: 1) uso de epPCR con una tasa elevada de mutaciones para 2) identificar puntos decisivos y regiones decisivas (*hot spots and hot regions*) y luego 3) extensión por CMCM para cubrir una región definida de espacio de la secuencia proteica (Reetz et al., *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 40:3589-3591 (2001)). Al igual que con la CCM, este método puede examinar virtualmente todas las posibles alteraciones sobre una región diana. Si se emplea junto con métodos para crear mutaciones aleatorias y genes barajados, ofrece un medio excelente de generar diversas proteínas barajadas. Este enfoque fue exitoso en incrementar, en 51 veces, la enantioselectividad de una enzima.

[0263] En la técnica de Cepas Mutadoras (*Mutator Strains technique*), plásmidos mutadores *ts* condicionales permiten aumentos de 20 a 4000-X en la frecuencia de mutación aleatoria y natural durante la selección y acumulación en bloque de mutaciones destructoras, cuando no se requiere selección (Selifonova et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3645-3649 (2001)). Esta tecnología se basa en un gen *mutD5* derivado de un plásmido, el cual codifica una subunidad mutante de ADN polimerasa III. Esta subunidad se une a ADN polimerasa III endógena y compromete la capacidad de lectura de prueba de la polimerasa III en cualquier cepa que aloje el plásmido. Ocurre un amplio espectro de sustituciones de bases y mutaciones de marco de lectura. Con el fin de obtener un uso efectivo, el plásmido mutador debe eliminarse una vez se obtenga el fenotipo deseado; esto se logra

mediante un origen de replicación sensible a temperatura (ts - *temperature sensitive*), que permite que el plásmido cure a 41°C. Debe anotarse que cepas mutadoras se han explorado ya hace algún tiempo (véase Low et al., *J. Mol. Biol.* 260:359-3680 (1996)). En esta técnica, se observan índices de mutación espontánea muy altos. La propiedad condicional minimiza mutaciones de fondo no deseadas. Esta tecnología podría combinarse con evolución adaptativa para mejorar los índices de mutagénesis y lograr más rápidamente los fenotipos deseados.

[0264] Look-Through Mutagenesis (LTM) es un método de mutagénesis multidimensional que evalúa y optimiza mutaciones combinatorias de aminoácidos seleccionados (Rajpal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:8466-8471 (2005)). En lugar de saturar cada sitio con todos los posibles cambios de aminoácidos, se elige un conjunto de nueve para cubrir la gama de química del grupo R aminoácido. Pocos cambios por sitio permiten someter muchos sitios a este tipo de mutagénesis. Gracias a este método, se ha logrado un incremento >800 veces en la afinidad de unión para un anticuerpo de nanomolar a picomolar. Este es un enfoque razonable para minimizar el número de combinaciones aleatorias y puede aumentar la capacidad de encontrar rasgos mejorados, disminuyendo en gran medida los números de los clones que se van a identificar selectivamente. Esto se ha aplicado a la ingeniería de anticuerpos, específicamente para incrementar la afinidad de unión y/o reducir la disociación. La técnica puede combinarse con identificaciones selectivas o selecciones.

[0265] El Re-ensamblado de Genes es un método de barajado de ADN que puede aplicarse a múltiples genes a la vez o para crear una gran biblioteca de quimeras (mutaciones múltiples) de un solo gen (Tunable GeneReassembly™ (TGR™) Tecnología suministrada por Verenium Corporation). Típicamente esta tecnología se emplea en combinación con identificación selectiva de rendimiento ultra elevado para buscar el espacio de secuencia representada para mejoras deseadas. Esta técnica permite la recombinación de genes múltiples, independiente de la homología. El número exacto y la posición de eventos de intercambios de material genético pueden pre-determinarse usando fragmentos diseñados mediante análisis bioinformático. Esta tecnología conlleva un nivel muy elevado de diversidad con virtualmente ninguna reformación de genes progenitores y un bajo nivel de genes inactivos. Combinada con GSSM™, puede analizarse una extensa gama de mutaciones con respecto a actividad mejorada. El

método permite el "mezclado" y el "ajuste fino" del barajado de ADN, por ejemplo, [con lo cual] puede optimizarse la utilización de codones.

[0266] La Automatización del Diseño de Proteínas (PDA - *Protein Design Automation*) *in silico* es un algoritmo de optimización que ancla el esqueleto proteico estructuralmente definido, que posee un plegamiento particular, y busca el espacio de secuencia para sustituciones de aminoácidos que pueden estabilizar el plegamiento y la energética proteica general (Hayes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:15926-15931 (2002)). Esta tecnología utiliza predicciones de entropía basadas en una estructura *in silico*, con el fin de investigar la tolerancia estructural a variaciones de aminoácidos de proteínas. Mecánica estadística se aplica para calcular interacciones de acoplamiento en cada posición. La tolerancia estructural a la sustitución de aminoácidos es una medida de acoplamiento. En última instancia, esta tecnología se diseña para producir modificaciones deseadas de propiedades de las proteínas, manteniendo al mismo tiempo la integridad de las características estructurales. El método evalúa computacionalmente y permite la filtración de un número muy grande de posibles variantes de secuencia (10^{50}). La selección de variantes de secuencia a examinar se relaciona con predicciones basadas en la termodinámica más favorable. Ostensiblemente solo pueden abordarse efectivamente con esta tecnología la estabilidad, o las propiedades que se asocian con estabilidad. El método se ha empleado exitosamente en algunas proteínas terapéuticas, especialmente en ingeniería de inmunoglobulinas. Predicciones *in silico* evitan examinar números extraordinariamente grandes de variantes potenciales. Predicciones basadas en estructuras tri-dimensionales existentes tienden a ser más exitosas que las predicciones basadas en estructuras hipotéticas. Esta tecnología puede predecir fácilmente y permitir la identificación selectiva focalizada de múltiples mutaciones simultáneas, algo imposible con tecnologías puramente experimentales, debido a aumentos exponenciales en los números.

[0267] Mutagénesis de Saturación Iterativa (ISM - *Iterative Saturation Mutagenesis*) implica: 1) usar el conocimiento de la estructura/función para elegir un sitio probable para el mejoramiento de enzimas; 2) realizar mutagénesis de saturación en un sitio seleccionado usando un método de mutagénesis tal como Stratagene QuikChange (Stratagene; San Diego CA); 3) identificar selectivamente/seleccionar las propiedades deseadas; y 4) emplear clon(es) mejorado(s), empezar de nuevo en otro sitio y continuar repitiendo hasta que se obtenga 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)). Esta es una metodología comprobada, que garantiza la realización de todos los posibles reemplazos en una posición dada para la identificación selectiva/selección.

[0268] Cualquiera de los métodos ya mencionados para mutagénesis puede usarse solo o en cualquier combinación. Adicionalmente, uno cualquiera o una combinación de los métodos de evolución dirigida puede usarse conjuntamente con técnicas de evolución adaptativa, como se describe aquí.

EJEMPLO I

Enzimas de Vías Ejemplares de Ácido Metacrílico

[0269] Este ejemplo describe vías ejemplares para la producción de ácido metacrílico.

[0270] Figura 1 presenta vías ejemplares a MAA a partir de acetil-CoA y piruvato mediante el intermediario citramalato. Se muestran asimismo vías a MAA a partir de aconitato. En una vía, acetil-CoA y piruvato se convierten primero en citramalato por citramalato sintasa. La deshidratación de citramalato puede producir citraconato (Paso B) o mesaconato (Paso C). Mesaconato y citraconato se interconvierten por una *cis/trans* isomerasa en Paso G. La descarboxilación de mesaconato (Paso H) o citraconato (Paso C) produce MAA. En una vía alternativa, se forma citramalato a partir de acetil-CoA y piruvato mediante un intermediario citramalil-CoA en Pasos D y E, catalizado por citramalil-CoA liasa y citramalil-coA hidrolasa, transferasa o sintetasa.

[0271] Se ejemplifican igualmente vías a MAA a partir de aconitato. En una vía, aconitato se descarboxila primero a itaconato por aconitato descarboxilasa (Paso I). El itaconato se isomeriza entonces a citraconato por itaconato delta-isomerasa (Paso J). La conversión de citraconato a MAA procede directamente por descarboxilación o indirectamente mediante mesaconato. En una vía alternativa, el intermediario itaconato se convierte primero en itaconil-CoA por una CoA transferasa o sintetasa (Paso L). La hidratación de itaconil-CoA produce citramalil-CoA, la cual puede luego convertirse en MAA como ya se describió y se ilustra en Figura 1.

[0272] Tabla 1 muestra clases de enzimas que pueden realizar los pasos descritos en Figura 1. Enzimas ejemplares se describen con más detalle a continuación.

Tabla 1. Clases de enzimas para las enzimas mostradas en Figura 1.

Etiqueta	Función	Paso
2.3.1.a	Sintasa	A
2.8.3.a	Coenzima-A transferasa	E, L
3.1.2.a	Tioléster hidrolasa (específica de CoA)	E
4.1.1.a	Descarboxilasa	C, H, J
4.1.3.a	Liasa	D
4.2.1.a	Deshidratasa	B, F, K
5.2.1.a	*Cis/trans* isomerasa	G
5.3.3.a	Delta-Isomerasa	I
6.2.1.a	Ácido-tiol ligasa	E, L

[0273] EC 2.3.1.a Sintasa (Paso A). Citramalato sintasa (EC 2.3.1.182) cataliza la conversión de acetil-CoA y piruvato en citramalato y coenzima A. La enzima participa en la vía independiente de treonina de la biosíntesis de isoleucina encontrada en arqueas tales como *Methanocaldococcus jannaschii* (Howell et al., *J Bacteriol.* 181:331-333 (1999)), *Leptospira interrrogans* (Xu et al., *J Bacteriol.* 186:5400-5409 (2004)) y *Geobacter sulfurreducens* (Risso et al., *J Bacteriol.* 190:2266-2274 (2008)). Esta enzima opera en la dirección sintética *in vivo*, es altamente específica para piruvato como sustrato y, normalmente, se inhibe por isoleucina. Una citramalato sintasa recombinante de *M. jannaschii* desarrollada por evolución dirigida es altamente activa y carece de inhibición por isoleucina (Atsumi et al., *Appl Environ Microbiol* 74:7802-7808 (2008)). Actividad ditramalato sintasa se demostró asimismo en la vía de asimilación de acetato del ciclo citramalato de *Rhodospirillum rubrum*, aunque el gen asociado con esta actividad no se ha identificado (Berg et al., *Mikrobiologiia* 78:22-31 (2009)).

Gen	GenBank	Número GI	Organismo
CimA	Q58787.1	2492795	*Methanocaldococcus jannaschii*
CimA	ABK13749.1	116664671	*Leptospira interrrogans*
CimA	ADI84633.1	298505910	*Geobacter sulfurreducens*

[0274] EC 2.8.3.a CoA transferasa (Paso E). CoA transferasas catalizan la transferencia reversible de una fracción CoA de una molécula a otra. Dos transformaciones en Figura 1 utilizan una CoA transferasa: conversión de citramalil-CoA en citramalato (Paso E) y activación de itaconato a itaconil-CoA

(Paso L). Citramalil-CoA transferasa (EC 2.8.3.7 y 2.8.3.11) en Paso E de Figura 1 transporta una fracción CoA de citramalil-CoA a un donador. Una enzima citramalato:succinil-CoA transferasa es activa en el ciclo de 3-hidroxipropionato de la asimilación de glioxilato. La enzima se codifica por *sst* en *Chloroflexus aurantiacus,* en donde se localiza corriente arriba del gen que codifica citramalil-CoA liasa (Friedmann et al., *J Bacteriol.* 188:6460-6468 (2006)). Esta enzima se clonó, se expresó heterólogamente y se caracterizó en *E. coli.* La enzima es también activa como una itaconato:succinil-CoA transferasa. Enzimas similares se encuentran en *Roseiflexus* sp. RS-1 y *Chloroflexus aggregans* por identidad de secuencia y proximidad al gen de la citramalil-CoA liasa. Una CoA transferasa caracterizada en *Pseudomonas* sp. B2aba exhibe las dos actividades citramalail-CoA transferasa e itaconil-CoA transferasa, permitiéndole al organismo crecer tanto en itaconato como en citramalato (Cooper et al., *Biochem.J* 91:82-91 (1964)). El gen asociado con esta enzima no se ha identificado. La actividad citramalil-CoA transferasa se detectó igualmente en extractos de células de *Achromobacter xylosoxydans*, que convierte eficientemente itaconato en citramalato (He et al., *J Biosci Bioeng.* 89:388-391 (2000)). El gen asociado no se conoce, pero el gen porta la máxima similitud de secuencia proteica *Sst.*

Gen	**GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
Sst	YP_001635864.1	163847820	*Chloroflexus aurantiacus*
RoseRS_0050	YP_001274443.1	148654238	*Roseiflexus* sp. RS-1
Cagg_3093	YP_002464387.1	219849954	*Chloroflexus aggregans*
AXYL_05983	YP_003981992.1	311109139	*Achromobacter xylosoxydans*

[0275] Enzimas candidatas adicionales para catalizar estas transformaciones incluyen los productos de los genes *cat1*, *cat2*, y *cat3* de *Clostridium kluyveri,* que se ha demostrado que exhiben actividad succinil-CoA, 4-hidroxibutiril-CoA, y butiril-CoA transferasa, respectivamente (Seedorf et al., *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 105:2128-2133 (2008); Sohling et al., *J Bacteriol.* 178:871-880 (1996)). Actividades CoA transferasa similares están asimismo presentes en *Trichomonas vaginalis* (van Grinsven et al., *J.Biol.Chem.* 283:1411-1418 (2008)) y *Trypanosoma brucei* (Riviere et al., *J.Biol.Chem.* 279:45337-45346 (2004)).

Proteína	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**

cat1	P38946.1	729048	*Clostridium kluyveri*
cat2	P38942.2	172046066	*Clostridium kluyveri*
cat3	EDK35586.1	146349050	*Clostridium kluyveri*
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	*Trichomonas vaginalis G3*
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	*Trypanosoma brucei*

[0276] La enzima glutaconil-CoA-transferasa (EC 2.8.3.12) de la bacteria anaerobia *Acidaminococcus fermentans* reacciona con glutaconil-CoA y 3-butenoil-CoA (Mack et al., *Eur.J.Biochem.* 226:41-51 (1994)), sustratos similares en estructura a 2,3-dehidroadipil-CoA. Los genes que codifican esta enzima son *gctA* y *gctB*. Esta enzima tiene actividad reducida pero detectable con otros derivados CoA, incluyendo glutaril-CoA, 2-hidroxiglutaril-CoA, adipil-CoA, crotonil-CoA y acrilil-CoA (Buckel et al., *Eur.J Biochem.* 118:315-321 (1981)). La enzima se ha clonado y expresado en *E. coli* (Mack et al., *Eur.J.Biochem.* 226:41-51 (1994)). Actividad glutaconato CoA-transferasa se ha detectado asimismo en *Clostridium sporosphaeroides* y *Clostridium symbiosum*. Enzimas glutaconato CoA-transferasa adicionales pueden inferirse por homología con la secuencia proteica de *Acidaminococcus fermentans*.

Proteína	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
gctA	CAA57199.1	559392	*Acidaminococcus fermentans*
gctB	CAA57200.1	559393	*Acidaminococcus fermentans*
gctA	ACJ24333.1	212292816	*Clostridium symbiosum*
gctB	ACJ24326.1	212292808	*Clostridium symbiosum*
gctA	NP_603109.1	19703547	*Fusobacterium nucleatum*
gctB	NP_603110.1	19703548	*Fusobacterium nucleatum*

[0277] Una CoA transferasa que puede utilizar acetil-CoA como donador CoA es acetoacetil-CoA transferasa, codificada por los genes *atoA* (subunidad alfa) y *atoD* (subunidad beta) de *E. coli* (Korolev et al., *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 58:2116-2121 (2002); Vanderwinkel et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 33:902-908 (1968)). Esta enzima tiene una amplia gama de sustratos (Sramek et al., *Arch.Biochem.Biophys.* 171:14-26 (1975)) y se ha demostrado que transporta la fracción funcional CoA a acetato de una variedad de sustratos acil-CoA ramificados y lineales, incluyendo isobutirato (Matthies et al., *Appl Environ.Microbiol* 58:1435-1439 (1992)), valerato (Vanderwinkel et al.,

Biochem.Biophys.Res.Commun. 33:902-908 (1968)) y butanoato (Vanderwinkel et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 33:902-908 (1968)). Esta enzima se induce en el nivel transcripcional por acetoacetato, de modo que la modificación del control regulador puede ser útil para generar esta enzima en una vía mediante ingeniería genética (Pauli et al., *Eur.J Biochem.* 29:553-562 (1972)). Enzimas similares existen en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Duncan et al., *Appl.Environ.Microbiol* 68:5186-5190 (2002)), *Clostridium acetobutylicum* (Cary et al., *Appl.Environ.Microbiol* 56:1576-1583 (1990); Wiesenborn et al., *Appl.Environ.Microbiol* 55:323-329 (1989)), y *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kosaka et al., *Biosci.Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007)).

Gen	**No. de Accesión**	**Número GI**	**Organismo**
atoA	P76459.1	2492994	*Escherichia coli*
atoD	P76458.1	2492990	*Escherichia coli*
actA	YP_226809.1	62391407	*Corynebacterium glutamicum*
cg0592	YP_224801.1	62389399	*Corynebacterium glutamicum*
ctfA	NP_149326.1	15004866	*Clostridium acetobutylicum*
ctfB	NP_149327.1	15004867	*Clostridium acetobutylicum*
ctfA	AAP42564.1	31075384	*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*
ctfB	AAP42565.1	31075385	*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*

[0278] EC 3.2.1.a CoA hidrolasa (Paso E). Enzimas en la familia 3.1.2 hidrolizan moléculas de acil-CoA a sus correspondientes ácidos. Varias CoA hidrolasas con amplias gamas de sustratos son candidatas apropiadas para exhibir actividad citramalil-CoA hidrolasa. Por ejemplo, la enzima codificada por *acot12* del cerebro de *Rattus norvegicus* (Robinson et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 71:959-965 (1976)) puede reaccionar con butiril-CoA, hexanoil-CoA y malonil-CoA. La ácido dicarboxílico tioesterasa humana, codificada por *acot8,* exhibe actividad en glutaril-CoA, adipil-CoA, suberil-CoA, sebacil-CoA, y dodecanodioil-CoA (Westin et al., *J.Biol.Chem.* 280:38125-38132 (2005)). El homólogo más cercano de *E. coli* a esta enzima, *tesB*, puede hidrolizar igualmente una gama de CoA tiolésteres (Naggert et al., *J Biol Chem* 266:11044-

11050 (1991)). Una enzima similar se ha caracterizado también en el hígado de rata (Deana R., *Biochem Int* 26:767-773 (1992)). Enzimas adicionales con actividad hidrolasa en *E. coli* incluyen *ybgC*, *paaI*, y *ybdB* (Kuznetsova, et al., FEMS Microbiol Rev, 2005, 29(2):263-279; Song et al., J Biol Chem, 2006, 281(16):11028-38). Aunque su secuencia no se ha reportado, la enzima 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 (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)).

Nombre del Gen	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
acot12	NP_570103.1	18543355	*Rattus norvegicus*
tesB	NP_414986	16128437	*Escherichia coli*
acot8	CAA15502	3191970	*Homo sapiens*
acot8	NP_570112	51036669	*Rattus norvegicus*
tesA	NP_415027	16128478	*Escherichia coli*
ybgC	NP_415264	16128711	*Escherichia coli*
paaI	NP_415914	16129357	*Escherichia coli*
ybdB	NP_415129	16128580	*Escherichia coli*
ACH1	NP_009538	6319456	*Saccharomyces cerevisiae*

[0279] Todavía otra hidrolasa candidata es la glutaconato CoA-transferasa de *Acidaminococcus fermentans*. Esta enzima se transforma por mutagenesis dirigida al sitio en una acil-CoA hidrolasa con actividad en glutaril-CoA, acetil-CoA y 3-butenoil-CoA (Mack et al., *FEBS.Lett.* 405:209-212 (1997)). Esto indica que las enzimas que codifican succinil-CoA:3-cetoácido-CoA transferasas y acetoacetil-CoA:acetil-CoA transferasas pueden servir asimismo como candidatas para este paso de reacción, con mutaciones apropiadas introducidas para cambiar su función, como ya se describió.

Gen	**GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
gctA	CAA57199	559392	*Acidaminococcus fermentans*
gctB	CAA57200	559393	*Acidaminococcus fermentans*

[0280] EC 4.1.1.a Descarboxilasa (Pasos C, H, J). El paso final de MAA en Figura 1 es la descarboxilación de mesaconato o citraconato. Aunque enzimas con actividad citraconato o mesaconato descarboxilasa no se han identificado hasta la fecha, enzimas candidatas apropiadas incluyen aconitato descarboxilasa (EC 4.1.1.6), la cual cataliza la conversión de aconitato en itaconato, 4-oxalocrotonato descarboxilasa (EC 4.1.1.77), la cual cataliza la conversión de 4-oxalocrotonato en 2-oxopentenoato, y enzimas en la familia cinnamato descarboxilasa (EC 4.1.1.-). La aconitato descarboxilasa (EC 4.1.1.6) cataliza el paso final en la biosíntesis de itaconato en una cepa de *Candida* e igualmente en el hongo filamentoso *Aspergillus terreus* (Bonnarme et al. *J Bacteriol.* 177:3573-3578 (1995); Willke and Vorlop, *Appl Microbiol. Biotechnol* 56:289-295 (2001)). Una cis-aconitato descarboxilasa (CAD – *cis-aconitate decarboxylase*) (EC 4.1.16) se ha purificado y caracterizado de *Aspergillus terreus* (Dwiarti et al., *J. Biosci. Bioeng.* 94(1): 29-33 (2002)). Recientemente, el gen se ha clonado y caracterizado funcionalmente (Kanamasa et al., *Appl.Microbiol Biotechnol* 80:223-229 (2008)) y (WO/2009/014437). Varios homólogos cercanos de CAD se relacionan más adelante (EP 2017344A1; WO 2009/014437 A1). El gen y la secuencia proteica se reportaron previamente (EP 2017344 A1; WO 2009/014437 A1), junto con varios homólogos cercanos listados a continuación.

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

[0281] La 4-oxalocronato descarboxilasa cataliza la descarboxilación de 4-oxalocrotonato a 2-oxopentanoato. Esta enzima se ha aislado de numerosos organismos y se ha caracterizado. Los genes que codifican esta enzima incluyen *dmpH* y *dmpE* en *Pseudomonas sp. (cepa 600)* (Shingler et al., 174:711-724 (1992)), *xylII* y *xylIII* de *Pseudomonas putida* (Kato et al., *Arch.Microbiol* 168:457-463 (1997); Stanley et al., *Biochemistry* 39:3514 (2000); Lian et al., *J.Am.Chem.Soc.* 116:10403-10411 (1994)) y *Reut_B5691* y *Reut_B5692* de *Ralstonia eutropha JMP134* (Hughes et al., 158:79-83 (1984)). Los genes que codifican la enzima de *Pseudomonas sp. (cepa 600)* se han clonado y expresado en *E. coli* (Shingler et al., *J. Bacteriol.* 174:711-724 (1992)). La 4-oxalocrotonato descarboxilasa codificada por *xylI* en *Pseudomonas putida* funciona en un complejo con vinilpiruvato hidratasa. Se ha caracterizado una forma recombinante de esta enzima desprovista de la actividad hidratasa y que conserva actividad descarboxilasa silvestre (Stanley et al., *Biochem.* 39:718-26 (2000)). Una enzima similar se encuentra en *Ralstonia pickettii* (anteriormente *Pseudomonas pickettii*) (Kukor et al., *J Bacteriol.* 173:4587-94 (1991)).

Gen	**GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
dmpH	CAA43228.1	45685	*Pseudomonas sp. CF600*
dmpE	CAA43225.1	45682	*Pseudomonas sp. CF600*
xylII	YP_709328.1	111116444	*Pseudomonas putida*
xylIII	YP_709353.1	111116469	*Pseudomonas putida*
Reut_B5691	YP_299880.1	73539513	*Ralstonia eutropha JMP134*
Reut_B5692	YP_299881.1	73539514	*Ralstonia eutropha JMP134*
xylI	P49155.1	1351446	*Pseudomonas putida*
tbuI	YP_002983475.1	241665116	*Ralstonia pickettii*

[0282] Finalmente, se ha caracterizado una clase de descarboxilasas que catalizan la conversión de cinnamato (fenilacrilato) y derivados de cinnamato sustituido en sus correspondientes derivados de estireno. Estas enzimas son comunes en una variedad de organismos, y genes específicos que codifican estas enzimas, los cuales se han clonado y expresado en *E. coli*, incluyen: *pad 1* de *Saccharomyces cerevisae* (Clausen et al., *Gene* 142:107-112 (1994)), *pdc* de *Lactobacillus plantarum* (Barthelmebs et al., 67:1063-1069 (2001); Qi et al., *Metab*

Eng 9:268-276 (2007); Rodriguez et al., *J.Agric.Food Chem.* 56:3068-3072 (2008)), *pofK* (*pad*) de *Klebsiella oxytoca* (Uchiyama et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 72:116-123 (2008); Hashidoko et al., *Biosci.Biotech.Biochem.* 58:217-218 (1994)) , *Pedicoccus pentosaceus* (Barthelmebs et al., 67:1063-1069 (2001)), y *padC* de *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* (Shingler et al., 174:711-724 (1992)). Una ácido ferúlico descarboxilasa de *Pseudomonas fluorescens* se ha purificado y caracterizado igualmente (Huang et al., *J.Bacteriol.* 176:5912-5918 (1994)). La enzimas en esta clase son estables y no requieren co-factores exógenos o ligados internamente, haciendo así estas enzimas idealmente apropiadas para biotransformaciones (Sariaslani, *Annu.Rev.Microbiol.* 61:51-69 (2007)).

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

[0283] Otra enzima apropiada es ácido sórbico descarboxilasa que convierte ácido sórbico en 1,3-pentadieno. La descarboxilación de ácido sórbico por *Aspergillus niger* requiere tres genes: *padA1*, *ohbA1*, y *sdrA* (Plumridge et al. *Fung. Genet. Bio*, 47:683-692 (2010). *PadA1* se anota como una ácido fenilacrílico descarboxilasa, *ohbA1* es una ácido 4-hidroxibenzoico descarboxilasa hipotética, y *sdrA* es un regulador de ácido sórbico descarboxilasa. Se ha demostrado que especies adicionales descarboxilan también ácido sórbico, incluyendo varias especies de hongos y levaduras (Kinderlerler and Hatton, *Food Addit Contam.*, 7(5):657-69 (1990); Casas et al., *Int J Food Micro.*, 94(1):93-96 (2004); Pinches and Apps, *Int. J. Food Microbiol.* 116: 182–185 (2007)). Por ejemplo, se ha demostrado que *Aspergillus oryzae* y *Neosartorya fischeri* descarboxilan ácido sórbico y tienen homólogos cercanos a *padA1*, *ohbA1*, y *sdrA*.

Nombre del Gen	ID GenBank	Número GI	Organismo
padA1	XP_001390532.1	145235767	*Aspergillus niger*

ohbA1	XP_001390534.1	145235771	*Aspergillus niger*
sdrA	XP_001390533.1	145235769	*Aspergillus niger*
padA1	XP_001818651.1	169768362	*Aspergillus oryzae*
ohbA1	XP_001818650.1	169768360	*Aspergillus oryzae*
sdrA	XP_001818649.1	169768358	*Aspergillus oryzae*
padA1	XP_001261423.1	119482790	*Neosartorya fischeri*
ohbA1	XP_001261424.1	119482792	*Neosartorya fischeri*
sdrA	XP_001261422.1	119482788	*Neosartorya fischeri*

[0284] Cada una de las descarboxilasas listadas anteriormente representa una posible enzima apropiada para descarboxilar mesaconato o citraconato. Si la actividad o productividad deseada de la enzima no se observa en las conversiones deseadas, las enzimas descarboxilasas pueden desarrollarse usando métodos conocidos de ingeniería de proteínas para alcanzar el desempeño requerido. Es importante destacar que, mediante el uso de enzimas quiméricas, se ha demostrado que la región C-terminal de las descarboxilasas parece ser responsable de la especificidad del sustrato (Barthelmebs et al., AEM 67, 1063-1069 (2001)). Por consiguiente, experimentos de evolución dirigida para ampliar la especificidad de descarboxilasas, con el fin de alcanzar actividad con mesaconato o citraconato, pueden enfocarse en la región C-terminal de estas enzimas.

[0285] EC 4.1.3.a Liasa (Paso D). Citramalil-CoA liasa (EC 4.1.3.25) convierte acetil-CoA y piruvato en citramalil-CoA, mostrada en el Paso D de Figura 1. Esta enzima participa en el ciclo de 3-hidroxipropionato (3-HP) de la asimilación de glioxilato, donde actúa en la dirección de degradar citramalil-CoA. La enzima se codifica por el gen *ccl* en la bacteria fototrófica verde no sulfurosa *Chloroflexus aurantiacus* (Friedmann et al., *J Bacteriol.* 189:2906-2914 (2007)), donde se localiza corriente abajo de un gen que codifica citramalil-CoA transferasa. El gen *ccl* se clonó y expresó heterólogamente en *E. coli*. Grupos (*clusters*) de genes similares se encuentran en *Roseiflexus* sp. RS-1 y *Chloroflexus aggregans*, aunque hasta la fecha las enzimas no se han caracterizado. El ciclo de 3-HP es también activo en *Rhodobacter sphaeroides*, cuyo genoma codifica una proteína con alta similitud de secuencia con el producto del gen ccl (Filatova et al., *Mikrobiologiia* 74:319-328 (2005)). Se demostró que la citramalil-CoA liasa de *Bacillus* sp. era reversible, aunque el gen asociado no se ha identificado hasta la fecha (Sasaki et al., *J Biochem.* 73:599-608 (1973)).

Gen	GenBank	Número GI	Organismo
Caur_2265	YP_001635863.1	163847819	*Chloroflexus aurantiacus*
RoseRS_0049	YP_001274442.1	148654237	*Roseiflexus* sp. RS-1
Cagg_3093	YP_002464386.1	219849953	*Chloroflexus aggregans*
Rsph17029_1172	YP_001043054.1	126461940	*Rhodobacter sphaeroides*

[0286] EC 4.2.1.a Deshidratasa (Pasos B, F). La deshidratación de citramalato a citraconato en Paso B de Figura 1 se cataliza por una enzima con actividad citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (EC 4.2.1.35). Esta enzima, junto con la citramalato sintasa, participa en la vía de la biosíntesis de isoleucina independiente de treonina caracterizada en *Methanocaldococcus jannaschii* y *Leptospira interrrogans*. La deshidratación de citramalato en estos organismos se cataliza por isopropilmalato isomerasa (IPMI), la cual cataliza tanto la deshidratación de citramalato a citraconato como la subsiguiente trans-adición de agua a citraconato para formar metilmalato (Xu et al., *J Bacteriol.* 186:5400-5409 (2004); Drevland et al., *J Bacteriol.* 189:4391-4400 (2007)). La homoaconitasa de *M. jannaschii* (EC 4.2.1.114), codificada por *hacAB*, es asimismo una candidata apropiada, y se han caracterizado mutantes de esta enzima con especificidad de sustrato alterada y actividad isopropilmalato isomerasa (Jeyakanthan et al., *Biochemistry* 49:2687-2696 (2010)). Los genes IPMI de *L. interrogans* se clonaron en *E. coli*, donde fueron capaces de complementar cepas deficientes en actividad aconitasa nativa cuando se expresaron conjuntamente (Xu et al., *J Bacteriol.* 186:5400-5409 (2004)). La citramalato deshidratasa se ha caracterizado igualmente en *Pseudomonas putida,* donde participa en la degradación de 3,5-xilenol. Los genes que codifican las enzimas de esta vía, incluyendo citramalato deshidratasa, se localizan en el plásmido transmisible pRA500, y se han clonado en *E. coli* (Jain, Appl. Microbiol. Biotechnol., 45:502-508 (1996)). El citraconato es asimismo un sustrato de la enzima 3-isopropilmalato deshidratasa de la *Saccharomyces cerevisiae* (EC 4.2.1.33) codificada por *LEU1* (Kohlhaw, *Methods Enzymol.* 166:423-429 (1988)). La 3-isopropilmalato deshidratasa *LEU1* de *Candida maltosa* exhibe una actividad más elevada en citraconato que el sustrato nativo (Bode, R. and Birnbaum, D., J. Basic Microbiol. 31:21-26 (1991)). La

atenuación o inhibición selectiva del citraconato a actividad de hidratación del metilmalato puede requerirse para aumentar la acumulación del intermediario citraconato.

Gen	GenBank	Número GI	Organismo
LeuC	P81291.1	3219823	*Methanocaldococcus jannaschii*
LeuD	Q58673.1	3122345	*Methanocaldococcus jannaschii*
hacA	Q58409.1	3122347	*Methanocaldococcus jannaschii*
hacB	Q58667.1	3122344	*Methanocaldococcus jannaschii*
LeuC	NP_712276.1	24214795	*Leptospira interrrogans*
LeuD	NP_712277.1	24214796	*Leptospira interrrogans*
LEU1	AAB19612.1	234318	*Saccharomyces cerevisiae*
cmLEU1	AAB03335.1	1399939	*Candida maltosa*

[0287] Otras citramalato deshidratasas candidatas apropiadas son las enzimas 2-metilcitrato deshidratasas que forman cis-2-metilaconitato (EC 4.2.1.79) y *trans*-2-metilaconitato (EC 4.2.1.117). La 2-metilcitrato *cis*-deshidratasa de *E. coli* codificada por *prpD* es activa en citramalato como sustrato (Blank et al., *Microbiology* 148:133-146 (2002)). Ni el citraconato ni el mesaconato fueron activos como sustratos, indicando que PrpD es estrictamente una enzima deshidratasa, más bien que una isomerasa. La enzima PrpD de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* se ha caracterizado igualmente, pero no se ha demostrado la actividad en citramalato (Horswill et al., *Biochemistry* 40:4703-4713 (2001)). Las enzimas 2-metilcitrato deshidratasas de *Shewanella oneidensis* codificadas por *acnB* y *acnD* son también candidatas (Grimek et al., *J Bacteriol.* 186:454-462 (2004)). La enzima AcnD requiere un cofactor codificado por *prpF* para funcionar *in vivo*. Estudios de estructura cristalina de PrpF en complejo con aconitato muestran que la enzima funciona como una cis/trans isomerasa, interconvirtiendo los isómeros cis/trans de aconitato y 2-metilaconitato (Garvey et al., *Protein Sci* 16:1274-1284 (2007)). Una candidata adicional de *S. oneidensis* es una isopropilmalato isomerasa predicha, codificada por *leuCD*.

Gen	GenBank	Número GI	Organismo
prpD	AAC73437.1	1786528	*Escherichia coli*
prpD	AAC44816.1	1648968	*Salmonella enterica serovar Typhimurium*
acnB	NP_716069.1	24372027	*Shewanella oneidensis*
acnD	AAN53428.1	24345782	*Shewanella oneidensis*
prpF	AAN53427.1	24345781	*Shewanella oneidensis*
leuC	NP_719761.1	24375718	*Shewanella oneidensis*
leuD	NP_719760.1	24375717	*Shewanella oneidensis*

[0288] La deshidratación de citramalato a mesaconato en Paso F se cataliza por citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato, EC 4.2.1.34), también llamada 2-metilmalato deshidratasa o mesaconasa. Esta enzima se ha caracterizado tan solo parcialmente en *Clostridium tetanomorphum*, y genes candidatos no se encuentran disponibles hasta la fecha. La actividad se ha demostrado asimismo en extractos celulares de *Rhodospirillum rubrum*, donde participa en el ciclo de citramalato de la utilización de acetato (Berg and Ivanovskii, *Mikrobiologiia* 78:22-31 (2009)), aunque el gen asociado no se ha identificado.

[0289] Itaconil-CoA se convierte en citramalil-CoA (Paso K de Figura 1) por itaconil-CoA hidratasa (EC 4.2.1.56), una enzima que participa en las vías de la asimilación de itaconato en organismos tales como *Pseudomonas* sp. B2aba (Cooper and Kornberg, *Biochem.J* 91:82-91 (1964)), *Achromobacter xylosoxydans* (He et al., *J Biosci Bioeng.* 89:388-391 (2000)) y *Pseudomonas fluorescens* (Nagai, J., J. Biochem, 53:181-7 (1963)). La actividad de esta enzima no se ha asociado con un gen hasta la fecha.

[0290] EC 5.2.1.a Cis/trans isomerasa (Paso G). La isomerización cis/trans de mesaconato y citraconato se cataliza por una enzima con actividad citraconato isomerasa. Candidatas apropiadas incluyen aconitato isomerasa (EC 5.3.3.7), maleato *cis, trans*-isomerasa (EC 5.2.1.1), maleilacetona *cis, trans*-isomerasa y *cis,trans*-isomerasa de ácidos grasos insaturados (Cti).

[0291] Aconitato isomerasa interconvierte *cis*- y *trans*-aconitato. La aconitato isomerasa de *Shewanella oneidensis*, codificada por *prpF*, interconvierte los isómeros cis/trans de aconitato y 2-metilaconitato (Garvey et al., *Protein Sci* 16:1274-1284 (2007)). Esta enzima opera en complejo con la metilcitrato deshidratasa, AcnD. La actividad aconitato isomerasa se detectó en muchas

bacterias gram-negativas incluyendo *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*, pero no en bacterias gram-positivas (Watanabe et al., *Curr Microbiol* 35:97-102 (1997)). Se ha caracterizado la enzima purificada de *Pseudomonas putida* (Klinman et al., *Biochemistry* 10:2253-2259 (1971)). De igual manera las enzimas aconitato isomerasa se han estudiado en plantas, pero los genes no se han identificado hasta la fecha (Thompson et al., *Anal.Biochem.* 184:39-47 (1990)). Algunas proteínas predichas con alta homología de secuencia con la proteína *prpF* se enumeran a continuación.

Gen	**GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
prpF	AAN53427.1	24345781	*Shewanella oneidensis*
prpF	PP_2337	26989061	*Pseudomonas putida*
Pfl01_1767	YP_347499.1	77457994	*Pseudomonas fluorescens*
Reut_A1811	YP_296020.1	73541500	*Ralstonia eutropha*

[0292] En consecuencia, la adición de una *cis, trans* isomerasa puede ayudar a mejorar el rendimiento de ácido tereftálico. Enzimas para conversiones isoméricas similares incluyen maleato *cis, trans*-isomerasa (EC 5.2.1.1), maleilacetona *cis-trans*-isomerasa (EC 5.2.1.2), y *cis, trans*-isomerasa de ácidos grasos insaturados (Cti).

[0293] La maleato *cis, trans*-isomerasa (EC 5.2.1.1) cataliza la conversión de ácido maleico en la formación *cis* a fumarato en la formación *trans* (Scher et al., *J Biol.Chem.* 244:1878-1882 (1969)). El producto del gen *maiA* de *Alcalidgenes faecalis* se ha clonado y caracterizado (Hatakeyama et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 239:74-79 (1997)). Otras maleato *cis, trans*-isomerasas se encuentran disponibles en *Serratia marcescens* (Hatakeyama et al., *Biosci.Biotechnol Biochem.* 64:1477-1485 (2000)), *Ralstonia eutropha* y *Geobacillus stearothermophilus*.

Gen	**GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
maiA	BAA23002	2575787	*Alcaligenes faecalis*
maiA	YP_725437	113866948	*Ralstonia eutropha H16*
maiA	BAA77296	4760466	*Geobacillus stearothermophilus*
maiA	BAA96747.1	8570038	*Serratia marcescens*

[0294] La maleilacetona *cis, trans*-isomerasa (EC 5.2.1.2) cataliza la conversión de 4-maleil-acetoacetato en 4-fumaril-acetilacetato, una conversión *cis* a *trans*. Esta enzima se codifica por *maiA* en *Pseudomonas aeruginosa* (Fernandez-Canon et al., *J Biol.Chem.* 273:329-337 (1998)) y *Vibrio cholera* (Seltzer, *J Biol.Chem.* 248:215-222 (1973)). Una enzima similar se identificó por homología de secuencia en *E. coli O157*.

Gen	GenBank	Número GI	Organismo
maiA	NP_250697	15597203	*Pseudomonas aeruginosa*
maiA	NP_230991	15641359	*Vibrio cholerae*
maiA	EDU73766	189355347	*Escherichia coli O157*

[0295] El producto del gen *cti* cataliza la conversión de ácidos grasos *cis*-insaturados (UFA) en *trans*-UFA. La enzima se ha caracterizado en *P. putida* (Junker et al., *J Bacteriol.* 181:5693-5700 (1999)). Enzimas similares se encuentran en *Shewanella* sp. MR-4 y *Vibrio cholerae*.

Gen	GenBank	Número GI	Organismo
cti	AAD41252	5257178	*Pseudomonas putida*
cti	YP_732637	113968844	*Shewanella* sp. MR-4
cti	ZP_04395785	229506276	*Vibrio cholerae*

[0296] EC 5.3.3.a Delta-isomerasa (Paso I). La conversión de itaconato en citraconato se cataliza por itaconato delta-isomerasa. Una enzima con esta actividad es la metilitaconato delta-isomerasa (EC 5.3.3.6) de *Eubacterium barkeri* (Velarde et al., *J Mol Biol* 391:609-620 (2009)). Esta enzima se expresó heterólogamente y se caracterizó en *E. coli*. Homólogos con elevada similitud de secuencia proteica se enumeran a continuación.

Gen	GenBank	Número GI	Organismo
mii	Q0QLE6.1	122953534	*Eubacterium barkeri*
FMAG_01516	ZP_04567526.1	237737045	*Fusobacterium mortiferum*
BACCAP_02290	ZP_02036679.1	154498301	*Bacteroides capillosus*
CLJU_c30450	YP_003781195.1	300856211	*Clostridium ljungdahlii*
BMD_3790	YP_003598973.1	295705898	*Bacillus megaterium*
EFER_3666	YP_002384731.1	218550940	*Escherichia fergusonii*

[0297] EC 6.2.1 CoA sintetasa (Paso E). La conversión de citramalil-CoA en citramalato (Figura 1, Paso E) e itaconato en itaconil-CoA (Figura 1, Paso L) puede catalizarse por una CoA ácido-tiol ligasa o CoA sintetasa en la familia de enzimas 6.2.1. Una enzima succinil-CoA sintetasa con actividad itaconil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.4) se caracterizó en *Pseudomonas* sp. B2aba, pero el gen no se ha identificado (Cooper and Kornberg, *Biochem.J* 91:82-91 (1964)). Enzimas candidatas adicionales CoA ligasas incluyen succinil-CoA sintetasa (EC 6.3.1.4), acetil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.13), acil-CoA ligasa y malonil-CoA sintetasa (EC 6.3.4.9). Varias enzimas con amplias gamas de sustrato se han descrito en la literatura. Acetil-CoA sintetasa formadora de ADP (ACD, EC 6.2.1.13) es una enzima que acopla la conversión de ésteres de acil-CoA a sus correspondientes ácidos con la síntesis concomitante de ATP. Se demostró que ACD I de *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por *AF1211*, opera en una variedad de sustratos de cadena lineal y ramificada incluyendo isobutirato, isopentanoato, y fumarato (Musfeldt et al., *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). Se demostró igualmente que una segunda ACD reversible en *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por *AF1983*, tiene una amplia gama de sustratos con elevada actividad en compuestos cíclicos fenilacetato e indolacetato (Musfeldt and Schonheit, *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). La enzima de *Haloarcula marismortui* (anotada como una succinil-CoA sintetasa) acepta propionato, butirato, y ácidos de cadena ramificada (isovalerato e isobutirato) como sustratos, y se demostró que opera en las direcciones hacia adelante y hacia atrás (Brasen et al., *Arch.Microbiol* 182:277-287 (2004)). La ACD codificada por *PAE3250* de la crenarquea hipertermófila *Pyrobaculum aerophilum* mostró la gama más amplia de sustratos de todas las ACDs caracterizadas, que reaccionan con acetil-CoA, isobutiril-CoA (sustrato preferido) y fenilacetil-CoA (Brasen and Schonheit, *Arch.Microbiol* 182:277-287 (2004)). Evolución dirigida o ingeniería puede usarse para modificar esta enzima para que opere a la temperatura fisiológica del organismo hospedero. Todas las enzimas de *A. fulgidus*, *H. marismortui* y *P. aerophilum* se han clonado, expresado funcionalmente, y caracterizado en *E. coli* (Brasen and Schonheit, *Arch.Microbiol* 182:277-287 (2004); Musfeldt and Schonheit, *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). Se ha demostrado que la acil-CoA ligasa de *Pseudomonas putida* codificada por *paaF* funciona en varios sustratos alifáticos, incluyendo los ácidos acético, propiónico, butírico, valérico, hexanoico, heptanoico, y octanoico, y en compuestos aromáticos tales como ácidos fenilacético y fenoxiacético (Fernandez-Valverde et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 59:1149-1154 (1993)). Una enzima relacionada, malonil-

CoA sintetasa (6.3.4.9) de *Rhizobium leguminosarum* puede convertir varios diácidos, es decir, malonato de etilo, propilo, alilo, isopropilo, dimetilo, ciclopropilo, ciclopropilmetileno, ciclobutilo, y bencilo en sus correspondientes monotioésteres (Pohl et al., *J.Am.Chem.Soc.* 123:5822-5823 (2001)). Candidatas adicionales son las enzimas succinil-CoA sintetasas codificadas por *sucCD* en *E. coli* y *LSC12* en *S. cerevisiae,* las cuales catalizan naturalmente la formación de succinil-CoA a partir de succinato, con el consumo concomitante de una ATP, una reacción que es reversible *in vivo* (Buck et al., *Biochemistry* 24:6245-6252 (1985)).

Proteína	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
AF1211	NP_070039.1	11498810	*Archaeoglobus fulgidus*
AF1983	NP_070807.1	11499565	*Archaeoglobus fulgidus*
scs	YP_135572.1	55377722	*Haloarcula marismortui*
PAE3250	NP_560604.1	18313937	*Pyrobaculum aerophilum* str. IM2
paaF	AAC24333.2	22711873	*Pseudomonas putida*
matB	AAC83455.1	3982573	*Rhizobium leguminosarum*
sucC	NP_415256.1	16128703	*Escherichia coli*
sucD	AAC73823.1	1786949	*Escherichia coli*
LSC1	NP_014785	6324716	*Saccharomyces cerevisiae*
LSC2	NP_011760	6321683	*Saccharomyces cerevisiae*

EJEMPLO II

Preparación de un Organismo Microbiano Productor de MAA que Tiene una Vía Actil-CoA a MAA

[0298] Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir MAA a partir de acetil-CoA y piruvato. Esta vía ejemplar se muestra en los Pasos A/B/C de Figura 1.

[0299] *Escherichia coli* se usa como un organismo diana para generar mediante ingeniería genética una vía productora de MAA a partir de acetil-CoA y piruvato, como se muestra en Figura 1 en los Pasos A, B y C. *E. coli* constituye un excelente hospedero para generar un organismo no existente por naturaleza, capaz de producir MAA. *E. coli* es receptiva a manipulación genética y se conoce por ser capaz de producir varios productos, como etanol, ácido acético, ácido

fórmico, ácido láctico, ácido succínico y 1,4-butanodiol, efectivamente bajo condiciones anaerobias y microaerobias.

[0300] Para desarrollar una cepa de *E. coli* generada mediante ingeniería genética para producir MAA a partir de acetil-CoA, ácidos nucleicos que codifican las enzimas utilizadas en la vía de Figura 1, descritas previamente, se expresan en *E. coli* usando técnicas de biología molecular bien conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Ed. (2001); Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology (1999)). En particular, una cepa de *E. coli* se genera mediante ingeniería genética para producir MAA a partir de acetil-CoA mediante la vía detallada en Figura 1 (Pasos A/B/C). Genes que codifican enzimas para transformar acetil-CoA en MAA se ensamblan en vectores. En particular, los genes *cimA* (Q58787.1), *leuCD* (P81291.1 y Q58673.1) y *cad* (XP_001209273), que codifican citramalato sintasa, citramalato deshidratasa y citraconato descarboxilasa, respectivamente, se clonan en el vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Germany), bajo el control del promotor PA1/lacO. El plásmido se transforma entonces en la cepa hospedera MG1655e de *E. coli* que contiene $lacI^Q$, la cual permite la expresión inducible por adición de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG). La cepa resultante expresa las proteínas y enzimas requeridas para la síntesis de MAA a partir de acetil-CoA.

[0301] El organismo resultante, genéticamente modificado, se cultiva en medio con contenido de glucosa siguiendo procedimientos bien conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *supra*, 2001). La expresión de genes de la vía de MAA se corrobora usando métodos bien conocidos en el arte para determinar la expresión de polipéptidos o la actividad enzimática, incluyendo por ejemplo, Northern blots, amplificación por PCR de ARNm e inmunotransferencia (*immunoblotting*). Las actividades enzimáticas de las enzimas expresadas se confirman usando análisis específicos para la actividades individualmente. La capacidad de la cepa de *E. coli* generada mediante ingeniería genética para producir MAA se confirma usando HPLC, cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS) o cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS).

[0302] Cepas microbianas generadas mediante ingeniería genética para tener una vía de síntesis de MAA funcional se amplifican aún más por optimización para utilización eficiente de la vía. Concretamente, la cepa producida mediante ingeniería genética se evalúa para determinar si cualquiera de los genes exógenos se expresa en un nivel que limita el porcentaje. La expresión se aumenta para cualesquiera enzimas expresadas en bajos niveles que pueden limitar el flujo a

través de la vía, por ejemplo, mediante introducción de números adicionales de copias de genes u optimización de codones. Se aplican asimismo estrategias para alterar la actividad, regulación y/o expresión de enzimas de la vía de MAA, tal como mutagénesis y/o evolución dirigida.

[0303] Para generar mejores productores, se utiliza modelamiento metabólico para optimizar las condiciones de crecimiento. Igualmente se usa modelamiento para diseñar desactivaciones opcionales de genes que adicionalmente optimizan la utilización de la vía (véase, por ejemplo, publicaciones de Patente de los 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 Patente de los Estados Unidos No. 7,127,379). El análisis de modelamiento permite predicciones confiables de los efectos sobre el crecimiento celular de cambiar el metabolismo hacia una producción más eficiente de MAA. Un método de modelamiento es el enfoque de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard et al., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), el cual se aplica para seleccionar desactivaciones de genes que colectivamente tienen como resultado una mejor producción de MAA. De igual manera, puede usarse evolución adaptativa para generar mejores productores, por ejemplo, del intermediario citraconato o el producto MAA. La evolución adaptativa se realiza para mejorar las características de tolerancia, crecimiento y producción (Fong and Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et al., *Science* 314:1565-1568 (2006)). Basándose en los resultados, rondas subsiguientes de modelamiento, ingeniería genética y evolución adaptativa pueden aplicarse al productor de MAA para aumentar aún más la producción.

[0304] Para la producción a gran escala de MAA, el organismo ya mencionado que contiene la vía de MAA se cultiva en un fermentador, usando un medio conocido en el arte para favorecer el crecimiento del organismo bajo condiciones anaerobias. Se efectúan fermentaciones en lote, lote alimentado o en una manera continua. Las condiciones anaerobias se mantienen rociando primeramente el medio con nitrógeno y luego sellando el tanque de cultivo (v.gr., frascos pueden sellarse con un tabique y una tapa rizada hacia adentro). Pueden emplearse asimismo condiciones microaerobias practicando un pequeño orificio para aireación limitada. El pH del medio se mantiene a un pH de 7 por la adición de un ácido, tal como H_2SO_4. La tasa de crecimiento se determina midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (600 nm), y la tasa de captación de glucosa monitoreando el agotamiento de la fuente de carbono con el transcurso del tiempo.

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

EJEMPLO III

Enzimas Ejemplares para la Formación de Ésteres de Metacrilato a Partir de Metacrilato y Alcoholes

[0305] Este ejemplo describe enzimas para una vía ejemplar para la producción de ésteres de metacrilato.

[0306] Figura 2 presenta una vía ejemplar a partir de MAA y alcoholes a ésteres de metacrilato. Una metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA transferasa puede aplicarse para formar metacrilil-CoA a partir de metacrilato. Enzimas con actividad alcohol transferasa pueden aplicarse para formar ésteres de metacrilato a partir de metacrilil-CoA y alcoholes.

[0307] La conversión de metacrilato en metacrilil-CoA puede catalizarse por una CoA ácido-tiol ligasa o CoA sintetasa en la familia de enzimas 6.2.1. Enzimas ejemplares con esta actividad se indican en Ejemplo I. Alternativamente, la conversión de metacrilato en metacrilil-CoA puede catalizarse por una enzima transferasa en la familia de enzimas 2.8.3. CoA transferasas catalizan la transferencia de una fracción CoA de una molécula a otra. Enzimas ejemplares con esta actividad se señalan en Ejemplo I.

[0308] La formación de ésteres de metacrilato a partir de metacrilil-CoA y alcoholes se cataliza por enzimas que tienen actividad alcohol transferasa. Varias enzimas con actividad alcohol transferasa se presentaron en los Ejemplos 1-10 de la Patente de los Estados Unidos No. 7,901,915. Estas incluyen Novozyme 435 (lipasa B inmovilizada de *Candida antarctica,* Sigma), lipasa C2 de *Candida cylindracea* (Alphamerix Ltd), lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (Alphamerix Ltd), L-aminoacilasa ex *Aspergillus* spp., y proteasa ex *Aspergillus oryzae*. Se demostró que tales enzimas forman acrilato de metilo y acrilato de etilo a partir de acrilil-CoA y metanol o etanol, respectivamente. En consecuencia, tales enzimas transferasas pueden usarse para formar ésteres de metacrilato.

[0309] Otras enzimas apropiadas incluyen la lipasa codificada por *calB* de *Candida antarctica* (Efe et al., *Biotechnol.Bioeng.* 99:1392-1406 (2008)) y la esterasa *EstF1* de *Pseudomonas fluorescens* (Khalameyzer et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 65:477-482 (1999)). Las enzimas lipasas codificadas por

lipB de *Pseudomonas fluorescens* y *estA* de *Bacillus subtilis* pueden catalizar también esta transformación. Los genes de *B. subtilis* y *P. fluorescens* codifican enzimas triacilglicerol lipasas que se han clonado y caracterizado en *E. coli* (Dartois et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1131:253-260 (1992); Tan et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 58:1402-1407 (1992)).

Gen	No. de Accesión	No. GI	Organismo
calB	P41365.1	1170790	*Candida antarctica*
EstF1	AAC36352.1	3641341	*Pseudomonas fluorescens*
lipB	P41773.1	1170792	*Pseudomonas fluorescens*
estA	P37957.1	7676155	*Bacillus subtilis*

[0310] Genes candidatos adicionales que codifican enzimas para formar ésteres de metacrilato a partir de metacrilil-CoA y alcoholes incluyen el ADPI *atfA* de *Acinetobacter* sp. que codifica una enzima bifuncional con las dos actividades éster de cera sintasa (WS) y acil-CoA: diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) (Kalscheuer et al. AJ Biol Chem 2003, 278: 8075-8082.); el gen AAD38041 de *Simmondsia chinensis* que codifica una enzima requerida para la acumulación de ceras en semillas de jojoba (Lardizabal et al. Plant Physiology 2000, 122: 645-655.); los *atfA1* y *atfA2* de *Alcanivorax borkumensis* que codifican enzimas WS/DGAT bifuncionales (Kalscheuer et al. J Bacteriol 2007, 189: 918-928.); el *AAT* de *Fragaria x ananassa* que codifica una alcohol acetiltransferasa (Noichinda et al. FoodSci Technol Res 1999, 5: 239-242.); el *AATI* de *Rosa hybrid cultivar* que codifica una alcohol acetiltransferasa (Guterman et al. Plant Mol Biol 2006, 60: 555-563.); los *ATF1* y *ATF2* de *Saccharomyces cerevisiae* que codifican alcohol acetiltransferasas (Mason et al. Yeast 2000, 16: 1287-1298.); y Ws1 y Ws2 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (Holtzapple, E. and Schmidt-Dannert, C., J. Bacteriol. 189 (10), 3804-3812, 2007). La carboxilesterasa de *Lactococcus lactis*, codificada por estA, cataliza la formación de ésteres de acetil-CoA y alcoholes tales como etanol y metanotiol (Nardi et al. J. Appl. Microbiol. 93:994-1002 (2002)). La alcohol O-acetiltransferasa de *Saccharomyces uvarum* convierte una amplia gama de sustratos alcohol, incluyendo alcoholes de cadena ramificada, en sus correspondientes ésteres de acetato (Yoshioka and Hashimoto, Agricul and Biol Chem, 45:2183-2191 (1981). Las secuencias proteicas de las enzimas codificadas por estos genes se indican a continuación.

Gen	ID GenBank	Número	Organismo

		GI	
atfA	Q8GGG1	81478805	*Acinetobacter sp. ADP1*
AF149919.1:13..1071	AAD38041	5020219	*Simmondsia chinensis*
atfAI	YP694462	110835603	*Alcanivorax borkumensis SK2*
atfA2	YP693524	110834665	*Alcanivorax borkumensis SK2*
AAT	AAG13130.1	10121328	*Fragaria x ananassa*
AATI	Q5I6B5	75105208	*Rosa hybrid cultivar*
ATFI	P40353	2506980	*Saccharomyces cerevisiae*
ATF2	P53296	1723729	*Saccharomyces cerevisiae*
Ws2	ABO21021.1	126567232	*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*
Ws1	ABO21020.1	126567230	*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*
EstA	AAF62859.1	7453516	*Lactococcus lactis*

EJEMPLO IV

Enzimas Ejemplares para la Formación de Ésteres de Metacrilato a Partir de Metacrilato y Alcoholes

[0311] Este ejemplo describe enzimas para una vía ejemplar para la producción de ésteres de metacrilato.

[0312] Figura 2 expone una vía ejemplar a partir de MAA y alcoholes a ésteres de metacrilato. Ésteres de metacrilato pueden producirse químicamente, por ejemplo, calentando metacrilato en la presencia de un alcohol o múltiples alcoholes en la presencia de un agente deshidratante tal como un catalizador de ácido. Enzimas con actividad formadora de metacrilato pueden aplicarse asimismo para formar ésteres de metacrilato directamente a partir de metacrilato y alcoholes. Genes que codifican tales enzimas pueden expresarse en un organismo que contiene una vía de síntesis de metacrilato. Varios de tales organismos, que contienen vías de síntesis de metacrilato, se divulgan aquí y en WO/2009/135074. Las enzimas formadoras de éster de metacrilato pueden

direccionarse al citosol para posibilitar la conversión intracelular de alcoholes y metacrilato en ésteres de metacrilato. Alternativamente, las enzimas formadoras de éster de metacrilato pueden secretarse en el medio de fermentación para permitir la conversión extracelular de alcoholes y metacrilato en ésteres de metacrilato. Otra opción es agregar enzimas formadoras de éster de metacrilato a una mezcla que contiene metacrilato y alcoholes, tales como un caldo de fermentación. Varias enzimas con actividad formadora de éster de metacrilato se describen a continuación.

[0313] La amidasa de *Brevibacterium* sp. R312 (EC 3.5.1.4) es igualmente una enzima con actividad formadora de éster de metacrilato. Se demostró que esta enzima hidroliza etilacrilato (Thiery et al., J. Gen. Microbiol., 132:2205-8, 1986; Soubrier et al., Gene, 116:99-104,1992). La epóxido hidrolasa microsómica de *Rattus norvegicus* (EC 3.3.2.9) tiene actividad en hidrolizar metacrilato de glicidilo y es otra enzima apropiada (Guengerich et al., Rev. Biochem. Toxicol. 4:5-30, 1982). Las secuencias proteicas de estos genes se indican a continuación.

Gen	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
amiE	JC1174	98711	*Brevibacterium* sp.
Eph-1	P07687.1	123928	*Rattus norvegicus*

[0314] Genes adicionales que codifican enzimas potenciales, formadoras de éster de metacrilato, incluyen el ADPI *atfA* de *Acinetobacter* sp., que codifica una enzima bifuncional con ambas actividades éster de cera sintasa (WS) y acil-CoA: diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) (Kalscheuer et al. AJ Biol Chem 2003, 278: 8075-8082.); el gen AAD38041 de *Simmondsia chinensis* que codifica una enzima requerida para la acumulación de ceras en semillas de jojoba (Lardizabal et al. Plant Physiology 2000, 122: 645-655.); los *atfA1* y *atfA2* de *Alcanivorax borkumensis* que codifican las enzimas WS/DGAT bifuncionales (Kalscheuer et al. J Bacteriol 2007, 189: 918-928.); el *AAT* de *Fragaria x ananassa* que codifica una alcohol acetiltransferasa (Noichinda et al. FoodSci Technol Res 1999, 5: 239-242.); el *AAT1* de *Rosa hybrid cultivar* que codifica una alcohol acetiltransferasa (Guterman et al. Plant Mol Biol 2006, 60: 555-563.); y los *ATF1* y *ATF2* de *Saccharomyces cerevisiae* que codifican alcohol acetiltransferasas (Mason et al. Yeast 2000, 16: 1287-1298.); y Ws1 y Ws2 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (Holtzapple, E. and Schmidt-Dannert, C., J. Bacteriol. 189 (10), 3804-3812, 2007). La carboxilesterasa de *Lactococcus lactis*, codificada por *estA*, cataliza la

formación de ésteres de acetil-CoA y alcoholes tales como etanol y metanotiol (Nardi et al. *J. Appl. Microbiol.* 93:994-1002 (2002)). La alcohol O-acetiltransferasa de *Saccharomyces uvarum* convierte una amplia gama de sustratos alcohol, que incluyen alcoholes de cadena ramificada, en sus correspondientes ésteres de acetato (Yoshioka and Hashimoto, *Agricul and Biol Chem*, 45:2183-2191 (1981). El gen asociado con esta actividad no se ha identificado hasta la fecha. Las secuencias proteicas de las enzimas codificadas por estos genes se señalan a continuación.

Gen	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
atfA	Q8GGG1	81478805	*Acinetobacter sp. ADP1*
AF149919.1:13..1071	AAD38041	5020219	*Simmondsia chinensis*
atfAI	YP694462	110835603	*Alcanivorax borkumensis SK2*
atfA2	YP693524	110834665	*Alcanivorax borkumensis SK2*
AAT	AAG13130.1	10121328	*Fragaria x ananassa*
AATI	Q5I6B5	75105208	*Rosa hybrid cultivar*
ATFI	P40353	2506980	*Saccharomyces cerevisiae*
ATF2	P53296	1723729	*Saccharomyces cerevisiae*
Ws2	ABO21021.1	126567232	*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*
Ws1	ABO21020.1	126567230	*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*
EstA	AAF62859.1	7453516	*Lactococcus lactis*

[0315] Las enzimas paraoxonasas PON1, *PON1 (G3C9),* y PON3 (EC 3.1.8.1) de *Homo sapiens* poseen las dos actividades arilesterasa y organofosfatasa y pueden poseer asimismo actividad formadora de éster de metacrilato. PON1 tiene un sitio polimórfico común en el residuo 192, glutamina (R) o arginina (Q), que tiene como resultado diferencias cualitativas. Por ejemplo, la isoxima R tiene una actividad esterasa más alta en GBL que la isozima S (Billecke et al., *Drug Metab Dispos.* 28:1335-1342 (2000)). En células de *H. sapiens*, PON1 reside en partículas de lipoproteínas (HDL) de alta densidad, y su actividad y estabilidad

requieren este ambiente. Enzimas PON1 silvestres y recombinantes se han expresado funcionalmente en otros organismos (Rochu et al., *Biochem.Soc.Trans.* 35:1616-1620 (2007); Martin et al., *Appl.Environ.Microbiol.* (2009)). Un estudio de evolución dirigida de PON1 produjo varias enzimas mutantes con solubilidad y propiedades catalíticas mejoradas en *E. coli* (números de accesión de nucleótidos AY499188-AY499199) (Aharoni et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:482-487 (2004)). Una variante recombinante de este estudio, G3C9 (Aharoni et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:482-487 (2004)), se usó recientemente en un bioproceso integrado para la producción, dependiente del pH, de 4-valerolactona de levulinato (Martin et al., *Appl.Environ.Microbiol.* (2009)). PON3 humana es todavía otra enzima apropiada que puede poseer actividad formadora de éster de metacrilato (Draganov et al., *J.Lipid Res.* 46:1239-1247 (2005)).

Gen	**No. de Accesión**	**No. GI**	**Organismo**
PON1	NP_000437.3	19923106	*Homo sapiens*
PON1 (G3C9)	AAR95986.1	40850544	*Synthetic variant*
PON3	NP_000931.1	29788996	*Homo sapiens*

[0316] Adicionalmente, la lipasa B de *Candida antarctica* es otra enzima candidata apropiada con actividad formadora de éster de metacrilato (Efe et al., *Biotechnol.Bioeng.* 99:1392-1406 (2008)). La esterasa de *Pseudomonas fluorescens*, codificada por *EstF1*, es todavía otra enzima apropiada (Khalameyzer et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 65:477-482 (1999)). Otras enzimas lipasas de organismos tales como *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* pueden catalizar asimismo esta transformación. Los genes de *B. subtilis* y *P. fluorescens* codifican enzimas triacilglicerol lipasas, que se han clonado y caracterizado en *E. coli* (Dartois et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1131:253-260 (1992); Tan et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 58:1402-1407 (1992)).

Gen	**No. de Accesión**	**No. GI**	**Organismo**
calB	P41365.1	1170790	*Candida antarctica*
EstF1	AAC36352.1	3641341	*Pseudomonas fluorescens*
lipB	P41773.1	1170792	*Pseudomonas fluorescens*
estA	P37957.1	7676155	*Bacillus subtilis*

[0317] La formación de ésteres de metacrilato puede catalizarse igualmente por enzimas en la familia 3.1.1, que actúan en moléculas de enlaces de ésteres carboxílicos para la interconversión entre lactonas cíclicas en los ácidos hidroxicarboxílicos de cadena abierta. La L-lactonasa de *Fusarium proliferatum* ECU2002 exhibe actividades lactonasa y esterasa en una variedad de sustratos de lactona (Zhang et al., *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 75:1087-1094 (2007)). La 1,4-lactona hidroxiacilhidrolasa (EC 3.1.1.25), también conocida como 1,4-lactonasa o gamma-lactonasa, es específica para 1,4-lactonas con 4-8 átomos de carbono. La gamma lactonasa en la sangre humana y microsomas del hígado de rata se purificó (Fishbein et al., *J Biol Chem* 241:4835-4841 (1966)) y se activó y estabilizó la actividad lactonasa por iones de calcio (Fishbein et al., *J Biol Chem* 241:4842-4847 (1966)). Las actividades lactonasa óptimas se observaron con pH 6,0, mientras que un pH elevado tuvo como resultado actividades hidrolíticas (Fishbein and Bessman, *J Biol Chem* 241:4842-4847 (1966)). Genes de *Xanthomonas campestris*, *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* se han anotado como 1,4-lactonasa y pueden utilizarse para catalizar la transformación de 4-hidroxibutirato en GBL (Zhang et al., *Appl Microbiol Biotechnol* 75:1087-1094 (2007)).

Gen	**No. de Accesión**	**No. GI**	**Organismo**
EU596535.1:1..1206	ACC61057.1	183238971	*Fusarium proliferatum*
xccb100_2516	YP_001903921.1	188991911	*Xanthomonas campestris*
An16g06620	CAK46996.1	134083519	*Aspergillus niger*
BAA34062	BAA34062.1	3810873	*Fusarium oxysporum*

EJEMPLO V

Vía para Conversión de Succinil-CoA en MAA mediante 3-Hidroxiisobutirato

[0318] Este ejemplo describe una vía ejemplar para la síntesis de MAA a partir de succinil-CoA a ácido metacrílico mediante 3-hidroxiisobutirato.

[0319] Una vía ejemplar para la síntesis de MAA procede a partir de succinil-CoA (véase Figura 3). Esta vía usa por lo menos tres y, como máximo, cinco pasos enzimáticos para formar MAA a partir de succinil-CoA. En esta vía (véase Figura 3), succinil-CoA se convierte primero en (R)-metilmalonil-CoA, la cual se convierte potencialmente en (S)-metilmalonil-CoA por una epimerasa. Cualquiera de los (R)- o (S)-estereoisómeros de metilmalonil-CoA se reduce entonces a (R)- o (S)-3-hidroxiisobutirato, respectivamente, por un par de enzimas (como se muestra

en Figura 3) o una sola enzima, que exhibe(n) actividades acil-CoA reductasa y alcohol deshidrogenasa. La vía de succinil-CoA a 3-hidroxiisobutirato se ha descrito también en WO 2007/141208. En el paso final, 3-hidroxiisobutirato se deshidrata para formar MAA.

[0320] Generar exitosamente mediante ingeniería genética esta vía implica identificar un conjunto apropiado de enzimas con suficiente actividad y especificidad. Esto incluye identificar un conjunto apropiado de enzimas, clonar sus correspondientes genes en un hospedador de producción, optimizar las condiciones de fermentación, y analizar la formación de producto luego de la fermentación. Para generar mediante ingeniería genética un hospedador de producción para la producción de ácido metacrílico, una o más secuencia(s) de ADN exógeno se expresa(n) en microorganismos. Adicionalmente, los microorganismos pueden tener gen(es) endógeno(s) delecionado(s) funcionalmente. Estas modificaciones permiten la producción de ácido metacrílico usando un material de alimentación renovable.

[0321] A continuación y aquí se describe un número de genes candidatos, caracterizados bioquímicamente, capaces de codificar enzimas que catalizan cada paso de la vía deseada. Aunque se describe usando *E. coli* como un organismo hospedero para generar la vía mediante ingeniería genética, esencialmente puede utilizarse cualquier organismo hospedero apropiado. Específicamente se listan genes que son nativos a *E. coli* así como genes en otros organismos que pueden aplicarse para catalizar las transformaciones apropiadas cuando se clonan y expresan apropiadamente.

[0322] Con referencia a Figura 3, el paso 1 involucra metilmalonil-CoA mutasa (EC 5.4.99.2). En el primer paso, succinil-CoA se convierte en metilmalonil-CoA por metilmalonil-CoA mutasa (MCM). Metilmalonil-CoA mutasa es una enzima dependiente de cobalamina que convierte succinil-CoA en metilmalonil-CoA. En *E. coli*, la mutasa dependiente de adenosilcobalamina reversible participa en una vía de tres pasos que lleva a la conversión de succinato en propionato (Haller et al., *Biochemistry* 39:4622-4629 (2000)). La sobreexpresión del gen candidato MCM junto con la deleción de *YgfG* puede usarse para prevenir la descarboxilación de metilmalonil-CoA a propionil-CoA y maximizar la metilmalonil-CoA disponible para la síntesis de MAA. MCM se codifica por genes *scpA* en *Escherichia coli* (Bobik and Rasche, *Anal. Bioanal. Chem.* 375:344-349 (2003); Haller et al., *Biochemistry* 39:4622-4629 (2000)) y *mutA* en *Homo sapiens* (Padovani and Banerjee, *Biochemistry* 45:9300-9306 (2006)). En varios otros organismos, MCM contiene

subunidades alfa y beta y se codifica por dos genes. Genes candidatos ejemplares que codifican la proteína de dos subunidades son *mutA* y *mutB* de *Propionibacterium fredenreichii sp. shermani* (Korotkova and Lidstrom, *J. Biol. Chem.* 279:13652-13658 (2004)), *mcmA* y *mcmB* de *Metilobacterium extorquens* (Korotkova and Lidstrom, *supra*, 2004), y *sbm1* y *sbm2* de *Ralstonia eutropha* (Peplinski et al., *Appl. Microbiol. Biotech.* 88:1145-59 (2010)). Enzimas candidatas adicionales identificadas, basadas en alta homología con el producto del gen spcA de *E. coli*, se enumeran igualmente a continuación.

Proteína	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
scpA	NP_417392.1	16130818	*Escherichia coli K12*
mutA	P22033.3	67469281	*Homo sapiens*
mutA	P11652.3	127549	*Propionibacterium fredenreichii sp. shermanii*
mutB	P11653.3	127550	*Propionibacterium fredenreichii sp. shermanii*
mcmA	Q84FZ1	75486201	*Metilobacterium extorquens*
mcmB	Q6TMA2	75493131	*Metilobacterium extorquens*
Sbm1	YP_724799.1	113866310	*Ralstonia eutropha H16*
Sbm2	YP_726418.1	113867929	*Ralstonia eutropha H16*
sbm	NP_838397.1	30064226	*Shigella flexneri*
SARI_04585	ABX24358.1	160867735	*Salmonella enterica*
YfreA_01000861	ZP_00830776.1	77975240	*Yersinia frederiksenii*

[0323] Estas secuencias pueden usarse para identificar proteínas homólogas en GenBank u otras bases de datos mediante búsquedas de similitud de secuencias (por ejemplo, BLASTp). Las proteínas homólogas resultantes y sus correspondientes secuencias génicas proporcionan secuencias adicionales de ADN exógeno para transformación en *E. coli* u otros microorganismos hospederos, apropiados para generar hospederos de producción. Genes candidatos adicionales incluyen los siguientes, los cuales se identificaron basados en alta homología con el producto del gen *spcA* de *E. coli*.

[0324] Existe además evidencia de que genes adyacentes a genes catalíticos de metilmalonil-CoA mutasa contribuyen a una actividad máxima. Por ejemplo, se ha demostrado que el gen *meaB* de *M. extorquens* forma un complejo con metilmalonil-CoA mutasa, estimula la actividad mutasa *in vitro*, y la protege posiblemente de inactivación irreversible (Korotkova and Lidstrom, *J. Biol. Chem.* 279:13652-13658 (2004)). El producto del gen *meaB* de *M. extorquens* es altamente similar al producto del gen *argK* de *E. coli* (BLASTp: 45% identidad, valor E: 4e-67), el cual es adyacente a *scpA* en el cromosoma. Ninguna secuencia para el homólogo *meaB* en *P. freudenreichii* se encuentra catalogada en GenBank. No obstante, el producto del gen KPA171202 de *Propionibacterium acnes*, YP_055310.1, es 51% idéntico a la proteína *meaB* de *M. extorquens* y su gen es igualmente adyacente al gen de la metilmalonil-CoA mutasa en el cromosoma. Un gen similar se codifica por H16_B1839 de *Ralstonia eutropha H16*.

Gen	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
argK	AAC75955.1	1789285	*Escherichia coli K12*
PPA0597	YP_055310.1	50842083	*Propionibacterium acnes*
KPA171202	2QM8_B	158430328	*Metilobacterium extorquens*
H16_B1839	YP_841351.1	116695775	*Ralstonia eutropha H16*

[0325] *E. coli* puede sintetizar adenosilcobalamina, un cofactor necesario para esta reacción, únicamente cuando se suministra con los intermediarios cobinamida o cobalamina (Lawrence and Roth. *J. Bacteriol.* 177:6371-6380 (1995); Lawrence and Roth, *Genetics* 142:11-24 (1996)). Alternativamente, la capacidad de sintetizar cobalaminas *de novo* se ha conferido a *E. coli* siguiendo la expresión de genes heterólogos (Raux et al., *J. Bacteriol.* 178:753-767 (1996)).

[0326] Con referencia a Figura 3, el paso 2 involucra metilmalonil-CoA epimerasa (EC 5.1.99.1). La segunda enzima en la vía, metilmalonil-CoA epimerasa (MMCE), interconvierte (R)-metilmalonil-CoA y (S)-metilmalonil-CoA. MMCE es una enzima esencial en la descomposición de ácidos grasos impares y de los aminoácidos valina, isoleucina, y metionina. No se cree que la actividad metilmalonil-CoA epimerasa se codifique en el genoma de *E. coli* (Boynton et al., *J. Bacteriol.*178:3015-3024 (1996)), pero está presente en otros organismos tales como *Homo sapiens* (*YqjC*) (Fuller and Leadlay, *Biochem. J.* 213:643-650 (1983)), *Rattus norvegicus* (*Mcee*) (Bobik and Rasche, *J. Biol. Chem.* 276:37194-37198

(2001)), *Propionibacterium shermanii* (AF454511) (Fuller and Leadlay, *Biochem. J.* 213:643-650 (1983); Haller et al., *Biochemistry* 39:4622-4629 (2000); McCarthy et al., *Structure* 9:637-646.2001)) y *Caenorhabditis elegans* (*mmce*) (Kuhnl et al., *FEBS J.* 272:1465-1477 (2005)). Un gen candidato adicional, AE016877 en *Bacillus cereus*, tiene una alta homología de secuencia con otras enzimas caracterizadas. Este paso enzimático puede ser o no ser necesario, dependiendo de la estereospecificidad de la enzima o enzimas usadas para la conversión de metilmalonyl-CoA en 3-hidroxiisobutirato (Pasos 3-4 en Figura 3). Estos genes/proteínas se describen a continuación.

Gen	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
YqjC	NP_390273	255767522	*Bacillus subtilis*
MCEE	Q96PE7.1	50401130	*Homo sapiens*
Mcee_predicted	NP_001099811.1	157821869	*Rattus norvegicus*
AF454511	AAL57846.1	18042135	*Propionibacterium fredenreichii sp. shermanii*
mmce	AAT92095.1	51011368	*Caenorhabditis elegans*
AE016877	AAP08811.1	29895524	*Bacillus cereus ATCC 14579*

[0327] Con referencia a Figura 3, el paso 3 involucra metilmalonil-CoA reductasa (EC 1.2.1.-). Como se muestra en Figura 3, la reducción de metilmalonil-CoA en su correspondiente alcohol, 3-hidroxiisobutirato, puede proceder por dos pasos enzimáticos. El primer paso, conversión de metilmalonil-CoA en semialdehído metilmalónico, se realiza por una aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA. Se ha demostrado que una enzima codificada por un gen de malonil-CoA reductasa de *Sulfolobus tokodaii* (Alber et. al., *J. Bacteriol.* 188(24):8551–8559 (2006)) cataliza la conversión de metilmalonil-CoA en su correspondiente aldehído (WO2007141208). Una enzima similar existe en *Metallosphaera sedula* (Alber et. al., *J. Bacteriol.* 188(24):8551–8559 (2006)). Varias CoA deshidrogenasas adicionales son capaces también de reducir una acil-CoA a su correspondiente aldehído. La reducción de metilmalonil-CoA a su correspondiente aldehído, metilmalonato semialdehído, se cataliza por una aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA. Enzimas ejemplares incluyen acil-CoA reductasa grasa, succinil-CoA reductasa (EC 1.2.1.76), acetil-CoA reductasa y butiril-CoA reductasa. Enzimas ejemplares acil-CoA reductasas grasas se

codifican por *acr1* de *Acinetobacter calcoaceticus* (Reiser and Somerville. *J. Bacteriol.* 179:2969-2975 (1997)), y *Acinetobacter sp. M-1* acil-CoA reductasa grasa (Ishige et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1192-1195 (2002)). Se conoce asimismo una succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA y NADP (también designada como succinil-CoA reductasa) codificada por el gen *sucD* en *Clostridium kluyveri* (Sohling and Gottschalk, *J. Bacteriol.* 178:871-880 (1996); Sohling and Gottschalk, *J. Bacteriol.* 178:871-880 (1996)) y *sucD* de *P. gingivalis* (Takahashi, *J. Bacteriol* 182:4704-4710 (2000)). Enzimas succinil-CoA reductasas adicionales participan en el ciclo de 3-hidroxipropionato/4-hidroxibutirato de arqueas termófilas incluyendo *Metallosphaera sedula* (Berg et al., *Science* 318:1782-1786 (2007)) y *Thermoproteus neutrophilus* (Ramos-Vera et al., *J Bacteriol*, 191:4286-4297 (2009)). La enzima de *M. sedula*, codificada por *Msed_0709*, es estrictamente dependiente de NADPH y tiene también actividad malonil-CoA reductasa. La enzima de *T. neutrophilus* es activo con las dos, NADPH y NADH. De igual manera, la enzima que acila acetaldehído deshidrogenasa en *Pseudomonas sp*, codificada por *bphG*, es un excelente candidato, ya que se ha demostrado que oxida y acila acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, formaldehído y el compuesto de cadena ramificada isobutiraldehído (Powlowski et al., *J. Bacteriol.* 175:377-385 (1993)). Aparte de reducir acetil-CoA a etanol, se ha demostrado que la enzima codificada por *adhE* en *Leuconostoc mesenteroides* oxida el compuesto de cadena ramificada isobutiraldehído a isobutiril-CoA (Kazahaya, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 18:43-55 (1972); y Koo et al., *Biotechnol Lett.* 27:505-510 (2005)). Butiraldehído deshidrogenasa cataliza una reacción similar, la conversión de butiril-CoA en butiraldehído, en organismos solventogénicos tales como *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kosaka et al., *Biosci Biotechnol Biochem.*, 71:58-68 (2007)).

Proteína	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
acr1	YP_047869.1	50086359	*Acinetobacter calcoaceticus*
acr1	AAC45217	1684886	*Acinetobacter baylyi*
acr1	BAB85476.1	18857901	*Acinetobacter sp. Strain M-1*
MSED_0709	YP_001190808.1	146303492	*Metallosphaera sedula*
Tneu_0421			*Thermoproteus neutrophilus*
sucD	P38947.1	172046062	*Clostridium kluyveri*
sucD	NP_904963.1	34540484	*Porphyromonas gingivalis*

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
bphG	BAA03892.1	425213	*Pseudomonas sp*
adhE	AAV66076.1	55818563	*Leuconostoc mesenteroides*
bld	AAP42563.1	31075383	*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*

[0328] Un tipo de enzima adicional que convierte una acil-CoA en su correspondiente aldehído es malonil-CoA reductasa, que transforma malonil-CoA en semialdehído malónico. Malonil-CoA reductasa es una enzima clave en la fijación de carbono autotrófico mediante el ciclo de 3-hidroxipropionato en bacterias arqueas termoacidófilas (Berg, *Science* 318:1782-1786 (2007); y Thauer, *Science* 318:1732-1733 (2007)). La enzima utiliza NADPH como un cofactor y se ha caracterizado en *Metallosphaera* y *Sulfolobus sp.* (Alber et al., *J. Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006); y Hugler, *J. Bacteriol.* 184:2404-2410 (2002)). La enzima se codifica por *Msed_0709* en *Metallosphaera sedula* (Alber et al., *J. Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006); y Berg, *Science* 318:1782-1786 (2007)). Un gen que codifica una malonil-CoA reductasa de *Sulfolobus tokodaii* se clonó y se expresó heterólogamente en *E. coli* (Alber et al., *J. Bacteriol* 188:8551-8559 (2006). De igual manera, se ha demostrado que esta enzima cataliza la conversión de metilmalonil-CoA en su correspondiente aldehído (WO2007141208 (2007)). Aunque la funcionalidad aldehído deshidrogenasa de estas enzimas es similar a la deshidrogenasa bifuncional de *Chloroflexus aurantiacus*, existe poca similitud de secuencia. Las dos enzimas candidatas malonil-CoA reductasas tienen una elevada similitud de secuencia con aspartato-semialdehído deshidrogenasa, una enzima que cataliza la reducción y desfosforilación concurrente de aspartil-4-fosfato a aspartato semialdehído. Genes candidatos adicionales pueden encontrarse por homología de secuencia con proteínas en otros organismos incluyendo *Sulfolobus solfataricus* y *Sulfolobus acidocaldarius* y se han enumerado a continuación. Todavía otro candidato para aldehído deshidrogenasa acilante de CoA es el gen *ald* de *Clostridium beijerinckii* (Toth, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4973-4980 (1999). Se ha informado que esta enzima reduce acetil-CoA y butiril-CoA a sus correspondientes aldehídos. Este gen es muy similar a *eutE* que codifica acetaldehído deshidrogenasa de *Salmonella typhimurium* y *E. coli* (Toth, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4973-4980 (1999).

Gen	ID GenBank	Número GI	Organismo

Gen	ID GenBank	Número GI	Organismo
Msed_0709	YP_001190808.1	146303492	*Metallosphaera sedula*
mcr	NP_378167.1	15922498	*Sulfolobus tokodaii*
asd-2	NP_343563.1	15898958	*Sulfolobus solfataricus*
Saci_2370	YP_256941.1	70608071	*Sulfolobus acidocaldarius*
Ald	AAT66436	49473535	*Clostridium beijerinckii*
eutE	AAA80209	687645	*Salmonella typhimurium*
eutE	P77445	2498347	*Escherichia coli*

[0329] Un enzima bifuncional con actividad acil-CoA reductasa y alcohol deshidrogenasa puede convertir directamente metilmalonil-CoA en 3-hidroxiisobutirato. Oxidorreductasas bifuncionales ejemplares que convierten una acil-CoA en alcohol incluyen aquellas que transforman sustratos tales como acetil-CoA en etanol (por ejemplo, *adhE* de *E. coli* (Kessler et al., *FEBS.Lett.* 281:59-63 (1991))) y butiril-CoA en butanol (por ejemplo, *adhE2* de *C. acetobutylicum* (Fontaine et al., *J.Bacteriol.* 184:821-830 (2002)). Las enzimas de *C. acetobutylicum* codificadas por *bdh* I y *bdh* II (Walter, et al., *J. Bacteriol.* 174:7149-7158 (1992)) reducen acetil-CoA y butiril-CoA a etanol y butanol, respectivamente. Aparte de reducir acetil-CoA a etanol, se ha demostrado que la enzima codificada por *adhE* en *Leuconostoc mesenteroides* oxida el compuesto de cadena ramificada isobutiraldehído a isobutiril-CoA (Kazahaya et al., *J.Gen.Appl.Microbiol.* 18:43-55 (1972); Koo et al., *Biotechnol Lett,* 27:505-510 (2005)). Otra enzima ejemplar puede convertir malonil-CoA en 3-HP. Una enzima dependiente de NADPH-con esta actividad se ha caracterizado en *Chloroflexus aurantiacus*, donde participa en el ciclo de 3-hidroxipropionato (Hugler et al., *J Bacteriol*, 184:2404-2410 (2002); Strauss et al., *Eur J Biochem*, 215:633-643 (1993)). Esta enzima, con una masa de 300 kDa, es altamente específica del sustrato y muestra poca similitud de secuencia con otras oxidorreductasas conocidas (Hugler et al., *supra*). No se han demostrado enzimas en otros organismos que catalicen esta reacción específica; no obstante, existe evidencia bioinformática de que otros organismos pueden tener vías similares (Klatt et al., *Env Microbiol*, 9:2067-2078 (2007)). Las enzimas candidatas en otros organismos incluyendo *NAP1* de *Roseiflexus castenholzii*, *Erythrobacter sp.* y la proteobacteria gamma marina HTCC2080 pueden inferirse por similitud de secuencia.

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
adhE	NP_415757.1	16129202	*Escherichia coli*
adhE2	AAK09379.1	12958626	*Clostridium acetobutylicum*
adhE	AAV66076.1	55818563	*Leuconostoc mesenteroides*
bdh I	NP_349892.1	15896543	*Clostridium acetobutylicum*
bdh II	NP_349891.1	15896542	*Clostridium acetobutylicum*
mcr	AAS20429.1	42561982	*Chloroflexus aurantiacus*
Rcas_2929	YP_001433009.1	156742880	*Roseiflexus castenholzii*
NAP1_02720	ZP_01039179.1	85708113	*Erythrobacter sp. NAP1*
MGP2080_00535	ZP_01626393.1	119504313	*marine gamma proteobacterium HTCC2080*

[0330] Con referencia a Figura 3, el paso 4 involucra 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa (EC 1.1.1.31). 3-Hidroxiisobutirato deshidrogenasa cataliza la oxidación reversible de 3-hidroxiisobutirato a metilmalonato semialdehído. La reducción de metilmalonato semialdehído a 3-hidroxiisobutirato se cataliza por metilmalonato semialdehído reductasa o 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa. Esta enzima participa en la degradación de valina, leucina e isoleucina y se ha identificado en bacterias, eucariotas, y mamíferos. Se ha caracterizado estructuralmente la enzima codificada por *P84067* de *Thermus thermophilus* HB8 (Lokanath et al., *J. Mol. Biol.* 352:905-917 (2005)). La reversibilidad de la 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa humana se demostró usando sustrato marcado isotópicamente (Manning and Pollitt, *Biochem. J.* 231:481-484 (1985)). Genes adicionales que codifican esta enzima incluyen *3hidh* en *Homo sapiens* (Hawes et al., *Methods Enzymol.* 324:218-228 (2000)) y *Oryctolagus cuniculus* (Chowdhury et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60:2043-2047 (1996); Hawes et al., *Methods Enzymol.* 324:218-228 (2000)), *mmsb* en *Pseudomonas aeruginosa*, y *dhat* en *Pseudomonas putida* (Aberhart and Hsu., *J Chem.Soc. [Perkin 1]* 6:1404-1406 (1979); Chowdhury et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67:438-441 (2003); Chowdhury et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60:2043-2047 (1996)). Varias

enzimas 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasas se han caracterizado en la dirección reductora, incluyendo *mmsB* de *Pseudomonas aeruginosa* (Gokarn et al., Patente de los Estados Unidos 7,393,676 (2008)) y *mmsB* de *Pseudomonas putida*.

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

[0331] Con referencia a Figura 3, como una alternativa, los pasos 3 y 4 pueden involucrar una alcohol/aldehído deshidrogenasa combinada (EC 1.2.1.-). Metilmalonil-CoA puede reducirse a 3-hidroxiisobutirato en un paso por una enzima multifuncional con doble actividad acil-CoA reductasa y alcohol deshidrogenasa. Aunque no se ha informado la conversión directa de metilmalonil-CoA en 3-hidroxiisobutirato, esta reacción es similar a las conversiones comunes tales como acetil-CoA en etanol y butiril-CoA en butanol, las cuales se catalizan por enzimas dependientes de CoA con ambas actividades alcohol y aldehído deshidrogenasa. Genes candidatos incluyen el *adhE* de *E. coli* (Kessler et al., *FEBS Lett.* 281:59-63 (1991)) y *bdh* I y *bdh* II de *C. acetobutylicum* (Walter, et al., *J. Bacteriol.* 174:7149-7158 (1992)), los cuales pueden reducir acetil-CoA y butiril-CoA a etanol y butanol, respectivamente. Aparte de reducir acetil-CoA a etanol, se ha demostrado que la enzima codificada por *adhE* en *Leuconostoc mesenteroides* oxida el compuesto de cadena ramificada isobutiraldehído a isobutiril-CoA (Kazahaya et al., *J. Gen. Appl. Microbiol.* 18:43-55 (1972); Koo et al., *Biotechnol. Lett.* 27:505-510 (2005)). Una enzima candidata adicional para convertir metilmalonil-CoA directamente en 3-hidroxiisobutirato se codifica por una malonil-CoA reductasa de *Chloroflexus aurantiacus* (Hügler, et al., *J. Bacteriol.* 184(9):2404-2410 (2002).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
mcr	YP_001636209.1	163848165	*Chloroflexus aurantiacus*
adhE	NP_415757.1	16129202	*Escherichia coli*
bdh I	NP_349892.1	15896543	*Clostridium acetobutylicum*
bdh II	NP_349891.1	15896542	*Clostridium acetobutylicum*

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
adhE	AAV66076.1	55818563	*Leuconostoc mesenteroides*

[0332] Con referencia a Figura 3, el paso 5 involucra 3-hidroxiisobutirato deshidratasa (EC 4.2.1.-). El paso final implica la deshidratación de 3-hidroxiisobutirato a ácido metacrílico. La deshidratación de 3-hidroxiisobutirato a ácido metilacrílico se cataliza por una enzima con actividad 3-hidroxiisobutirato deshidratasa. Aunque no se ha identificado evidencia directa para esta transformación enzimática específica, la mayoría de las deshidratasas catalizan la □,□-eliminación de agua, lo cual implica la activación del □-hidrógeno por un carbonilo de retiro de electrones, carboxilato, o grupo éster de CoA-tiol y eliminación del grupo hidroxilo de la □-posición (Buckel and Barker, *J Bacteriol.* 117:1248-1260 (1974); Martins et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:15645-15649 (2004)). Este es el tipo exacto de transformación propuesta para el paso final en la vía de metacrilato. Además, la transformación propuesta es altamente similar a la 2-(hidroximetil)glutarato deshidratasa de *Eubacterium barkeri*, la cual puede catalizar la conversión de 2-hidroximetil glutarato en 2-metileno glutarato. Esta enzima se ha estudiado en el contexto del catabolismo del nicotinato y se codifica por *hmd* (Alhapel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:12341-12346 (2006)). Enzimas similares con alta homología de secuencia se encuentran en *Bacteroides capillosus*, *Anaerotruncus colihominis*, y *Natranaerobius thermophilius*. Varias enzimas son conocidas por catalizar la eliminación alfa, beta, de grupos hidroxilo. Enzimas ejemplares incluyen 2-(hidroximetil)glutarato deshidratasa (EC 4.2.1.-), fumarasa (EC 4.2.1.2), 2-ceto-4-pentenoato deshidratasa (EC 4.2.1.80), citramalato hidroliasa y dimetilmaleato hidratasa.

[0333] 2-(Hidroximetil)glutarato deshidratasa es una enzima con contenido de [4Fe-4S] que deshidrata 2-(hidroximetil)glutarato a 2-metilen-glutarato, estudiada por su papel en el catabolismo del nicontinato en *Eubacterium barkeri* (anteriormente *Clostridium barkeri*) (Alhapel et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12341-12346 (2006)). Enzimas similares con alta homología de secuencia se encuentran en *Bacteroides capillosus, Anaerotruncus colihominis*, y *Natranaerobius thermophilius*. Estas enzimas son también homólogas con las subunidades □ y □□de□serina deshidratasas bacterianas con contenido de [4Fe-4S], por ejemplo, enzimas de *E. coli* codificadas por *tdcG*, *sdhB*, y *sdaA*). Una enzima con funcionalidad similar en *E. barkeri* es dimetilmaleato hidratasa, una

enzima sensible al oxígeno y dependiente de Fe2+, reversible, en la familia de aconitasas, que hidrata dimetilmaleato para formar (2R,3S)-2,3-dimetilmalato. Esta enzima se codifica por dmdAB (Alhapel et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12341-6 (2006); Kollmann-Koch et al., *Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem.* 365:847-857 (1984)).

Proteína	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
hmd	ABC88407.1	86278275	*Eubacterium barkeri*
BACCAP_02294	ZP_02036683.1	154498305	*Bacteroides capillosus*
ANACOL_02527	ZP_02443222.1	167771169	*Anaerotruncus colihominis*
NtherDRAFT_2368	ZP_02852366.1	169192667	*Natranaerobius thermophilus*
dmdA	ABC88408	86278276	*Eubacterium barkeri*
dmdB	ABC88409	86278277	*Eubacterium barkeri*

[0334] Enzimas fumarato hidratasas, las cuales catalizan naturalmente la hidratación reversible de fumarato a malato. Aunque no se ha descrito la capacidad de la fumarato hidratasa para reaccionar en sustratos ramificados con 3-oxobutanol como sustrato, se encuentra disponible para esta enzima una gran cantidad de información estructural, y otros investigadores han generado exitosamente la enzima mediante ingeniería genética para alterar la actividad, inhibición y localización (Weaver, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 61:1395-1401 (2005)). La *E. coli* tiene tres fumarasas: FumA, FumB, y FumC que se regulan por condiciones de crecimiento. FumB es sensible al oxígeno y únicamente activa bajo condiciones anaerobias. FumA es activa bajo condiciones microanaerobias, y FumC es la única enzima activa en crecimiento aerobio (Tseng et al., *J. Bacteriol.* 183:461-467 (2001); Woods et al., *Biochm. Biophys. Acta* 954:14-26 (1988); Guest et al., *J Gen Microbiol* 131:2971-2984 (1985)). Enzimas candidatas ejemplares incluyen las codificadas por *fumC* de *Escherichia coli* (Estevez et al., *Protein Sci.* 11:1552-1557 (2002); Hong and Lee, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 9:252-255 (2004); Rose and Weaver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:3393-3397 (2004)), y enzimas encontradas en *Campylobacter jejuni* (Smith et al., *Int. J. Biochem.Cell Biol.* 31:961-975 (1999)), *Thermus thermophilus* (Mizobata et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 355:49-55 (1998)), y *Rattus norvegicus* (Kobayashi et al., *J. Biochem.* 89:1923-1931 (1981)). Enzimas similares con homología de secuencia incluyen *fum1* de *Arabidopsis thaliana* y *fumC* de *Corynebacterium*

glutamicum. La fumarasa *MmcBC* de *Pelotomaculum thermopropionicum* es otra clase de fumarasa con dos subunidades (Shimoyama et al., *FEMS Microbiol Lett.* 270:207-213 (2007)).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
fumA	NP_416129.1	16129570	*Escherichia coli*
fumB	NP_418546.1	16131948	*Escherichia coli*
fumC	NP_416128.1	16129569	*Escherichia coli*
fumC	O69294	9789756	*Campylobacter jejuni*
fumC	P84127	75427690	*Thermus thermophilus*
fumH	P14408	120605	*Rattus norvegicus*
fum1	P93033	39931311	*Arabidopsis thaliana*
fumC	Q8NRN8	39931596	*Corynebacterium glutamicum*
MmcB	YP_001211906	147677691	*Pelotomaculum thermopropionicum*
MmcC	YP_001211907	147677692	*Pelotomaculum thermopropionicum*

[0335] 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 vías de degradación aromática y se co-transcribe típicamente con un gen que codifica una enzima con actividad4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa. Productos de genes 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 de ácido 4-hidroxifenilacético, donde convierte 2-oxo-hept-4-eno-1,7-dioato (OHED) en 2-oxo-4-hidroxi-hepta-1,7-dioato usando magnesio como cofactor (Burks et al., *J.Am.Chem.Soc.* 120: (1998)). Las enzimas candidatas OHED hidratasas 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 una amplia gama de bacterias, plantas y animales. Enzimas

con secuencias altamente similares se encuentran contenidas en *Klebsiella pneumonia* (91% identidad, valor E = 2e-138) y *Salmonella enterica* (91% identidad, valor E = 4e-138), entre otras.

Gen	No. de Accesión a GenBank	GI No.	Organismo
mhpD	AAC73453.2	87081722	*Escherichia coli*
cmtF	AAB62293.1	1263188	*Pseudomonas putida*
todG	AAA61942.1	485738	*Pseudomonas putida*
cnbE	YP_001967714.1	190572008	*Comamonas* sp. CNB-1
mhpD	Q13VU0	123358582	*Burkholderia xenovorans*
hpcG	CAA57202.1	556840	*Escherichia coli C*
hpaH	CAA86044.1	757830	*Escherichia coli W*
hpaH	ABR80130.1	150958100	*Klebsiella pneumoniae*
Sari_01896	ABX21779.1	160865156	*Salmonella enterica*

[0336] Otra enzima candidata es citramalato hidroliasa (EC 4.2.1.34), una enzima que deshidrata naturalmente 2-metilmalato a mesaconato. Esta enzima se ha estudiado en *Methanocaldococcus jannaschii* en el contexto de la vía de piruvato a 2-oxobutanoato, donde se ha demostrado que tiene una amplia especificidad de sustrato (Drevland et al., *J Bacteriol.* 189:4391-4400 (2007)). La actividad de esta enzima se detectó igualmente en *Clostridium tetanomorphum*, *Morganella morganii, Citrobacter amalonaticus* donde se cree que participa en la degradación de glutamato (Kato et al., *Arch.Microbiol* 168:457-463 (1997)). La secuencia proteica de *M. jannaschii* no porta homología significativa con genes en estos organismos.

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
leuD	Q58673.1	3122345	*Methanocaldococcus jannaschii*

[0337] Dimetilmaleato hidratasa (EC 4.2.1.85) es una enzima sensible al oxígeno y dependiente de Fe^{2+}, reversible, en la familia de las aconitasas, que hidrata dimetilmaleato para formar (2R, 3S)-2,3-dimetilmalato. Esta enzima se codifica por *dmdAB* en *Eubacterium barkeri* (Alhapel et al., *supra*; Kollmann-Koch et al., *Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem.* 365:847-857 (1984)).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
dmdA	ABC88408	86278276	*Eubacterium barkeri*
dmdB	ABC88409.1	86278277	*Eubacterium barkeri*

[0338] Este ejemplo describe una vía biosintética para la producción de MMA a partir de succinil-CoA.

EJEMPLO VI

Vía para la Conversión de Succinil-CoA en MAA mediante 3-Amino-2-Metilpropanoato

[0339] Este ejemplo describe una vía ejemplar para la síntesis de MAA a partir de succinil-CoA a MAA mediante 3-amino-metilpropanoato.

[0340] Otra vía ejemplar para la biosíntesis de MAA procede a partir de succinil-CoA a través de 3-amino-2-metilpropanoato (véase Figura 4). Los primeros tres pasos de esta vía, que implica la conversión de succinil-CoA en metilmalonato semialdehído, son idénticos a la vía succinil-CoA a MAA descrita en Ejemplo V (véase Figura 3). La vía diverge en el paso 4, donde metilmalonato semialdehído se convierte en 3-amino-2-metilpropionato por una transaminasa. El paso final de la vía implica la desaminación de 3-amino-2-metilpropionato a ácido metacrílico.

[0341] Enzimas y genes candidatos para catalizar los primeros tres pasos de la vía se describen en Ejemplo V. Genes candidatos para los pasos 4 y 5 se discuten a continuación.

[0342] Con referencia a Figura 4, el paso 4 involucra 3-amino-2-metilpropionato transaminasa (EC 2.6.1.22). La 3-amino-2-metilpropionato transaminasa cataliza la transformación de metilmalonato semialdehído en 3-amino-2-metilpropionato. Se ha demostrado que la enzima, caracterizada en *Rattus norvegicus* y *Sus scrofa* y codificada por *Abat*, cataliza esta transformación en la dirección de interés en la vía (Kakimoto et al., *Biochim. Biophys. Acta* 156:374-380 (1968); Tamaki et al., *Methods Enzymol.* 324:376-389 (2000)). Enzimas candidatas en otros organismos con elevada homología de secuencia con 3-amino-2-metilpropionato transaminasa incluyen *Gta-1* en *C. elegans* y *gabT* en *Bacillus subtilus*. Adicionalmente, se ha demostrado que una de las GABA aminotransferasas nativas en *E. coli*, codificada por el gen *gabT*, tiene una amplia especificidad de sustrato y puede utilizar 3-amino-2-metilpropionato como sustrato (Liu et al., *Biochemistry* 43:10896-10905 (2004); Schulz et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1-6 (1990)).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
Abat	P50554.3	122065191	*Rattus norvegicus*
Abat	P80147.2	120968	*Sus scrofa*
Gta-1	Q21217.1	6016091	*Caenorhabditis elegans*
gabT	P94427.1	6016090	*Bacillus subtilus*
gabT	P22256.1	16130576	*Escherichia coli K12*

[0343] Con referencia a Figura 4, el paso 5 involucra 3-amino-2-metilpropionato amoníaco liasa (EC 4.3.1.-). En el paso final de esta vía, 3-amino-2-metilpropionato se desamina a ácido metacrílico. Una enzima que cataliza esta transformación exacta no se ha demostrado experimentalmente; sin embargo, la enzima *E. coli* nativa, aspartato amoníaco liasa (EC 4.3.1.1), puede estar en capacidad de catalizar esta reacción. Codificada por *aspA* en *E. coli*, la aspartato amoníaco liasa desamina aspartato para formar fumarato, pero puede reaccionar también con sustratos alternos aspartato fenilmetiléster, asparagina, bencil-aspartato y malato (Ma et al., *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 672:60-65 (1992)). En un estudio separado, se ha empleado evolución dirigida en esta enzima para alterar la especificidad del sustrato (Asano et al., *Biomol. Eng.* 22:95-101 (2005)). Genes que codifican aspartasa en otros organismos incluyen *ansB* en *Bacillus subtilus* (Sjostrom et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1324:182-190 (1997)) y *aspA* en *Pseudomonas fluorescens* (Takagi et al., *J. Biochem.* 96:545-552 (1984); Takagi et al., *J. Biochem.* 100:697-705 (1986)) y *Serratia marcescens* (Takagi et al., *J. Bacteriol.* 161:1-6 (1985)).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
aspA	P0AC38.1	90111690	*Escherichia coli K12*
ansB	P26899.1	251757243	*Bacillus subtilus*
aspA	P07346.1	114273	*Pseudomonas fluorescens*
aspA	P33109.1	416661	*Serratia marcescens*

[0344] Este ejemplo describe una vía biosintética de MAA a partir de succinil-CoA.

EJEMPLO VII

Vía para la Conversión de 4-Hidroxibutiril-CoA en Ácido 3-Hidroxiisobutírico o MAA

[0345] Este ejemplo describe una vía ejemplar de síntesis de ácido 3-hidroxiisobutírico o MAA a partir de 4-hidroxibutiril-CoA.

[0346] Una vía ejemplar adicional implica la conversión de 4HB-CoA en MAA (véase Figura 5). En el primer paso, 4HB-CoA se convierte en 3-hidroxiisobutiril-CoA (3-Hib-CoA) por una metilmutasa. 3-Hib-CoA puede convertirse entonces en 3-hidroxiisobutirato por una CoA hidrolasa, sintasa o transferasa. 3-Hidroxiisobutirato puede segregarse y recuperarse como un producto o como un paso final en la producción de ácido metacrílico. 3-Hidroxibutirato puede deshidratarse para formar ácido metacrílico. Alternativamente, 3-Hib-CoA puede deshidratarse a metacrilil-CoA, la cual se convierte luego en MAA por una hidrolasa, sintasa, o transferasa. Las enzimas requeridas para convertir los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, alfa-ketoglutarato, succinato, o succinil-CoA, en 4HB-CoA, están bien documentados (Burk et al., solicitud de los Estados Unidos serial No. 12/049,256, presentada el 14 de marzo de 2008; Lutke-Eversloh and Steinbuchel. *FEMS Microbiol. Lett.* 181:63-71 (1999); Sohling and Gottschalk, *Eur. J. Biochem.* 212:121-127 (1993); Sohling and Gottschalk, *J. Bacteriol.* 178:871-880 (1996); Valentin et al., *Eur. J. Biochem.* 227:43-60 (1995); Wolff and Kenealy, *Protein Expr. Purif.* 6:206-212. (1995)).

[0347] Con referencia a Figura 5, el paso 1 involucra 4-hidroxibutiril-CoA mutasa (EC 5.4.99.-). La conversión de 4HB-CoA en 3-hidroxiisobutiril-CoA tiene que demostrarse aún experimentalmente. No obstante, dos metilmutasas, es decir, isobutiril-CoA mutasa (ICM) y metilmalonil-CoA mutasa (MCM), que catalizan reacciones similares, son excelentes candidatas, dada la similitud estructural de sus correspondientes sustratos. Metilmalonil-CoA mutasa es una enzima dependiente de cobalamina que convierte succinil-CoA en metilmalonil-CoA. Esta enzima y genes candidatos apropiados se discutieron en la vía de la succinil-CoA a MAA (véase Ejemplo V).

[0348] Alternativamente, isobutiril-CoA (ICM, EC 5.4.99.13) podría catalizar la transformación propuesta. ICM es una metilmutasa dependiente de cobalamina en la familia MCM, que re-arregla reversiblemente el esqueleto de carbono de butiril-CoA en isobutiril-CoA (Ratnatilleke et al., *J. Biol. Chem.* 274:31679-31685 (1999)). Un reciente estudio de una ICM novedosa en *Methylibium petroleiphilum*, junto con un trabajo previo, aporta evidencia de que cambiar un solo aminoácido cerca del sitio activo altera la especificidad del sustrato de la enzima (Ratnatilleke et al., *J. Biol. Chem.* 274:31679-31685 (1999); Rohwerder et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4128-4135. (2006)). Esto indica que, si una enzima nativa no es capaz de

catalizar o exhibe baja actividad para la conversión de 4HB-CoA en 3HIB-CoA, la enzima puede generarse razonablemente mediante ingeniería genética para aumentar esta actividad. Genes ICM ejemplares, que codifican enzimas homodiméricas, incluyen *icmA* en *Streptomyces coelicolor A3* (Alhapel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:12341-12346 (2006)) y *Mpe_B0541* en *Methylibium petroleiphilum PM1* (Ratnatilleke et al., *J. Biol. Chem.* 274:31679-31685 (1999); Rohwerder et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4128-4135 (2006)). Genes que codifican enzimas heterodiméricas incluyen *icm* e *icmB* en *Streptomyces cinnamonensis* (Ratnatilleke et al., *J. Biol. Chem.* 274:31679-31685 (1999); Vrijbloed et al., *J. Bacteriol.* 181:5600-5605. (1999); Zerbe-Burkhardt et al., *J. Biol. Chem.* 273:6508-6517 (1998)). Enzimas codificadas por los genes *icmA* e *icmB* en *Streptomyces avermitilis MA-4680* muestran una elevada similitud de secuencia con ICMs conocidas. Estos genes/proteínas se identifican a continuación.

Gen	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
icmA	CAB40912.1	4585853	*Streptomyces coelicolor A3(2)*
Mpe_B0541	YP_001023546.1	124263076	*Methylibium petroleiphilum PM1*
icm	AAC08713.1	3002492	*Streptomyces cinnamonensis*
icmB	CAB59633.1	6137077	*Streptomyces cinnamonensis*
icmA	NP_824008.1	29829374	*Streptomyces avermitilis*
icmB	NP_824637.1	29830003	*Streptomyces avermitilis*

[0349] Con referencia a Figura 5, el paso 2 involucra 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.4), sintetasa (EC 6.2.1.-) o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa (EC 2.8.3.-). El paso 5 involucra metacrilil-CoA hidrolasa, sintetasa, o transferasa. Estas transformaciones pueden llevarse a cabo por diferentes clases de enzimas incluyendo CoA hidrolasas (EC 3.1.2.-), CoA transferasas (EC 2.8.3.-), y CoA sintetasas (EC 6.1.2.-). Como se discute anteriormente, la energética de la vía es muy favorable si se emplea una CoA transferasa o una CoA sintetasa para realizar esta transformación (Tabla 1).

[0350] En la familia de CoA-transferasas, se ha demostrado que la enzima de *E. coli* acil-CoA:acetato-CoA transferasa, también conocida como acetato-CoA

transferasa (EC 2.8.3.8), transfiere la fracción CoA a acetato de una variedad de sustratos acil-CoA lineales y ramificados, incluyendo isobutirato (Matthies and Schink, *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1435-1439 (1992)), valerato (Vanderwinkel et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33:902-908 (1968)) y butanoato (Vanderwinkel et al. *supra*, 1968). Esta enzima se codifica por *atoA* (subunidad alfa) y *atoD* (subunidad beta) en K12 de *E. coli* sp. (Korolev et al., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58:2116-2121 (2002); Vanderwinkel et al., *supra*, 1968) y *actA* y *cg0592* en *Corynebacterium glutamicum ATCC 13032* (Duncan et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5186-5190 (2002)) y representa una candidata ideal para catalizar las biotransformaciones de 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa o metacrilil-CoA transferasa deseadas, mostradas en Figura 5, pasos 2 y 5. Genes candidatos por homología de secuencia incluyen *atoD* y *atoA* en *Escherichia coli* UT189. Enzimas similares existen igualmente en *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium saccharoperbutylacetonicum.*

Gen	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
atoA	P76459.1	2492994	*Escherichia coli K12*
atoD	P76458.1	2492990	*Escherichia coli K12*
actA	YP_226809.1	62391407	*Corynebacterium glutamicum ATCC 13032*
cg0592	YP_224801.1	62389399	*Corynebacterium glutamicum ATCC 13032*
atoA	ABE07971.1	91073090	*Escherichia coli UT189*
atoD	ABE07970.1	91073089	*Escherichia coli UT189*
ctfA	NP_149326.1	15004866	*Clostridium acetobutylicum*
ctfB	NP_149327.1	15004867	*Clostridium acetobutylicum*
ctfA	AAP42564.1	31075384	*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*
ctfB	AAP42565.1	31075385	*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*

[0351] Trasformaciones de transferasas adicionales ejemplares se catalizan por los productos de los genes *cat1, cat2*, y *cat3* de *Clostridium kluyveri*, los cuales han demostrado exhibir actividad succinil-CoA, 4-hidroxibutiril-CoA, y butiril-CoA acetiltransferasa, respectivamente (Sohling and Gottschalk, *J. Bacteriol.* 178(3):

871-880 (1996); Seedorf et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(6):2128-2133 (2008)).

Gen	ID GenBank	Número GI	Organismo
cat1	P38946.1	729048	*Clostridium kluyveri*
cat2	P38942.2	172046066	*Clostridium kluyveri*
cat3	EDK35586.1	146349050	*Clostridium kluyveri*

[0352] La enzima glutaconato-CoA-transferasa (EC 2.8.3.12) de la bacteria anaerobia *Acidaminococcus fermentans* reacciona con diácido glutaconil-CoA y 3-butenoiyl-CoA (Mack and Buckel, *FEBS Lett.* 405:209-212 (1997)). Los genes que codifican esta enzima son *gctA* y *gctB*. Esta enzima tiene actividad reducida pero detectable con otros derivados CoA, incluyendo glutaril-CoA, 2-hidroxiglutaril-CoA, adipil-CoA y acrilil-CoA (Buckel et al., *Eur. J. Biochem.* 118:315-321 (1981)). La enzima se ha clonado y expresado en *E. coli* (Mack et al., *Eur. J. Biochem.* 226:41-51 (1994)).

Gen	ID GenBank	Número GI	Organismo
gctA	CAA57199.1	559392	*Acidaminococcus fermentans*
gctB	CAA57200.1	559393	*Acidaminococcus fermentans*

[0353] Enzimas candidatas adicionales incluyen succinil-CoA:3-cetoácido CoA transferasas las cuales utilizan succinato como el aceptor CoA. Succinil-CoA:3:cetoácido -CoA transferasas ejemplares están presentes en *Helicobacter pylori* (Corthesy-Theulaz et al., *J. Biol. Chem.* 272:25659-25667 (1997)) y *Bacillus subtilis* (Stols et al., *Protein Expr. Purif.* 53:396-403 (2007)).

Gen	ID GenBank	Número GI	Organismo
HPAG1_0676	YP_627417	108563101	*Helicobacter pylori*
HPAG1_0677	YP_627418	108563102	*Helicobacter pylori*
ScoA	NP_391778	16080950	*Bacillus subtilis*
ScoB	NP_391777	16080949	*Bacillus subtilis*

[0354] Una ATP sintasa candidata es acetil-CoA sintetasa formadora de ADP (ACD, EC 6.2.1.13), una enzima que acopla la conversión de ésteres de acil-CoA en sus correspondientes ácidos con la síntesis concurrente de ATP. Aunque no se ha demostrado que esta enzima reaccione con 3-hidroxiisobutiril-CoA o metacrilil-CoA como sustrato, varias enzimas con amplias especificidades de sustrato se

han descrito en la literatura. Se ha demostrado que ACD I de *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por AF1211, opera en una variedad de sustratos de cadena lineal y ramificada incluyendo isobutirato, isopentanoato, y fumarato (Musfeldt and Schonheit, *J. Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). La enzima de *Haloarcula marismortui* (anotada como una succinil-CoA sintetasa) acepta priopionato, butirato, y ácidos de cadena ramificada (isovalerato e isobutirato) como sustratos, y se demostró que opera en las direcciones hacia adelante y hacia atrás (Brasen and Schonheit, *Arch. Microbiol.* 182:277-287 (2004)). La ACD codificada por *PAE3250* de la crenarquea hipertermófila *Pyrobaculum aerophilum* mostró la gama más amplia de sustratos de todas las ACDs caracterizadas, reaccionando con acetil-CoA, isobutiril-CoA (sustrato preferido) y fenilacetil-CoA (Brasen and Schonheit, *supra*, 2004). No obstante, la evolución dirigida o generación mediante ingeniería genética pueden usarse para modificar esta enzima para que opere a la temperatura fisiológica del organismo hospedero. Todas las enzimas de *A. fulgidus*, *H. marismortui* y *P. aerophilum* se han clonado, expresado funcionalmente, y caracterizado en *E. coli* (Brasen and Schonheit, *supra*, 2004; Musfeldt and Schonheit, *J. Bacteriol.* 184:636-644 (2002)).

Gen	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
AF1211	NP_070039.1	11498810	*Archaeoglobus fulgidus DSM 4304*
scs	YP_135572.1	55377722	*Haloarcula marismortui ATCC 43049*
PAE3250	NP_560604.1	18313937	*Pyrobaculum aerophilum str. IM2*

[0355] En la familia de CoA hidrolasas, la enzima 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa es específica para 3-HIBCoA y se ha descrito que cataliza eficientemente la transformación deseada durante la degradación de valina (Shimomura et al., *J. Biol. Chem.* 269:14248-14253 (1994)). Genes que codifican esta enzima incluyen *hibch* de *Rattus norvegicus* (Shimomura et al., *J. Biol. Chem.* 269:14248-14253 (1994); Shimomura et al., *Methods Enzymol.* 324:229-240 (2000)) y *Homo sapiens* (Shimomura et al., *supra*, 2000). Genes candidatos por homología de secuencia incluyen *hibch* de *Saccharomyces cerevisiae* y *BC_2292* de *Bacillus cereus*.

Gen	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**

Gen	ID GenBank	Número GI	Organismo
hibch	Q5XIE6.2	146324906	*Rattus norvegicus*
hibch	Q6NVY1.2	146324905	*Homo sapiens*
hibch	P28817.2	2506374	*Saccharomyces cerevisiae*
BC_2292	Q81DR3	29895975	*Bacillus cereus*

[0356] Con referencia a Figura 5, el paso 3 involucra 3-hidroxiisobutirato deshidratasa (EC 4.2.1.-). Esto incluye la deshidratación de 3-hidroxiisobutirato a MAA por 3-hidroxiisobutirato deshidratasa. Genes candidatos para esta enzima se describen en la vía de succinil-CoA a MAA (véase Ejemplo V). También con referencia a Figura 5, el paso 4 involucra 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa (EC 4.2.1.-). La deshidratación de 3-hidroxiisobutiril-CoA a metacrilil-CoA puede llevarse a cabo por una 3-hidroxiacil-CoA deshidratasa reversible, tal como crotonasa (también llamada 3-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, EC 4.2.1.55) o enoil-CoA hidratasa (también denominada 3-hidroxiacil-CoA deshidratasa, EC 4.2.1.17). Estas enzimas son generalmente reversibles (Moskowitz and Merrick, *Biochemistry* 8:2748-2755 (1969); Durre et al., *FEMS Microbiol. Rev.* 17:251-262 (1995)). Genes ejemplares que codifican enzimas crotonasas pueden encontrarse en *C. acetobutylicum* (Boynton, et al., *J. Bacteriol.* 178(11):3015-3024 (1996)), *C. kluyveri* (Hillmer and Gottschalk, *FEBS Lett.* 21(3):351-354 (1972)), y *Metallosphaera sedula* (Berg et al., *Science* 318(5857) 1782-1786 (2007)), si bien se desconoce la secuencia del último gen. Enoil-CoA hidratasas, las cuales se encuentran involucradas en la beta oxidación de ácidos grasos y/o el metabolismo de varios aminoácidos, pueden catalizar asimismo la hidratación de Crotonil-CoA para formar 3-hidroxibutiril-CoA (Agnihotri and Liu, *Bioorg. Med. Chem.* 11(1):9-20 (2003); Roberts et al., *Arch. Microbiol.* 117(1):99-108 (1978); Conrad et al., *J. Bacteriol.* 118(1):103-111 (1974)). Se cree que las enoil-CoA hidratasas, *phaA* y *phaB*, de *P. putida* llevan a cabo la hidroxilación de enlaces dobles durante el catabolismo de fenilacetato (Olivera et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6419-6424 (1998)). Los *paaA* y *paaB* de *P. fluorescens* catalizan transformaciones análogas (Olivera et al., *supra,* 1998). Por último, se ha demostrado que un número de genes de *Escherichia coli* presentan funcionalidad enoil-CoA hidratasa, incluyendo *maoC* (Park and Lee, *J. Bacteriol.* 185:5391-5397 (2003)), *paaF* (Ismail et al., *Eur. J. Biochem.* 270:3047-3054 (2003); Park and Lee, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113-116:335-346 (2004); Park and Yup, *Biotechnol. Bioeng.* 86:681-

686. (2004)), y *paaG* (Ismail et al., *Eur. J. Biochem.* 270:3047-3054 (2003); Park and Lee, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113-116:335-346 (2004); Park and Yup, *Biotechnol. Bioeng.* 86:681-686 (2004)).

Gen	ID GenBank	Número GI	Organismo
crt	NP_349318.1	15895969	*Clostridium acetobutylicum*
crt1	YP_001393856	153953091	*Clostridium kluyveri DSM 555*
paaA	NP_745427.1	26990002	*Pseudomonas fluorescens*
paaB	NP_745426.1	26990001	*Pseudomonas fluorescens*
phaA	ABF82233.1	106636093	*Pseudomonas putida*
phaB	ABF82234.1	106636094	*Pseudomonas putida*
maoC	NP_415905.1	16129348	*Escherichia coli*
paaF	NP_415911.1	16129354	*Escherichia coli*
paaG	NP_415912.1	16129355	*Escherichia coli*

[0357] Este ejemplo describe una vía biosintética para la producción de ácido 3-hidroxiisobutírico o ácido metacrílico a partir de 4-hidroxibutiril-CoA.

EJEMPLO VIII

Vía para la Conversión de Alfa-ketoglutarato en MAA mediante Treo-3-metilaspartato

[0358] Este ejemplo describe una vía de síntesis ejemplar de MAA a partir de alfa-ketoglutarato a treo-3-metilaspartato.

[0359] Otra vía ejemplar para la biosíntesis de MAA procede a través de alfa-ketoglutarato, un metabolito en *E. coli* producido en el ciclo de los TCA (véase Figura 6).

[0360] El primer paso de la vía, catalizado por la enzima aspartato aminotransferasa, transfiere un grupo amino de aspartato a alfa-ketoglutarato, formando glutamato y oxaloacetato. Los dos pasos subsiguientes incluyen el re-arreglo del esqueleto de carbono y la posterior desaminación para formar mesaconato. Enzimas que catalizan estas conversiones se encuentran en la fermentación generadora de energía del glutamato en el suelo, *Clostridia* y otros organismos capaces de fermentar aminoácidos (Buckel and Barker, *J. Bacteriol.* 117:1248-1260 (1974)). La direccionalidad de la vía en estos organismos está de acuerdo con la dirección requerida para la síntesis de MAA en la biovía. El paso de vía final implica la descarboxilación de mesaconato para producir ácido metacrílico.

[0361] Con referencia a Figura 6, el paso 1 involucra aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1). El primer paso de la vía transfiere un grupo amino de aspartato a alfa-ketoglutarato, formando glutamato y oxaloacetato. Los genes *aspC* de *Escherichia coli* (Yagi et al., *FEBS Lett.* 100:81-84 (1979); Yagi et al., *Methods Enzymol.* 113:83-89 (1985)), *AAT2* de *Saccharomyces cerevisiae* (Yagi et al., *J. Biochem.* 92:35-43 (1982)) y *ASP5* de *Arabidopsis thaliana* (de la Torre et al., *Plant J.* 46:414-425 (2006); Kwok and Hanson, *J. Exp. Bot.* 55:595-604 (2004); Wilkie and Warren, *Protein Expr. Purif.* 12:381-389 (1998)), codifican la enzima que cataliza esta conversión, aspartato aminotransferasa.

Gen	ID GenBank	Número GI	Organismo
aspC	NP_415448.1	16128895	*Escherichia coli*
AAT2	P23542.3	1703040	*Saccharomyces cerevisiae*
ASP5	P46248.2	20532373	*Arabidopsis thaliana*

[0362] Con referencia a Figura 6, el paso 2 involucra glutamato mutasa (EC 5.4.99.1). En el paso 2, la cadena de carbono lineal de glutamato se re-arregla a la estructura ramificada de treo-3-metilaspartato. Esta transformación se cataliza por glutamato mutasa, una enzima dependiente de cobalamina, compuesta por dos subunidades. Dos glutamato mutasas, de *Clostridium cochlearium* y *Clostridium tetanomorphum*, se han clonado y expresado funcionalmente en *E. coli* (Holloway and Marsh, *J. Biol. Chem.* 269:20425-20430 (1994); Reitzer et al., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54:1039-1042 (1998)). Los genes que codifican esta proteína de dos subunidades son *glmE* y *glmS* de *Clostridium cochlearium*, *mamA* y *glmE* de *Clostridium tetanomorphum*, y *mutE* y *mut*S de *Clostridium tetani* (Switzer, *Glutamate mutase*, pp. 289-305 Wiley, New York (1982)).

Gen	ID GenBank	Número GI	Organismo
glmE	P80077.2	2507035	*Clostridium cochlearium*
glmS	P80078.2	17865765	*Clostridium cochlearium*
mamA	Q05488.1	729588	*Clostridium tetanomorphum*
glmE	Q05509.1	729586	*Clostridium tetanomorphum*
mutE	NP_783086.1	28212142	*Clostridium tetani E88*
mutS	NP_783088.1	28212144	*Clostridium tetani E88*

[0363] Con referencia a Figura 6, el paso 3 involucra 3-metilaspartasa (EC 4.3.1.2). La 3-metilaspartasa, también designada como beta-metilaspartasa o 3-

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

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

[0364] Con referencia a Figura 6, el paso 4 involucra mesaconato descarboxilasa (EC 4.1.1.-). El paso final de la vía implica la descarboxilación de mesaconato a ácido metacrílico. Una enzima que cataliza esta reacción exacta no se ha demostrado experimentalmente. No obstante, existen varias enzimas que catalizan reacciones altamente similares. Una enzima con una función estrechamente relacionada es aconitato descarboxilasa. Esta enzima cataliza el paso final en la biosíntesis de itaconato en una cepa de *Candida* y los hongos filamentosos *Aspergillus terreus* (Bonnarme et al., *J. Bacteriol.* 177:3573-3578 (1995); Willke and Vorlop, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:289-295 (2001)). Aunque el itaconato es un compuesto de interés biotecnológico, hasta ahora no se han hecho esfuerzos para identificar o clonar el gen de la aconitato descarboxilasa.

[0365] Una segunda enzima con funciones similares es 4-oxalocronato descarboxilasa. Esta enzima es común en una variedad de organismos, y los genes que codifican la enzima de *Pseudomonas sp. (cepa 600)* se han clonado y expresado en *E. coli* (Shingler et al., *J. Bacteriol.* 174:711-724 (1992)). El grupo

metilo en mesaconato puede causar impedimento estérico, pero este problema podría superarse posiblemente con evolución dirigida o generación mediante ingeniería genética de proteínas. La 4-oxalocronato descarboxilasa está compuesta por dos subunidades. Genes que codifican esta enzima incluyen *dmpH* y *dmpE* en *Pseudomonas sp.* (*cepa 600*) (Shingler et al., *J. Bacteriol.* 174:711-724 (1992)), *xylII* y *xylIII* de *Pseudomonas putida* (Kato and Asano, *Arch. Microbiol.* 168:457-463 (1997); Stanley et al., *Biochemistry* 39:718-726 (2000)), y *Reut_B5691* y *Reut_B5692* de *Ralstonia eutropha JMP134* (Hughes et al., *J. Bacteriol.* 158:79-83 (1984)).

Gen	ID GenBank	Número GI	Organismo
dmpH	CAA43228.1	45685	*Pseudomonas sp. CF600*
dmpE	CAA43225.1	45682	*Pseudomonas sp. CF600*
xylII	YP_709328.1	111116444	*Pseudomonas putida*
xylIII	YP_709353.1	111116469	*Pseudomonas putida*
Reut_B5691	YP_299880.1	73539513	*Ralstonia eutropha JMP134*
Reut_B5692	YP_299881.1	73539514	*Ralstonia eutropha JMP134*

[0366] Este ejemplo describe una vía biosintética para la producción de MMA a partir de alfa-ketoglutarato.

EJEMPLO IX

Vía para la Conversión de Alfa-ketoglutarato en MAA mediante 2-Hidroxiglutarato

[0367] Este ejemplo describe una vía ejemplar de síntesis de MAA a partir de alfa-ketoglutarato a MAA mediante 2-hidroxiglutarato.

[0368] Otra vía ejemplar para la biosíntesis de MAA tiene un esquema similar a la vía descrita en Ejemplo VIII, pero pasa a través de los intermediarios hidroxilados 2-hidroxiglutarato y 3-metilmalato (véase Figura 7), en lugar de los intermediarios sustituidos con amina (véase Figura 6).

[0369] Con referencia a Figura 7, el paso 1 involucra alfa-ketoglutarato reductasa (EC 1.1.99.2). El primer paso de esta vía implica la reducción de alfa-ketoglutarato a 2-hidroxiglutarato por la enzima nativa alfa-ketoglutarato reductasa. Esta enzima se codifica por *serA*, una enzima multifuncional que cataliza asimismo la reducción de 3-fosfoglicerato en el metabolismo central (Zhao and Winkler, *J. Bacteriol.* 178:232-239 (1996)). Genes *L2HGDH* en *Homo sapiens* (Jansen and Wanders, *Biochim. Biophys. Acta* 1225:53-56 (1993)), *FN0487* en *L2hgdh* en

Fusobacterium nucleatum (Hayashi et al., *J. Nihon Univ. Sch. Dent.* 28:12-21 (1986)), y *L2hgdh_predicted* en *Rattus norvegicus* (Jansen and Wanders, *Biochim. Biophys. Acta* 1225:53-56 (1993)) codifican esta enzima. Genes candidatos con alta homología de secuencia incluyen *L2hgdh* en *Mus musculus* y *L2HGDH* en *Bos taurus*. En concentraciones elevadas, se ha demostrado que 2-hidroxiglutarato retroalimenta actividad alfa-ketoglutarato reductasa por inhibición competitiva (Zhao and Winkler, *J. Bacteriol.* 178:232-239. (1996)).

Gen	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
serA	CAA01762.1	1247677	*Escherichia coli*
L2HGDH	Q9H9P8.3	317373422	*Homo sapiens*
L2hgdh	NP_663418.1	21703884	*Mus musculus*
L2hgdh_predicted	NP_001101498.1	157820173	*Rattus norvegicus*
L2HGDH	NP_001094560.1	155371911	*Bos taurus*
FN0487	Q8RG31	81763568	*Fusobacterium nucleatum subsp. Nucleatum*

[0370] Con referencia a Figura 7, el paso 2 involucra 2-hidroxiglutamato mutasa (EC 5.4.99.-). En el segundo paso de la vía, el esqueleto de carbono experimenta re-arreglo por una enzima glutamato mutasa. La reacción más común, catalizada por tal enzima, es la conversión de glutamato en treo-3-metilasparato, mostrada en el paso 2 de Figura 6. Igualmente se ha demostrado que la glutamato mutasa, dependiente de adenosilcobalamina, de *Clostridium cochlearium* reacciona con 2-hidroxiglutarato como sustrato alterno (Roymoulik et al., *Biochemistry* 39:10340-10346 (2000)), aunque la tasa de esta reacción es dos órdenes de magnitud menor con 2-hidroxiglutarato, comparada con la tasa con el sustrato nativo glutamato. La evolución dirigida de la enzima puede utilizarse para incrementar la afinidad de la glutamato mutasa para 2-hidroxiglutarato. Los números de accesión a GenBank de secuencias proteicas, que codifican glutamato mutasas, se encuentran en Ejemplo VIII, paso 2 de la vía.

[0371] Con referencia a Figura 7, el paso 3 involucra 3-metilmalato deshidratasa (EC 4.2.1.-). En el tercer paso, se deshidrata 3-metilmalato para formar mesaconato. Aunque una enzima que cataliza esta transformación exacta no se ha descrito en la literatura, varias enzimas son capaces de catalizar una reacción similar. Una enzima tal es 2-metilmalato deshidratasa, también llamada citramalato hidroliasa, la cual convierte 2-metilmalato en mesaconato. La 2-

metilmalato y la 3-metilmalato están estrechamente relacionadas, con la única diferencia en estructura siendo la localización del grupo hidroxilo. La actividad 2-metilmalato deshidratasa se detectó en *Clostridium tetanomorphum*, *Morganella morganii*, *Citrobacter amalonaticus* en el contexto de la vía IV de degradación de glutamato (Kato and Asano, *Arch. Microbiol.* 168:457-463 (1997)); sin embargo, los genes que codifican esta enzima no se han secuenciado hasta la fecha.

[0372] Una segunda enzima candidata es fumarato hidratasa, la cual cataliza la deshidratación de malato a fumarato. Como se describe en Ejemplo V (Paso 5), se encuentra disponible un gran número de información estructural para esta enzima, y otros estudios han generado exitosamente la enzima mediante ingeniería genética para alterar la actividad, inhibición y localización (Weaver, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 61:1395-1401 (2005)). Genes candidatos se discuten en Ejemplo V, paso 5 de la vía.

[0373] Con referencia a Figura 7, el paso 4 involucra mesaconato descarboxilasa (EC 4.1.1.-). El paso final de la vía involucra la descarboxilación de mesaconato a ácido metacrílico. Esta reacción es idéntica a al paso final de la vía descrita en Ejemplo VIII.

[0374] Este ejemplo describe una vía biosintética para la producción de MMA a partir de alfa-ketoglutarato.

EJEMPLO X

Vía para la Conversión de Acetil-CoA en Ácido 2-Hidroxiisobutírico o MAA

[0375] Este ejemplo describe una vía ejemplar de síntesis de ácido 2-hidroxiisobutírico o MAA a partir de acetil-CoA.

[0376] La biosíntesis de MAA puede proceder a partir de acetil-CoA en un mínimo de cinco pasos enzimáticos (véase Figura 8). En esta vía, dos moléculas de acetil-CoA se combinan para formar acetoacetil-coA, la cual se reduce luego a 3-hidroxibutiril-CoA. Alternativamente, 4-hidroxibutiril-CoA puede convertirse en 3-hidroxibutiril-CoA por medio de 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa y crotonasa (Martins et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(44) 15645-15649 (2004); Jones and Woods, *Microbiol. Rev.* 50:484-524 (1986); Berg et al., *Science* 318(5857) 1782-1786 (2007)). Una metilmutasa re-arregla entonces el esqueleto de carbono de 3-hidroxibutiril-CoA a 2-hidroxiisobutiril-CoA, la cual se deshidrata luego para formar metacrilil-CoA. Alternativamente, 2-hidroxiisobutiril-CoA puede convertirse en 2-hidroxiisobutirato, secretarse, y recuperarse como producto. El paso final, que

convierte metacrilil-CoA en MAA, puede realizarse por una sola enzima (mostrada en Figura 8) o una serie de enzimas.

[0377] Con referencia a Figura 8, el paso 1 involucra acetoacetil-CoA tiolasa (EC 2.3.1.9). La formación de acetoacetil-CoA a partir de dos unidades de acetil-CoA se cataliza por acetil-CoA tiolasa. Esta enzima es nativa a *E. coli*, codificada por el gen *atoB*, y opera normalmente en la dirección de degradación de acetoacetato durante la oxidación de ácidos grasos (Duncombe and Frerman, *Arch. Biochem. Biophys.* 176:159-170 (1976); Frerman and Duncombe, *Biochim. Biophys. Acta* 580:289-297 (1979)). El gen *thlA* de *Clostridium acetobutylicum* se generó mediante ingeniería genética en una cepa, productora de isopropanol, de *E. coli* (Hanai et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7814-7818 (2007); Stim-Herndon et al., *Gene* 154:81-85 (1995)). Genes candidatos adicionales incluyen *thl* de *Clostridium pasteurianum* (Meng and Li. Cloning, *Biotechnol. Lett.* 28:1227-1232 (2006)) y *ERG10* de *S. cerevisiae* (Hiser et al, *J Biol Chem* 269:31383-89 (1994)).

Proteína	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
atoB	NP_416728	16130161	*Escherichia coli*
thlA	NP_349476.1	15896127	*Clostridium acetobutylicum*
thlB	NP_149242.1	15004782	*Clostridium acetobutylicum*
thl	ABA18857.1	75315385	*Clostridium pasteurianum*
ERG10	NP_015297	6325229	*Saccharomyces cerevisiae*

[0378] Con referencia a Figura 8, el paso 2 involucra acetoacetil-CoA reductasa (EC#: 1.1.1.35). El segundo paso implica la reducción de acetoacetil-CoA a 3-hidroxibutiril-CoA por acetoacetil-CoA reductasa. Esta enzima participa en la vía de fermentación de acetil-CoA a butirato en varias especies de *Clostridia* y se ha estudiado en detalle (Jones and Woods, *Microbiol. Rev.* 50:484-524 (1986)). La enzima de *Clostridium acetobutylicum*, codificada por *hbd*, se ha clonado y expresado funcionalmente en *E. coli* (Youngleson et al., *J. Bacteriol.* 171:6800-6807 (1989)). Adicionalmente, subunidades de dos complejos de oxidación de ácidos grasos en *E. coli*, codificadas por *fadB* y *fadJ*, funcionan como 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasas (Binstock and Schulz, *Methods Enzymol.* 71 Pt C: 403-411 (1981)). Todavía otros genes, que se demostró que reducen acetoacetil-CoA a 3-hidroxibutiril-CoA, son *phbB* de *Zoogloea ramigera* (Ploux et al., *Eur.J Biochem.* 174:177-182 (1988)) y *phaB* de *Rhodobacter sphaeroides* (Alber et al., *Mol.Microbiol* 61:297-309 (2006)). El primer gen es dependiente de NADPH, su

secuencia nucleotídica se ha determinado (Peoples et al., *Mol.Microbiol* 3:349-357 (1989)), y el gen se ha expresado en *E. coli*. Estudios de especificidad de sustrato en el gen llevaron a la conclusión de que podría aceptar 3-oxopropionil-CoA como sustrato además de acetoacetil-CoA (Ploux et al., *Eur.J Biochem.* 174:177-182 (1988)). Genes candidatos adicionales incluyen *Hbd1* (dominio C-terminal) y *Hbd2* (dominio N-terminal) en *Clostridium kluyveri* (Hillmer and Gottschalk, *Biochim. Biophys. Acta* 3334:12-23 (1974)) y *HSD17B10* en *Bos taurus* (Wakil et al., J. Biol. Chem. 207:631-638 (1954)). La enzima de *Paracoccus denitrificans* se ha expresado funcionalmente y caracterizado en *E. coli* (Yabutani et al., *FEMS Microbiol Lett.* 133:85-90 (1995)). Un número de enzimas similares se han encontrado en otras especies de *Clostridia* y en *Metallosphaera sedula* (Berg et al., *Science.* 318:1782-1786 (2007)). La enzima de *Candida tropicalis* es un componente de la enzima multifuncional de la oxidación beta peroxisómica de ácidos grasos tipo 2 (MFE-2). El dominio de la deshidrogenasa B de esta proteína es catalíticamente activo en acetoacetil-CoA. El dominio se ha expresado funcionalmente en *E. coli*, se dispone de una estructura cristalina, y el mecanismo catalítico es bien entendido (Ylianttila et al., *Biochem Biophys Res Commun* 324:25-30 (2004); Ylianttila et al., *J Mol Biol* 358:1286-1295 (2006)).

Proteína	**ID GENBANK**	**NÚMERO GI**	**ORGANISMO**
fadB	P21177.2	119811	*Escherichia coli*
fadJ	P77399.1	3334437	*Escherichia coli*
Hbd2	EDK34807.1	146348271	*Clostridium kluyveri*
Hbd1	EDK32512.1	146345976	*Clostridium kluyveri*
HSD17B10	O02691.3	3183024	*Bos taurus*
phbB	P23238.1	130017	*Zoogloea ramigera*
phaB	YP_353825.1	77464321	*Rhodobacter sphaeroides*
phaB	BAA08358	675524	*Paracoccus denitrificans*
Hbd	NP_349314.1	15895965	*Clostridium acetobutylicum*
Hbd	AAM14586.1	20162442	*Clostridium beijerinckii*
Msed_1423	YP_001191505	146304189	*Metallosphaera sedula*
Msed_0399	YP_001190500	146303184	*Metallosphaera sedula*
Msed_0389	YP_001190490	146303174	*Metallosphaera sedula*
Msed_1993	YP_001192057	146304741	*Metallosphaera sedula*
Fox2	Q02207	399508	*Candida tropicalis*

[0379] Con referencia a Figura 8, el paso 3 involucra 3-hidroxibutiril-CoA mutasa (EC 5.4.99.-). En el siguiente paso, 3-hidroxibutiril-CoA se re-arregla para formar 2-hidroxiisobutiril-CoA (2-HIBCoA) por 3-hidroxibutiril-CoA mutasa. Esta enzima es una metilmutasa novedosa tipo ICM, descubierta recientemente y caracterizada en *Methylibium petroleiphilum* (Ratnatilleke et al., J. Biol. Chem. 274:31679-31685 (1999); Rohwerder et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4128-4135 (2006)). Esta enzima, codificada por *Mpe_B0541* en *Methylibium petroleiphilum PM1*, tiene una elevada homología de secuencia con la subunidad grande de metilmalonil-CoA mutasa en otros organismos incluyendo *Rsph17029_3657* en *Rhodobacter sphaeroides* y *Xaut_5021* en *Xanthobacter autotrophicus*. Como se discute en Ejemplo VII (Paso 1), cambios a un solo aminoácido cerca del sitio activo alteran la especificidad del sustrato de la enzima (Ratnatilleke et al., *supra*, 1999; Rohwerder et al., *supra*, 2006), de manera que la generación mediante ingeniería genética dirigida de enzimas similares en este sitio, tales como metilmalonil-CoA mutasa o isobutriril-CoA mutasa, descritas previamente, pueden usarse para obtener la reactividad deseada.

Gen	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
Mpe_B0541	YP_001023546.1	124263076	*Methylibium petroleiphilum PM1*
Rsph17029_3657	YP_001045519.1	126464406	*Rhodobacter sphaeroides*
Xaut_5021	YP_001409455.1	154243882	*Xanthobacter autotrophicus Py2*

[0380] Con referencia a Figura 8, el paso 4 involucra 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa. La deshidratación de 2-hidroxiacil-CoA tal como 2-hidroxiisobutiril-CoA puede catalizarse por una clase especial de enzimas sensibles a oxígeno, las cuales dehidratan derivados de 2-hidroxiacil-CoA por medio de un mecanismo radical (Buckel and Golding, *Annu. Rev. Microbiol.* 60:27-49 (2006); Buckel et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8:462-467 (2004); Buckel et al., *Biol. Chem.* 386:951-959 (2005); Kim et al., *FEBS J.* 272:550-561 (2005); Kim et al., *FEMS Microbiol. Rev.* 28:455-468 (2004); Zhang et al., *Microbiology* 145 (Pt 9):2323-2334 (1999)). Un ejemplo de tal enzima es la lactil-CoA deshidratasa de *Clostridium propionicum*, la cual cataliza la deshidratación de lactoil-CoA para formar acril-CoA (Kuchta and Abeles, *J. Biol. Chem.* 260:13181-13189 (1985); Hofmeister and Buckel, *Eur. J.*

Biochem. 206:547-552 (1992)). Un ejemplo adicional es 2-hidroxiglutaril-CoA deshidratasa codificada por *hgdABC* de *Acidaminococcus fermentans* (Muëller and Buckel, *Eur. J. Biochem.* 230:698-704 (1995); Schweiger et al., *Eur. J. Biochem.* 169:441-448 (1987)). Todavía otro ejemplo es la 2-hidroxiisocaproil-CoA deshidratasa de *Clostridium difficile* catalizada por *hadBC* y activada por *hadI* (Darley et al., *FEBS J.* 272:550–61 (2005)). Las correspondientes secuencias para *A. fermentans* y *C. difficile* pueden encontrarse enumeradas a continuación. La secuencia del lactoil-CoA deshidratasa completa de *C. propionicium* no se encuentra aún listada en las bases de datos a disposición del público. No obstante, la secuencia de la subunidad beta corresponde al número de accesión a GenBank AJ276553 (Selmer et al, *Eur J Biochem*, 269:372-80 (2002)).

Gen	**No. de Accesión a GenBank**	**GI No.**	**Organismo**
hgdA	P11569	296439332	*Acidaminococcus fermentans*
hgdB	P11570	296439333	*Acidaminococcus fermentans*
hgdC	P11568	2506909	*Acidaminococcus fermentans*
hadB	YP_001086863	126697966	*Clostridium difficile*
hadC	YP_001086864	126697967	*Clostridium difficile*
hadI	YP_001086862	126697965	*Clostridium difficile*
lcdB	AJ276553	7242547	*Clostridium propionicum*

[0381] Con referencia a Figura 8, los pasos 5 o 6 involucran una transferasa (EC 2.8.3.-), hidrolasa (EC 3.1.2.-), o sintetasa (EC 6.2.1.-) con actividad en un ácido metacrílico o ácido 2-hidroxiisobutírico, respectivamente. La conversión directa de metacrilil-CoA en MAA o 2-hidroxiisobutiril-CoA en 2-hidroxiisobutirato puede llevarse a cabo por una CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa. Como se discute en Ejemplo VII, la energética de la vía es muy favorable si se emplea una CoA transferasa o una CoA sintetasa para realizar esta transformación. En la familia de las transferasas, la enzima acil-CoA:acetato-CoA transferasa, también conocida como acetato-CoA transferasa, es una candidata apropiada para catalizar la actividad 2-hidroxiisobutiril-CoA o metacril-CoA transferasa deseada, debido a su amplia especificidad de sustrato, que incluye sustratos acil-CoA ramificados (Matthies and Schink, *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1435-1439 (1992); Vanderwinkel et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33:902-908 (1968)). Acetil-CoA sintetasa (ACD), formadora de ADP, es una enzima prometedora en la familia

de las CoA sintetasas que opera en compuestos de cadena ramificada estructuralmente similares (Brasen and Schonheit, *Arch. Microbiol.* 182:277-287 (2004); Musfeldt and Schonheit, *J. Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). En la familia de las CoA-hidrolasas, se ha demostrado que la enzima 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa opera en una variedad de sustratos acil-CoA de cadena ramificada, incluyendo 3-hidroxiisobutiril-CoA, metilmalonil-CoA, y 3-hidroxi-2-metilbutanoil-CoA (Hawes et al., *Methods Enzymol.* 324:218-228 (2000); Hawes et al., *J. Biol. Chem.* 271:26430-26434 (1996); Shimomura et al., *J. Biol. Chem.* 269:14248-14253 (1994)). Genes candidatos ejemplares adicionales para CoA transferasas, sintetasas, e hidrolasas se discuten en Ejemplo VII (paso 2 y 5).

[0382] Con referencia a Figura 8, un paso alternativo 5 involucra la conversión indirecta en MAA. Como una alternativa a la conversión directa de MAA-CoA en MAA, una estrategia alterna para convertir metacrilil-CoA en MAA implica un proceso de múltiples pasos en el cual MAA-CoA se convierte en MAA mediante 3-hidroxiisobutirato. Por este proceso, MAA-CoA se convierte primero en 3-hidroxiisobutiril-CoA, la cual puede convertirse posteriormente en MAA, como se describe en Ejemplo VII.

[0383] El primer paso de esta vía indirecta implica la conversión de MAA-CoA en 3-hidroxiisobutiril-CoA (3HIB-CoA) por enoil-CoA hidratasa (EC 4.2.1.17 y 4.2.1.74). En *E. coli*, los productos de los genes *fadA* y *fadB* codifican un complejo multi-enzima involucrado en la oxidación de ácidos grasos, que exhibe actividad enoil-CoA hidratasa (Nakahigashi and Inokuchi, *Nucleic Acids Research* 18:4937 (1990); Yang, *J. Bacteriol.* 173:7405-7406 (1991); Yang et al., *J. Biol. Chem.* 265:10424-10429 (1990); Yang et al., *Biochemistry* 30:6788-6795 (1991)). Desactivar (*knocking out*) un regulador negativo codificado por *fadR* puede utilizarse para activar el producto del gen *fadB* (Sato et al., *J. Biosci. Bioengineer.* 103:38-44 (2007)). Los genes *fadI* y *fadJ* codifican funciones similares y se expresan naturalmente bajo condiciones anaerobias (Campbell et al., *Mol. Microbiol.* 47:793-805 (2003)).

Gen	**No. de Accesión a GenBank**	**GI No.**	**Organismo**
fadA	YP_026272.1	49176430	*Escherichia coli*
fadB	NP_418288.1	16131692	*Escherichia coli*
fadI	NP_416844.1	16130275	*Escherichia coli*
fadJ	NP_416843.1	16130274	*Escherichia coli*
fadR	NP_415705.1	16129150	*Escherichia coli*

[0384] Genes candidatos nativos adicionales que codifican una enoil-CoA hidratasa incluyen *maoC* (Park and Lee, *J. Bacteriol.* 185:5391-5397 (2003)), *paaF* (Ismail et al., *Eur. J. Biochem.* 270:3047-3054 (2003); Park and Lee, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113-116:335-346 (2004); Park and Yup, *Biotechnol. Bioeng.* 86:681-686. (2004)), y *paaG* (Ismail et al., *Eur. J. Biochem.* 270:3047-3054 (2003); Park and Lee, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113-116:335-346 (2004); Park and Yup, *Biotechnol. Bioeng.* 86:681-686 (2004)). Otros candidatos incluyen *paaA*, *paaB*, y *paaN* de *P. putida* (Olivera et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6419-6424 (1998)) y *P. fluorescens* (Di Gennaro et al., *Arch. Microbiol.* 188:117-125 (2007)). El producto del gen *crt* de *C. acetobutylicum* es otro candidato (Atsumi et al., *Metab. Eng.* epub Sep 14, 2007; Boynton et al., *J. Bacteriol.* 178:3015-3024 (1996)). La enoil-CoA hidratasa de *Pseudomonas putida*, codificada por *ech*, cataliza la conversión de 3-hidroxibutiril-CoA en Crotonil-CoA (Roberts et al., *Arch.Microbiol* 117:99-108 (1978)). Esta transformación se cataliza igualmente por el producto del gen *crt* de *Clostridium acetobutylicum*, el producto del gen *crt1* de *C. kluyveri*, y otros organismos clostridiales (Atsumi et al., *Metab Eng* 10:305-311 (2008); Boynton et al., *J Bacteriol.* 178:3015-3024 (1996); Hillmer et al., *FEBS Lett.* 21:351-354 (1972)). Enoil-CoA hidratasas candidatas adicionales son phaA y phaB, de *P. putida*, y paaA y paaB de *P. fluorescens* (Olivera et al., *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 95:6419-6424 (1998)).

Gen	**No. de Accesión a GenBank**	**GI No.**	**Organismo**
maoC	NP_415905.1	16129348	*Escherichia coli*
paaF	NP_415911.1	16129354	*Escherichia coli*
paaG	NP_415912.1	16129355	*Escherichia coli*
paaN (*phaL*)	NP_745413.1	26989988	*Pseudomonas putida*
paaN	ABF82246.1	106636106	*Pseudomonas fluorescens*
ech	NP_745498.1	26990073	*Pseudomonas putida*
crt	NP_349318.1	15895969	*Clostridium acetobutylicum*
crt1	YP_001393856	153953091	*Clostridium kluyveri*
phaA	NP_745427.1	26990002	*Pseudomonas putida*
phaB	NP_745426.1	26990001	*Pseudomonas putida*
paaA	ABF82233.1	106636093	*Pseudomonas fluorescens*
paaB	ABF82234.1	106636094	*Pseudomonas fluorescens*

[0385] Este ejemplo describe una vía biosintética para la producción de 2-hidroxiisobutirato o MAA a partir de acetil-CoA.

EJEMPLO XI

Vía para la Conversión de Acetil-CoA en MAA mediante Crotonoil-CoA

[0386] Este ejemplo describe una vía sintética ejemplar de MAA a partir de acetil-CoA mediante crotonoil-CoA.

[0387] Se describe otra vía para convertir acetil-CoA en MAA en un mínimo de siete pasos enzimáticos (véase Figura 9). Los rendimientos de esta vía bajo condiciones aerobias y anaerobias son similares a la vía descrita en Ejemplo X.

[0388] Los dos primeros pasos de la vía son idénticos a los pasos 1 y 2 en la vía descrita en Ejemplo X. En el tercer paso, se deshidrata 3-HBCoA para formar crotonil-CoA por una crotonasa (EC#: 4.2.1.55). El doble enlace en crotonil-CoA se reduce por butiril-CoA deshidrogenasa (EC#: 1.3.99.2). Las dos de estas enzimas, justamente como la acetoacetil-CoA reductasa, son una parte de la vía de fermentación de acetil-CoA a butirato en la especie *Clostridia* (Jones and Woods, *Microbiol. Rev.* 50:484-524 (1986)). En el paso subsiguiente, butiril-CoA se convierte en isobutiril-CoA por isobutiril-CoA mutasa (5.4.99.12), una enzima que puede convertir reversiblemente butiril-CoA en isobutiril-CoA. Esta enzima se ha clonado y secuenciado de *Streptomyces cinnamonensis*, y la enzima recombinante se ha caracterizado en *E. coli* (Ratnatilleke et al., *J. Biol. Chem.* 274:31679-31685 (1999)). El siguiente paso en la vía implica la conversión de isobutiril-CoA en metacrilil-CoA por medio de 2-metil-acil-CoA deshidrogenasa (EC #: 1.3.99.12). Esta transformación hacia metacrilil-CoA se ha observado en la especie *Streptomyces*, y la enzima asociada se ha aislado y expresado en *E. coli* (Youngleson et al., *J. Bacteriol.* 171:6800-6807 (1989)). En el paso final, metacrilil-CoA se convierte en MAA por una sola enzima o una serie de enzimas, como se describe en Ejemplo X (Paso 5).

[0389] Este ejemplo describe una vía biosintética para la producción de MAA a partir de acetil-CoA.

EJEMPLO XII

Vía para la Conversión de Acrilil-CoA en MAA

[0390] Este ejemplo describe una vía ejemplar de síntesis de MAA a partir de acrilil-CoA.

[0391] Altos rendimientos de MAA pueden obtenerse a través de la vía de acrilil-CoA (véase Figura 10). Esta vía requiere la activación de lactato a lactoil-CoA, seguida por cinco, u opcionalmente seis, pasos más para la conversión de

esta molécula de CoA activada en MAA. El rendimiento de MAA a partir de glucosa usando esta vía es 1,28 mol/mol de glucosa y se requiere captación de oxígeno para alcanzar estos rendimientos. En ausencia de oxígeno, el rendimiento esperado disminuye de 1,28 mol a 1,09 mol/mol de glucosa consumida. Ambas vías aerobia y anaerobia son limitadas en energía con un rendimiento máximo de MAA y no generan ningún ATP.

[0392] La biosíntesis de MAA a través de la vía de acrilil-CoA requiere primero la conversión de piruvato en lactato mediante lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.28), una enzima nativa a *E. coli* y muchos otros organismos. Los tres pasos subsiguientes, que convierten lactato en propionil-CoA, se catalizan por enzimas en las vías de fermentación de piruvato en varias bacterias no relacionadas tales como *Clostridium propionicum* y *Megasphaera elsdenii* (MetaCyc). Lactato-CoA transferasa (EC 2.8.3.1), también conocida como propionato-CoA transferasa, convierte lactato en lactoil-CoA y puede usar propionato y lactato como sustratos. Esta enzima se ha purificado y caracterizado (Schweiger et al., *Eur. J. Biochem.* 169:441-448 (1987)). Lactoil-CoA se deshidrata en acrilil-CoA usando lactoil-CoA deshidratasa (EC 4.2.1.54), una enzima que ha sido objeto de numerosos estudios (Hofmeister and Buckel, *Eur. J. Biochem.* 206:547-552. (1992); Kuchta and Abeles, *J. Biol. Chem.* 260:13181-13189 (1985)). Posteriormente, acrilil-CoA se reduce a propionil-CoA usando la acriloil-CoA reductasa (EC 1.3.2.2, anteriormente 1.3.99.3) (Hetzel et al., *Eur.J Biochem.* 270:902-910 (2003); Kuchta and Abeles, *supra*, 1985).

[0393] Con referencia a Figura 10, en el paso 5, propionil-CoA se convierte en S-metilmalonil-CoA por propionil-CoA carboxilasa (6.4.1.3). Propionil-CoA carboxilasa se ha purificado de hígado de rata (Browner et al., *J. Biol. Chem.* 264:12680-12685 (1989); Kraus et al., *J. Biol. Chem.* 258:7245-7248 (1983)) y se ha aislado y caracterizado asimismo de hígado humano (Kalousek et al., *J. Biol. Chem.* 255:60-65 (1980)). La carboxilación de propionil-CoA en succinil-CoA mediante esta enzima se ha identificado como uno de los mecanismos del metabolismo del propionato en *E. coli* (Evans et al., *Biochem. J.* 291 (Pt 3):927-932 (1993)), pero se conoce muy poco sobre la genética de la vía.

[0394] Los pasos finales de la vía implican la conversión de metilmalonil-CoA en MAA (reacción agrupada en Figura 10). Enzimas que catalizan estas reacciones se describen en Ejemplo V.

[0395] Este ejemplo describe una vía biosintética para la producción de MAA a partir de piruvato.

EJEMPLO XIII

Vía para la Conversión de 2-Ketoisovalerato en MAA

[0396] Este ejemplo describe una vía sintética ejemplar de MAA a partir de 2-ketoisovalerato.

[0397] La vía (véase Figura 11) aprovecha múltiples pasos de la vía de la degradación de valina descrita en varios organismos, incluyendo *Bacillus subtilis*, *Arabidopsis thaliana*, y varias especies de *Pseuodomonas*, pero no conocida por estar presente en *E. coli* o en *S. cerevisiae*. En el primer paso de la vía de la degradación de la valina, valina se convierte en 2-ketoisovalerato por aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada (EC 2.6.1.24), una enzima también nativa a *E. coli* (Matthies and Schink, *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1435-1439 (1992); Rudman and Meister, *J. Biol. Chem.* 200:591-604 (1953)). La subsiguiente conversión de 2-ketoisovalerato en isobutiril-CoA, catalizada por un complejo deshidrogenasa ceto-ácido de cadena ramificada (EC 1.2.1.25), es el paso decisivo (*committing step*) para la biosíntesis de MAA mediante esta vía. Seguidamente, isobutiril-CoA se convierte en metacrilil-CoA mediante isobutiril-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.99.12). Detalles para este paso se describen en Ejemplo XI. El paso final, la conversión de MAA-CoA en MAA, se describe en Ejemplo V.

[0398] Este ejemplo describe una vía biosintética para la producción de MMA a partir de 2-ketoisovalerato.

EJEMPLO XIV

Vía para la Conversión de 4-Hidroxibutiril-CoA en 2-Hidroxiisobutirato o MAA mediante 2-Hidroxiisobutiril-CoA

[0399] Este ejemplo describe una vía ejemplar de síntesis de 2-hidroxiisobutirato o MAA que procede a partir de 4-hidroxibutiril-CoA pasando por 2-hidroxiisobutiril-CoA.

[0400] La vía implica primero la deshidratación de 4-hidroxibutiril-CoA a vinilacetil-CoA, la cual se isomeriza posteriormente a crotonoil-CoA. Crotonil-CoA se hidrata para formar 3-hidroxibutiril-CoA, la que se re-arregla en 2-hidroxiisobutiril-CoA. El paso final de la vía de 2-hidroxiisobutirato involucra eliminar el grupo funcional CoA de 2-hidroxiisobutiril-CoA. Los pasos finales en la síntesis de MAA implican la deshidratación de 2-hidroxiisobutiril-CoA, seguida por la eliminación del grupo funcional CoA de metacrilil-CoA. Genes candidatos para los primeros tres pasos de la vía, los pasos 7, 8, y 9 de Figura 8, se describen a

continuación. Genes candidatos para los pasos 3, 4, 5, y 6 de Figura 8 se discuten en Ejemplo X.

[0401] Con referencia a Figura 8, los pasos 7 y 8 se llevan a cabo por enzimas 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasas. Las enzimas de *Clostridium aminobutyrium* y *C. kluyveri* catalizan la conversión reversible de 4-hidroxibutiril-CoA en crotonil-CoA y poseen igualmente una actividad vinilacetil-CoA Δ-isomerasa intrínseca (Scherf and Buckel, *Eur. J. Biochem.* 215:421-429 (1993); Scherf et al., *Arch. Microbiol.* 161:239-245 (1994)). Las dos enzimas nativas se han purificado y caracterizado, incluyendo las secuencias de aminoácidos N-terminales (Scherf and Buckel, *supra*, 1993; Scherf et al., *supra,* 1994). Los genes *abfD* de *C. aminobutyrium* y *C. kluyveri* coinciden exactamente con estas secuencias de aminoácidos N-terminales, codificando en consecuencia las 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasas/vinilacetil-CoA Δ-isomerasa. Además, *abfD* de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 es otra 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa ejemplar que puede identificarse por homología. El producto del gen *abfD* de *Porphyromonas gingivalis* y el producto del gen Msed_1220 de *Metallosphaera sedula* están estrechamente relacionados por homología de secuencia con los productos de los genes clostridiales.

Gen	**No. de Accesión a GenBank**	**GI No.**	**Organismo**
abfD	YP_001396399.1	153955634	*Clostridium kluyveri DSM 555*
abfD	P55792	84028213	*Clostridium aminobutyricum*
abfD	YP_001928843	188994591	*Porphyromonas gingivalis (ATCC 33277)*
Msed_1220	YP_001191305.1	146303989	*Metallosphaera sedula*

[0402] Paso 9 de Figura 8 se lleva a cabo por una enzima crotonasa. Tales enzimas se requieren para la formación de n-butanol en algunos organismos, particularmente la especie *Clostridial*, y comprenden asimismo un paso del ciclo de 3-hidroxipropionato/4-hidroxibutirato en arqueas termoacidófilas de los géneros *Sulfolobus, Acidianus*, y *Metallosphaera*. Genes ejemplares que codifican enzimas crotonasas pueden encontrarse en *C. acetobutylicum* (Boynton, et al., *J. Bacteriol.* 178(11):3015-3024 (1996)), *C. kluyveri* (Hillmer and Gottschalk, *FEBS Lett.* 21(3):351-354 (1972)), y *Metallosphaera sedula* (Berg et al., *Science* 318(5857):1782-1786 (2007)), aunque se desconoce la secuencia del último gen.

Enoil-CoA hidratasas, las cuales se encuentran involucradas en la oxidación beta de ácidos grasos y/o el metabolismo de varios aminoácidos, pueden catalizar igualmente la hidratación de crotonil-CoA para formar 3-hidroxibutiril-CoA (Agnihotri and Liu, *Bioorg. Med. Chem.* 11(1):9-20 (2003); Roberts et al., *Arch. Microbiol.* 117(1):99-108 (1978); Conrad et al., *J. Bacteriol.* 118(1); 103-11 (1974)). Se cree que las enoil-CoA hidratasas, *phaA* y *phaB* de *P. putida* llevan a cabo la hidroxilación de enlaces dobles durante el catabolismo de fenilacetato (Olivera et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 95(11):6419-6424 (1998)). Los *paaA* y *paaB* de *P. fluorescens* catalizan transformaciones análogas (Olivera et al., *supra*, 1998). Por último, se ha demostrado que un número de genes de *Escherichia coli* presentan funcionalidad enoil-CoA hidratasa, incluyendo *maoC* (Park and Lee, *J. Bacteriol.* 185(18):5391-5397 (2003)), *paaF* (Park and Lee, *Biotechnol. Bioeng.* 86(6):681-686 (2004a)); Park and Lee, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113-116: 335-346 (2004b)); Ismail et al. *Eur. J. Biochem.* 270(14):3047-3054 (2003), y *paaG* (Park and Lee, *supra*, 2004; Park and Lee, *supra*, 2004b; Ismail et al., *supra*, 2003).

Gen	No. de Accesión a GenBank	GI No.	Organismo
crt	NP_349318.1	15895969	*Clostridium acetobutylicum*
crt1	YP_001393856	153953091	*Clostridium kluyveri DSM 555*
phaA	NP_745427.1	26990002	*Pseudomonas putida*
phaB	NP_745426.1	26990001	*Pseudomonas putida*
paaA	ABF82233.1	106636093	*Pseudomonas fluorescens*
paaB	ABF82234.1	106636094	*Pseudomonas fluorescens*
maoC	NP_415905.1	16129348	*Escherichia coli*
paaF	NP_415911.1	16129354	*Escherichia coli*
paaG	NP_415912.1	16129355	*Escherichia coli*

[0403] Este ejemplo describe una vía para la biosíntesis de 2-hidroxiisobutirato o ácido metacrílico a partir de 4-hidroxibutiril-CoA.

EJEMPLO XV

Enzimas Ejemplares Hidrogenasa y CO Deshidrogenasa para Extraer Equivalentes Reductores de Gas de Síntesis y Enzimas Ejemplares del Ciclo de los TCA reductores

[0404] Enzimas del ciclo de los TCA reductores, útiles en los organismos microbianos no existentes por naturaleza de la presente invención incluyen una o

más de ATP-citrato liasa y tres enzimas fijadoras de CO_2: isocitrato deshidrogenasa, alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, piruvato:ferredoxina oxidorreductasa. La presencia de ATP-citrato liasa o citrato liasa y alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa indica la presencia de un ciclo de los TCA reductores activo sen un organismo. Enzimas para cada paso del ciclo de los TCA reductores se muestran a continuación y se describen aquí.

[0405] ATP-citrato liasa (ACL, EC 2.3.3.8), también llamada ATP citrato sintasa, cataliza la escisión, dependiente de ATP, de citrato a oxaloacetato y acetil-CoA. ACL es una enzima del ciclo de los RTCA que se ha estudiado en bacterias sulfurosas verdes *Chlorobium limicola* y *Chlorobium tepidum*. La enzima alfa(4)beta(4) heteromérica de *Chlorobium limicola* se clonó y caracterizó en *E. coli* (Kanao et al., *Eur. J. Biochem.* 269:3409-3416 (2002). La enzima *C. limicola*, codificada por *aclAB*, es irreversible y la actividad de la enzima se regula por la razón de ADP/ATP. Una ACL recombinante de *Chlorobium tepidum* se expresó igualmente en *E. coli* y la holoenzima se reconstituyó *in vitro*, en un estudio que aclaraba el papel de las subunidades alfa y beta en el mecanismo catalítico (Kim and Tabita, *J. Bacteriol.* 188:6544-6552 (2006). Enzimas ACL se han identificado también en *Balnearium lithotrophicum*, *Sulfurihydrogenibium subterraneum* y otros miembros del filo bacteriano *Aquificae* (Hugler et al., *Environ. Microbiol.* 9:81-92 (2007)). De igual manera esta actividad se ha reportado en algunos hongos. Organismos ejemplares incluyen *Sordaria macrospora (Nowrousian et al., Curr. Genet. 37:189-93 (2000), Aspergillus nidulans*, *Yarrowia lipolytica (Hynes and Murray, Eukaryotic Cell, July: 1039-1048, (2010)* y *Aspergillus niger (Meijer et al. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36:1275-1280 (2009)*. Pueden encontrarse otros candidatos basados en homología de secuencia. Información relacionada con estas enzimas se tabula a continuación:

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

[0406] En algunos organismos la conversión de citrato en oxaloacetato y acetil-CoA procede a través del intermediario citril-CoA y se cataliza por dos enzimas separadas, citril-CoA sintetasa (EC 6.2.1.18) y citril-CoA liasa (EC 4.1.3.34) (Aoshima, M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:249-255 (2007). Citril-CoA sintetasa cataliza la activación de citrato a citril-CoA. La enzima *Hydrogenobacter thermophilus* está compuesta por subunidades grandes y pequeñas codificadas por *ccsA* y *ccsB*, respectivamente (Aoshima et al., *Mol. Micrbiol.* 52:751-761 (2004)). La citril-CoA sintetasa de *Aquifex aeolicus* se compone de subunidades alfa y beta codificadas por *sucC1* y *sucD1* (Hugler et al., *Environ. Microbiol.* 9:81-92 (2007)). Citril-CoA liasa divide citril-CoA en oxaloacetato y acetil-CoA. Esta enzima es un homotrímero codificado por *ccl* en *Hydrogenobacter thermophilus* (Aoshima et al., *Mol. Microbiol.* 52:763-770 (2004)) y *aq_150* en *Aquifex aeolicus* (Hugler et al., *supra* (2007)). Los genes para este mecanismo de convertir citrato

en oxaloacetato y citril-CoA se han reportado asimismo recientemente en *Chlorobium tepidum* (Eisen et al., PNAS 99(14): 9509-14 (2002).

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

[0407] Oxaloacetato se convierte en malato por malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37), una enzima que funciona tanto en la dirección hacia adelante como hacia atrás. *S. cerevisiae* posee tres copias de malato deshidrogenasa, *MDH1* (McAlister-Henn and Thompson, *J. Bacteriol.* 169:5157-5166 (1987), *MDH2* (Minard and McAlister-Henn, *Mol. Cell. Biol.* 11:370-380 (1991); Gibson and McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 278:25628-25636 (2003)), y *MDH3* (Steffan and McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 267:24708-24715 (1992)), las cuales se localizan en la mitocondria, citosol, y peroxisoma, respectivamente. *E. coli* es conocida por tener una malato deshidrogenasa activa, codificada por *mdh*.

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

[0408] Fumarato hidratasa (EC 4.2.1.2) cataliza la hidratación reversible de fumarato a malato. Las tres fumarasas de *E. coli,* codificadas por *fumA*, *fumB* y *fumC*, se regulan bajo diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno. FumB es sensible a oxígeno y es activa bajo condiciones anaerobias. FumA es activa bajo condiciones microanaerobias, y FumC es activa bajo condiciones de

crecimiento aerobias (Tseng et al., *J. Bacteriol.* 183:461-467 (2001);Woods et al., *Biochim. Biophys. Acta* 954:14-26 (1988); Guest et al., *J. Gen. Microbiol.* 131:2971-2984 (1985)). *S. cerevisiae* contiene una copia de un gen que codifica una fumarasa, *FUM1*, cuyo producto se localiza tanto en el citosol como en la mitocondria (Sass et al., *J. Biol. Chem.* 278:45109-45116 (2003)). Enzimas fumarasas adicionales se encuentran en *Campylobacter jejuni* (Smith et al., *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31:961-975 (1999)), *Thermus thermophilus* (Mizobata et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 355:49-55 (1998)) y *Rattus norvegicus* (Kobayashi et al., *J. Biochem.* 89:1923-1931 (1981)). Enzimas similares con alta homología de secuencia incluyen *fum1* de *Arabidopsis thaliana* y *fumC* de *Corynebacterium glutamicum*. La fumarasa *MmcBC* de *Pelotomaculum thermopropionicum* es otra clase de fumarasa con dos subunidades (Shimoyama et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 270:207-213 (2007)).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
fumA	NP_416129.1	16129570	*Escherichia coli*
fumB	NP_418546.1	16131948	*Escherichia coli*
fumC	NP_416128.1	16129569	*Escherichia coli*
FUM1	NP_015061	6324993	*Saccharomyces cerevisiae*
fumC	Q8NRN8.1	39931596	*Corynebacterium glutamicum*
fumC	O69294.1	9789756	*Campylobacter jejuni*
fumC	P84127	75427690	*Thermus thermophilus*
fumH	P14408.1	120605	*Rattus norvegicus*
MmcB	YP_001211906	147677691	*Pelotomaculum thermopropionicum*
MmcC	YP_001211907	147677692	*Pelotomaculum thermopropionicum*

[0409] La fumarato reductasa cataliza la reducción de fumarato a succinato. La fumarato reductasa de *E. coli*, compuesta por cuatro subunidades codificadas por *frdABCD,* es ligada a membrana y activa bajo condiciones anaerobias. El donador de electrones para esta reacción es menaquinona y los dos protones producidos en esta reacción no contribuyen al gradiente de protones (Iverson et al., *Science* 284:1961-1966 (1999)). El genoma de la levadura codifica dos isozimas fumarato reductasas solubles, codificadas por FRDS1 (Enomoto et al., *DNA Res.* 3:263-267 (1996)) y FRDS2 (Muratsubaki et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 352:175-181

(1998)), las cuales se localizan en el citosol y la promitocondria, respectivamente, y se usan durante el crecimiento anaerobio en glucosa (Arikawa et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 165:111-116 (1998)).

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

[0410] La acilación, dependiente de ATP, de succinato a succinil-CoA se cataliza por succinil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.5). El producto de los genes *LSC1* y *LSC2* de *S. cerevisiae* y los genes *sucC* y *sucD* de *E. coli* forman naturalmente un complejo succinil-CoA sintetasa, que cataliza la formación de succinil-CoA a partir de succinato con el consumo concomitante de un ATP, una reacción que es reversible *in vivo* (Buck et al., *Biochemistry* 24:6245-6252 (1985)). Estas proteínas se identifican a continuación:

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

[0411] Alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa (EC 1.2.7.3), también conocida como 2-oxoglutarato sintasa o 2-oxoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa (OFOR), forma alfa-ketoglutarato a partir de CO_2 y succinil-CoA con consumo concurrente de dos equivalentes ferredoxina reducidos. OFOR y piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) son miembros de una familia diversa de 2-oxoácido:ferredoxina (flavodoxina) oxidorreductasas, las cuales utilizan pirofosfato de tiamina, CoA y grupos de hierro-azufre como cofactores, y ferredoxina, flavodoxina y FAD como portadores de electrones *(Adams et al., Archaea. Adv. Protein Chem. 48:101-180 (1996))*. Enzimas en esta clase son reversibles y funcionan en la dirección de carboxilación en organismos que fijan carbono por el ciclo de los RTCA tales como *Hydrogenobacter thermophilus*,

Desulfobacter hydrogenophilus y *Chlorobium species* (Shiba et al. 1985; Evans et al., Proc. Natl. Acad. Scl. U.S.A. 55:92934 (1966); Buchanan, 1971). La enzima de dos subunidades de *H. thermophilus*, codificada por *korAB*, se ha clonado y expresado en *E. coli* (Yun et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 282:589-594 (2001)). Una OFOR de cinco subunidades del mismo organismo con estricta especificidad de sustrato para succinil-CoA, codificada por *forDABGE*, se identificó y expresó recientemente en *E. coli* (Yun et al. 2002). Se ha caracterizado la cinética de la fijación de CO_2 de las dos enzimas OFOR de *H. thermophilus* (Yamamoto et al., Extremophiles 14:79-85 (2010)). Una OFOR, fijadora de CO_2, de *Chlorobium thiosulfatophilum* se ha purificado y caracterizado, pero los genes que codifican esta enzima no se han identificado hasta la fecha. Enzimas candidatas en la especie *Chlorobium* pueden inferirse por similitud de secuencia con los genes de *H. thermophilus*. Por ejemplo, el genoma de *Chlorobium limicola* codifica dos proteínas similares. Se predice que bacterias acetogénicas tales como *Moorella thermoacetica* codifican dos enzimas OFOR. Se predice que la enzima codificada por *Moth_0034* funciona en la dirección de asimilación de CO_2. Los genes asociados con esta enzima, *Moth_0034*, no se han validado experimentalmente hasta la fecha, pero pueden inferirse por similitud de secuencia con enzimas OFOR conocidas.

[0412] Enzimas OFOR que funcionan en la dirección de descarboxilación bajo condiciones fisiológicas pueden catalizar igualmente la reacción inversa. La OFOR de la arquea termoacidófila *Sulfolobus* sp. Cepa 7, codificada por ST2300, se ha estudiado extensivamente (Zhang et al. 1996). Se ha desarrollado un sistema de expresión a base de plásmidos para expresar eficientemente esta proteína en *E. coli* (Fukuda et al., Eur. J. Biochem. 268:5639-5646 (2001)), y se determinaron residuos involucrados en especificidad de sustrato (Fukuda and Wakagi, Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002)). La OFOR codificada por *Ape1472/Ape1473* de la cepa K1 de *Aeropyrum pernix* se clonó recientemente en *E. coli*, se caracterizó, y se descubrió que reacciona con 2-oxoglutarato y una amplia gama de 2-oxoácidos (Nishizawa et al., FEBS Lett. 579:2319-2322 (2005)). Otra OFOR ejemplar se codifica por *oorDABC* en *Helicobacter pylori* (Hughes et al. 1998). Una enzima específica a alfa-ketoglutarato se ha reportado en *Thauera aromatica* (Dorner and Boll, J, Bacteriol. 184 (14), 3975-83 (2002). Una enzima similar puede encontrarse en *Rhodospirillum rubrum* por homología de secuencia. Se ha identificado asimismo una enzima de dos subunidades en *Chlorobium tepidum* (Eisen et al., PNAS 99(14): 9509-14 (2002)).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
korA	BAB21494	12583691	*Hydrogenobacter thermophilus*
korB	BAB21495	12583692	*Hydrogenobacter thermophilus*
forD	BAB62132.1	14970994	*Hydrogenobacter thermophilus*
forA	BAB62133.1	14970995	*Hydrogenobacter thermophilus*
forB	BAB62134.1	14970996	*Hydrogenobacter thermophilus*
forG	BAB62135.1	14970997	*Hydrogenobacter thermophilus*
forE	BAB62136.1	14970998	*Hydrogenobacter thermophilus*
Clim_0204	ACD89303.1	189339900	*Chlorobium limicola*
Clim_0205	ACD89302.1	189339899	*Chlorobium limicola*
Clim_1123	ACD90192.1	189340789	*Chlorobium limicola*
Clim_1124	ACD90193.1	189340790	*Chlorobium limicola*
Moth_1984	YP_430825.1	83590816	*Moorella thermoacetica*
Moth_1985	YP_430826.1	83590817	*Moorella thermoacetica*
Moth_0034	YP_428917.1	83588908	*Moorella thermoacetica*
ST2300	NP_378302.1	15922633	*Sulfolobus* sp. strain 7
Ape1472	BAA80470.1	5105156	*Aeropyrum pernix*
Ape1473	BAA80471.2	116062794	*Aeropyrum pernix*
oorD	NP_207383.1	15645213	*Helicobacter pylori*
oorA	NP_207384.1	15645214	*Helicobacter pylori*
oorB	NP_207385.1	15645215	*Helicobacter pylori*
oorC	NP_207386.1	15645216	*Helicobacter pylori*
CT0163	NP_661069.1	21673004	*Chlorobium tepidum*
CT0162	NP_661068.1	21673003	*Chlorobium tepidum*
korA	CAA12243.2	19571179	*Thauera aromatica*
korB	CAD27440.1	19571178	*Thauera aromatica*
Rru_A2721	YP_427805.1	83594053	*Rhodospirillum rubrum*

Rru_A2722	YP_427806.1	83594054	*Rhodospirillum rubrum*

[0413] Isocitrato deshidrogenasa cataliza la descarboxilación reversible de isocitrato a 2-oxoglutarato acoplado a la reducción de $NAD(P)^+$. Enzimas IDH en *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli* se codifican por *IDP1* e *icd*, respectivamente (Haselbeck and McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 266:2339-2345 (1991); Nimmo, H.G., *Biochem. J.* 234:317-2332 (1986)). La reacción inversa en el ciclo de los TCA reductores, la carboxilación reductora de 2-oxoglutarato a isocitrato, se favorece por la IDH, fijadora de CO_2, dependiente de NADPH, de *Chlorobium limicola* y se expresó funcionalmente en *E. coli* (Kanao et al., *Eur. J. Biochem.* 269:1926-1931 (2002)). Una enzima similar con 95% de identidad de secuencia se encuentra en el genoma de *C. tepidum*, aparte de otros candidatos enumerados a continuación.

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

[0414] En *H. thermophilus* la carboxilación reductora de 2-oxoglutarato a isocitrato se cataliza por dos enzimas: 2-oxoglutarato carboxilasa y oxalosuccinato reductasa. 2-Oxoglutarato carboxilasa (EC 6.4.1.7) cataliza la carboxilación, dependiente de ATP, de alfa-ketoglutarato a oxalosuccinato (Aoshima and Igarashi, *Mol. Microbiol.* 62:748-759 (2006)). Esta enzima es un gran complejo compuesto por dos subunidades. La biotinilación de la subunidad grande (A) se requiere para la función de la enzima (Aoshima et al., *Mol. Microbiol.* 51:791-798 (2004)). Oxalosuccinato reductasa (EC 1.1.1.-) cataliza la conversión, dependiente de NAD, de oxalosuccinato en D-*threo*-isocitrato. La enzima es un homodímero codificado por *icd* en *H. thermophilus*. Los parámetros cinéticos de esta enzima indican que la enzima opera únicamente en la dirección de carboxilación reductora *in vivo,* en contraste con enzimas isocitrato deshidrogenasas en otros organismos (Aoshima and Igarashi, *J. Bacteriol.* 190:2050-2055 (2008)). Basándose en

homología de secuencia, se han encontrado asimismo genes candidatos en *Thiobacillus denitrificans* y *Thermocrinis albus.*

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
cfiA	BAF34932.1	116234991	*Hydrogenobacter thermophilus*
cifB	BAF34931.1	116234990	*Hydrogenobacter thermophilus*
lcd	BAD02487.1	38602676	*Hydrogenobacter thermophilus*
Tbd_1556	YP_315314	74317574	*Thiobacillus denitrificans*
Tbd_1555	YP_315313	74317573	*Thiobacillus denitrificans*
Tbd_0854	YP_314612	74316872	*Thiobacillus denitrificans*
Thal_0268	YP_003473030	289548042	*Thermocrinis albus*
Thal_0267	YP_003473029	289548041	*Thermocrinis albus*
Thal_0646	YP_003473406	289548418	*Thermocrinis albus*

[0415] Aconitasa (EC 4.2.1.3) es una proteína con contenido de ferroso-sulfuroso que cataliza la isomerización reversible de citrato e iso-citrato por medio del intermediario *cis*-aconitato. Dos enzimas aconitasas se codifican en el genoma de *E. coli* por *acnA* y *acnB*. AcnB es la enzima catabólica principal, mientras que AcnA es más estable y parece ser activa bajo condiciones de estrés oxidativo o ácido (Cunningham et al., *Microbiology* 143 (Pt 12):3795-3805 (1997)). Dos isozimas de aconitasa en *Salmonella typhimurium* se codifican por *acnA* y *acnB* (Horswill and Escalante-Semerena, *Biochemistry* 40:4703-4713 (2001)). La aconitasa de *S. cerevisiae*, codificada por *ACO1*, se localiza en las mitocondrias donde participa en el ciclo de los TCA (Gangloff et al., *Mol. Cell. Biol.* 10:3551-3561 (1990)) y el citosol donde participa en el ciclo de glioxilato (Regev-Rudzki et al., *Mol. Biol. Cell.* 16:4163-4171 (2005)).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
acnA	AAC7438.1	1787531	*Escherichia coli*
acnB	AAC73229.1	2367097	*Escherichia coli*
acnA	NP_460671.1	16765056	*Salmonella typhimurium*
acnB	NP_459163.1	16763548	*Salmonella typhimurium*
ACO1	AAA34389.1	170982	*Saccharomyces cerevisiae*

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
HP0779	NP_207572.1	15645398	*Helicobacter pylori 26695*
H16_B0568	CAJ95365.1	113529018	*Ralstonia eutropha*
DesfrDRAFT_3783	ZP_07335307.1	303249064	*Desulfovibrio fructosovorans JJ*
Suden_1040 (acnB)	ABB44318.1	78497778	*Sulfurimonas denitrificans*
Hydth_0755	ADO45152.1	308751669	*Hydrogenobacter thermophilus*
CT0543 (acn)	AAM71785.1	21646475	*Chlorobium tepidum*
Clim_2436	YP_001944436.1	189347907	*Chlorobium limicola*
Clim_0515	ACD89607.1	189340204	*Chlorobium limicola*

[0416] Piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) cataliza la oxidación reversible de piruvato para formar acetil-CoA. La PFOR de *Desulfovibrio africanus* se ha clonado y expresado en *E. coli*, resultante en una enzima recombinante activa que fue estable durante varios días en la presencia de oxígeno (Pieulle et al., *J. Bacteriol.* 179:5684-5692 (1997)). La estabilidad al oxígeno es relativamente poco común en PFORs y se cree que es conferida por una extensión del residuo 60 en la cadena polipeptídica de la enzima *D. africanus*. Dos residuos de cisteína en esta enzima forman un enlace disulfuro que la protege contra inactivación en la forma de oxígeno. Este enlace disulfuro y la estabilidad en la presencia de oxígeno se han encontrado asimismo en otra especie *Desulfovibrio* (Vita et al., Biochemistry, 47: 957-64 (2008)). Asimismo la PFOR de *M. thermoacetica* está bien caracterizada (Menon and Ragsdale, *Biochemistry* 36:8484-8494 (1997)) y demostró tener una elevada actividad en la dirección de la síntesis de piruvato durante el crecimiento autotrófico (Furdui and Ragsdale, *J. Biol. Chem.* 275:28494-28499 (2000)). Además, *E. coli* posee un marco abierto de lectura no caracterizado, *ydbK*, que codifica una proteína que es 51% idéntica a la PFOR de *M. thermoacetica*. Se ha descrito evidencia de actividad piruvato oxidorreductasa en *E. coli* (Blaschkowski et al., *Eur. J. Biochem.* 123:563-569 (1982)). PFORs se han descrito igualmente en otros organismos, incluyendo *Rhodobacter capsulatas* (Yakunin and Hallenbeck, Biochimica et Biophysica Acta 1409 (1998) 39-49 (1998)) y *Choloboum tepidum* (Eisen et al., PNAS 99(14): 9509-14 (2002)). La PFOR de cinco subunidades de *H. thermophilus*, codificada por *porEDABG*, se

clonó en *E. coli* y demostró funcionar en las dos direcciones de descarboxilar y asimilar CO_2 (Ikeda et al. 2006; Yamamoto et al., *Extremophiles* 14:79-85 (2010)). Existen también homólogos en *C. carboxidivorans P7*. Varias enzimas PFOR adicionales se describen en la siguiente reseña (Ragsdale, S.W., *Chem. Rev.* 103:2333-2346 (2003)). Finalmente, flavodoxina reductasas (v.gr., *fqrB* de *Helicobacter pylori* o *Campylobacter jejuni*) (St Maurice et al., *J. Bacteriol.* 189:4764-4773 (2007)) o proteínas tipo Rnf (Seedorf et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:2128-2133 (2008); y Herrmann, *J. Bacteriol* 190:784-791 (2008)) ofrecen un medio para generar NADH o NADPH a partir de la ferredoxina reducida, generada por PFOR. Estas proteínas se identifican a continuación.

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
DesfrDRAFT_0121	ZP_07331646.1	303245362	*Desulfovibrio fructosovorans JJ*
Por	CAA70873.1	1770208	*Desulfovibrio africanus*
por	YP_012236.1	46581428	*Desulfovibrio vulgaris str. Hildenborough*
Dde_3237	ABB40031.1	78220682	*DesulfoVibrio desulfuricans G20*
Ddes_0298	YP_002478891.1	220903579	*Desulfovibrio desulfuricans subsp. desulfuricans str. ATCC 27774*
Por	YP_428946.1	83588937	*Moorella thermoacetica*
YdbK	NP_415896.1	16129339	*Escherichia coli*
nifJ (CT1628)	NP_662511.1	21674446	*Chlorobium tepidum*
CJE1649	YP_179630.1	57238499	*Campylobacter jejuni*
nifJ	ADE85473.1	294476085	*Rhodobacter capsulatus*
porE	BAA95603.1	7768912	*Hydrogenobacter thermophilus*
porD	BAA95604.1	7768913	*Hydrogenobacter thermophilus*
porA	BAA95605.1	7768914	*Hydrogenobacter thermophilus*
porB	BAA95606.1	776891	*Hydrogenobacter thermophilus*

porG	BAA95607.1	7768916	*Hydrogenobacter thermophilus*
FqrB	YP_001482096.1	157414840	*Campylobacter jejuni*
HP1164	NP_207955.1	15645778	*Helicobacter pylori*
RnfC	EDK33306.1	146346770	*Clostridium kluyveri*
RnfD	EDK33307.1	146346771	*Clostridium kluyveri*
RnfG	EDK33308.1	146346772	*Clostridium kluyveri*
RnfE	EDK33309.1	146346773	*Clostridium kluyveri*
RnfA	EDK33310.1	146346774	*Clostridium kluyveri*
RnfB	EDK33311.1	146346775	*Clostridium kluyveri*

[0417] La conversión de piruvato en acetil-CoA puede catalizarse por varias otras enzimas o sus combinaciones. Por ejemplo, piruvato deshidrogenasa puede transformar piruvato en acetil-CoA con la reducción concomitante de una molécula de NAD en NADH. Es un complejo multi-enzimas, que catalizan una serie de reacciones parciales, lo cual tiene como resultado acilar la descarboxilación oxidativa de piruvato. La enzima se compone de tres subunidades: la piruvato descarboxilasa (E1), dihidrolipoamida aciltransferasa (E2) y dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3). Esta enzima está naturalmente presente en varios organismos, incluyendo *E. coli* y *S. cerevisiae*. En la enzima de *E. coli*, residuos específicos en el componente E1 son responsables de especificidad de sustrato (Bisswanger, H., J. Biol. Chem. 256:815-82 (1981); Bremer, J., Eur. J. Biochem. 8:535-540 (1969); Gong et al., J. Biol. Chem. 275:13645-13653 (2000)). Los esfuerzos de generar enzimas mediante ingeniería genética han mejorado la actividad de la enzima PDH de *E. coli* bajo condiciones anaerobias (Kim et al., J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008); Kim et al., Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771 (2007); Zhou et al., Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008)). En contraste con la PDH de *E. coli*, el complejo *B. subtilis* es activo y se requiere para crecimiento bajo condiciones anaerobias (Nakano et al., J. Bacteriol. 179:6749-6755 (1997)). La PDH de *Klebsiella pneumoniae*, caracterizada durante el crecimiento en glicerol, es asimismo activa bajo condiciones anaerobias (5). Estructuras cristalinas del complejo de enzimas de riñón bovino (18) y el dominio catalítico E2 de *Azotobacter vinelandii* se encuentran disponibles (4). Todavía otra enzima que puede catalizar esta conversión es piruvato formiato liasa. Esta enzima cataliza la conversión de piruvato y CoA en acetil-CoA y formiato. Piruvato formiato liasa es

una enzima común en organismos procariotas que se usa para ayudar a modular el balance redox anaerobio. Enzimas ejemplares pueden hallarse en *Escherichia coli* codificadas por *pflB* (Knappe and Sawers, FEMS.Microbiol Rev. 6:383-398 (1990)), *Lactococcus lactis* (Melchiorsen et al., Appl Microbiol Biotechnol 58:338-344 (2002)), y *Streptococcus mutans* (Takahashi-Abbe et al., Oral.Microbiol Immunol. 18:293-297 (2003)). *E. coli* posee una piruvato formiato liasa adicional, codificada por *tdcE*, que cataliza la conversión de piruvato o 2-oxobutanoato en acetil-CoA o propionil-CoA, respectivamente (Hesslinger et al., Mol. Microbiol 27:477-492 (1998)). Los dos *pflB* y *tdcE* de *E. coli* requieren la presencia de la enzima que activa la piruvato formiato liasa, codificada por *pflA*. Además, una proteína corta, codificada por *yfiD* en *E. coli*, puede asociarse con, y restaurar, la actividad a piruvato formiato liasa escindida por oxígeno (Vey et al., Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:16137-16141 (2008). Nótese que *pflA* y *pflB* de *E. coli* se expresaron en *S. cerevisiae* como un medio de aumentar acetil-CoA citosólica para la producción de butanol, como se describe en WO/2008/080124]. Piruvato formiato liasas adicionales y enzimas candidatas activadoras, codificadas por *pfl* y *act*, respectivamente, se encuentran en *Clostridium pasteurianum* (Weidner et al., J Bacteriol. 178:2440-2444 (1996)).

[0418] Además, diferentes enzimas pueden usarse en combinación para convertir piruvato en acetil-CoA. Por ejemplo, en *S. cerevisiae*, acetil-CoA se obtiene en el citosol descarboxilando primeramente piruvato para formar acetaldehído; este último se oxida a acetato por acetaldehído deshidrogenasa y, posteriormente, se activa para formar acetil-CoA por acetil-CoA sintetasa. Acetil-CoA sintetasa es una enzima nativa en varios otros organismos incluyendo *E. coli* (Kumari et al., J. Bacteriol. 177:2878-2886 (1995)), *Salmonella enterica* (Starai et al., Microbiology 151:3793-3801 (2005); Starai et al., J. Biol. Chem. 280:26200-26205 (2005)), y *Moorella thermoacetica* (ya descrita). Alternativamente, puede activarse acetato para formar acetil-CoA por acetato cinasa y fosfotransacetilasa. Acetato cinasa convierte primeramente acetato en acetil-fosfato con el uso concomitante de una molécula de ATP. Acetil-fosfato y CoA se convierten seguidamente en acetil-CoA con la liberación de un fosfato por fosfotransacetilasa. Las dos acetato cinasa y fosfotransacetilasa son enzimas bien estudiadas en varias *Clostridia* y *Methanosarcina thermophila.*

[0419] Todavía otro modo de convertir piruvato en acetil-CoA es por medio de piruvato oxidasa. Piruvato oxidasa convierte piruvato en acetato, usando ubiquinona como el aceptor de electrones. En *E. coli*, esta actividad se codifica por

poxB. *PoxB* tiene similitud con piruvato descarboxilasa de *S. cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*. La enzima tiene un cofactor pirofosfato de tiamina (Koland and Gennis, Biochemistry 21:4438-4442 (1982)); O'Brien et al., Biochemistry 16:3105-3109 (1977); O'Brien and Gennis, J. Biol. Chem. 255:3302-3307 (1980)) y un cofactor dinucleótido flavina adenina (FAD - *flavin adenine dinucleotide*). Acetato puede convertirse entonces en acetil-CoA por acetil-CoA sintetasa o por acetato cinasa y fosfotransacetilasa, como se describe anteriormente. Algunas de estas enzimas pueden catalizar también la reacción inversa de acetil-CoA a piruvato.

[0420] Para enzimas que usan equivalentes reductores en la forma de NADH o NADPH, estos portadores reducidos pueden generarse transfiriendo electrones de ferredoxina reducida. Dos enzimas catalizan la transferencia reversible de electrones de ferredoxinas reducidas a $NAD(P)^+$, ferredoxina:NAD^+ oxidorreductasa (EC 1.18.1.3) y ferredoxina:$NADP^+$ oxidorreductasa (FNR, EC 1.18.1.2). Ferredoxina:$NADP^+$ oxidorreductasa (FNR, EC 1.18.1.2) tiene un cofactor FAD enlazado no covalentemente que facilita la transferencia reversible de electrones de NADPH a aceptores de bajo potencial tales como ferredoxinas o flavodoxinas (Blaschkowski et al., *Eur. J. Biochem.* 123:563-569 (1982); Fujii et al., 1977). La FNR de *Helicobacter pylori*, codificada por *HP1164 (fqrB)*, se acopla a la actividad de piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) resultante en la producción, dependiente de piruvato, de NADPH (St et al. 2007). Una enzima análoga se encuentra en *Campylobacter jejuni* (St et al. 2007). Una enzima ferredoxina:$NADP^+$ oxidorreductasa se codifica en el genoma de *E. coli* por *fpr* (Bianchi et al. 1993). Ferredoxina:NAD^+ oxidorreductasa utiliza ferredoxina reducida para generar NADH de NAD^+. En varios organismos, incluyendo *E. coli*, esta enzima es un componente de complejos multifuncionales de enzimas dioxigenasas. La ferredoxina:NAD^+ oxidorreductasa de *E. coli*, codificada por *hcaD*, es un componente del sistema de 3-fenilpropionato dioxigenasa involucrada en la utilización de ácidos aromáticos (Diaz et al. 1998). La actividad NADH:ferredoxina reductasa se detectó en extractos celulares de la cepa TK-6 de *Hydrogenobacter thermophilus*, si bien todavía no se ha indicado un gen con actividad (Yoon et al. 2006). Finalmente, las proteínas tipo Rnf, asociadas a membrana, conservadoras de energía (Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:2128-2133 (2008); Herrmann et al., *J. Bacteriol.* 190:784-791 (2008)) ofrecen un medio de generar NADH o NADPH de ferredoxina reducida.

Ferredoxina:NAD(P)+ oxidorreductasas adicionales se han anotado en *Clostridium carboxidivorans* P7.

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
HP1164	NP_207955.1	15645778	*Helicobacter pylori*
RPA3954	CAE29395.1	39650872	*Rhodopseudomonas palustris*
fpr	BAH29712.1	225320633	*Hydrogenobacter thermophilus*
yumC	NP_391091.2	255767736	*Bacillus subtilis*
CJE0663	AAW35824.1	57167045	*Campylobacter jejuni*
fpr	P28861.4	399486	*Escherichia coli*
hcaD	AAC75595.1	1788892	*Escherichia coli*
LOC100282643	NP_001149023.1	226497434	*Zea mays*
RnfC	EDK33306.1	146346770	*Clostridium kluyveri*
RnfD	EDK33307.1	146346771	*Clostridium kluyveri*
RnfG	EDK33308.1	146346772	*Clostridium kluyveri*
RnfE	EDK33309.1	146346773	*Clostridium kluyveri*
RnfA	EDK33310.1	146346774	*Clostridium kluyveri*
RnfB	EDK33311.1	146346775	*Clostridium kluyveri*
CcarbDRAFT_2639	ZP_05392639.1	255525707	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_2638	ZP_05392638.1	255525706	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_2636	ZP_05392636.1	255525704	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_5060	ZP_05395060.1	255528241	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_2450	ZP_05392450.1	255525514	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_1084	ZP_05391084.1	255524124	*Clostridium carboxidivorans P7*

[0421] Las ferredoxinas son pequeñas proteínas ácidas que contienen uno o más grupos (*clusters*) ferrosos-sulfurosos que funcionan como portadores de electrones intracelulares con un bajo potencial de reducción. Las ferredoxinas

reducidas donan electrones a enzimas dependientes de Fe, tales como ferredoxina-$NADP^+$ oxidorreductasa, piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) y 2-oxoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa (OFOR). El gen *fdx1* de *H. thermophilus* codifica una ferredoxina tipo [4Fe-4S] que se requiere para la carboxilación reversible de 2-oxoglutarato y piruvato por OFOR y PFOR, respectivamente (Yamamoto et al., *Extremophiles* 14:79-85 (2010)). La ferredoxina asociada con la 2-oxoácido:ferredoxina reductasa de *Sulfolobus solfataricus* es una ferredoxina tipo [3Fe-4S][4Fe-4S] de grupo doble monomérico (Park et al. 2006). Aunque el gen asociado con esta proteína no se ha secuenciado completamente, el dominio N-terminal comparte 93% de homología con la ferredoxina *zfx* de *S. acidocaldarius*. El genoma de *E. coli* codifica una ferredoxina soluble de función fisiológica desconocida, *fdx*. Cierta evidencia indica que esta proteína puede funcionar en un ensamble de grupo hierro-azufre (Takahashi and Nakamura, 1999). Proteínas ferredoxinas adicionales se han caracterizado en *Helicobacter pylori* (Mukhopadhyay et al. 2003) y *Campylobacter jejuni* (van Vliet et al. 2001). Una 2Fe-2S ferredoxina de *Clostridium pasteurianum* se ha clonado y expresado en *E. coli* (Fujinaga and Meyer, Biochemical and Biophysical Research Communications, 192(3): (1993)). Se predice que bacterias acetogénicas tales como *Moorella thermoacetica*, *Clostridium carboxidivorans P7* y *Rhodospirillum rubrum* codifican varias ferredoxinas, enumeradas a continuación.

Proteína	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
fdx1	BAE02673.1	68163284	*Hydrogenobacter thermophilus*
M11214.1	AAA83524.1	144806	*Clostridium pasteurianum*
Zfx	AAY79867.1	68566938	*Sulfolobus acidocalarius*
Fdx	AAC75578.1	1788874	*Escherichia coli*
hp_0277	AAD07340.1	2313367	*Helicobacter pylori*
fdxA	CAL34484.1	112359698	*Campylobacter jejuni*
Moth_0061	ABC18400.1	83571848	*Moorella thermoacetica*
Moth_1200	ABC19514.1	83572962	*Moorella thermoacetica*
Moth_1888	ABC20188.1	83573636	*Moorella thermoacetica*
Moth_2112	ABC20404.1	83573852	*Moorella thermoacetica*
Moth_1037	ABC19351.1	83572799	*Moorella thermoacetica*
CcarbDRAFT_4383	ZP_05394383.1	255527515	*Clostridium carboxidivorans P7*

CcarbDRAFT_2958	ZP_05392958.1	255526034	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_2281	ZP_05392281.1	255525342	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_5296	ZP_05395295.1	255528511	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_1615	ZP_05391615.1	255524662	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_1304	ZP_05391304.1	255524347	*Clostridium carboxidivorans P7*
cooF	AAG29808.1	11095245	*Carboxidothermus hydrogenoformans*
fdxN	CAA35699.1	46143	*Rhodobacter capsulatus*
Rru_A2264	ABC23064.1	83576513	*Rhodospirillum rubrum*
Rru_A1916	ABC22716.1	83576165	*Rhodospirillum rubrum*
Rru_A2026	ABC22826.1	83576275	*Rhodospirillum rubrum*
cooF	AAC45122.1	1498747	*Rhodospirillum rubrum*
fdxN	AAA26460.1	152605	*Rhodospirillum rubrum*
Alvin_2884	ADC63789.1	288897953	*Allochromatium vinosum DSM 180*
fdx	YP_002801146.1	226946073	*Azotobacter vinelandii DJ*
CKL_3790	YP_001397146.1	153956381	*Clostridium kluyveri DSM 555*
fer1	NP_949965.1	39937689	*Rhodopseudomonas palustris CGA009*
fdx	CAA12251.1	3724172	*Thauera aromatica*
CHY_2405	YP_361202.1	78044690	*Carboxidothermus hydrogenoformans*
fer	YP_359966.1	78045103	*Carboxidothermus hydrogenoformans*
fer	AAC83945.1	1146198	*Bacillus subtilis*
fdx1	NP_249053.1	15595559	*Pseudomonas aeruginosa PA01*
yfhL	AP_003148.1	89109368	*Escherichia coli K-12*

[0422] Succinil-CoA transferasa cataliza la conversión de succinil-CoA en succinato transfiriendo al mismo tiempo la fracción CoA a una molécula aceptora de CoA. Muchas transferasas tienen una amplia especificidad y pueden utilizar aceptores de CoA tan disímiles como acetato, succinato, propionato, butirato, 2-metilacetoacetato, 3-ketohexanoato, 3-ketopentanoato, valerato, crotonato, 3-mercaptopropionato, propionato, vinilacetato, y butirato, entre otros.

[0423] La conversión de succinato en succinil-CoA puede llevarse a cabo por una transferasa que no requiere el consumo directo de una ATP o GTP. Este tipo de reacción es común en un número de organismos. La conversión de succinato en succinil-CoA puede catalizarse igualmente por succinil-CoA:Acetil-CoA transferasa. Se ha demostrado que el producto del gen *cat1* de *Clostridium kluyveri* exhibe actividad succinil-CoA: acetil-CoA transferasa (Sohling and Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996)). Además, la actividad está presente en *Trichomonas vaginalis* (van Grinsven et al. 2008) y *Trypanosoma brucei* (Riviere et al. 2004). La succinil-CoA:acetato CoA-transferasa de *Acetobacter aceti*, codificada por *aarC*, reemplaza a succinil-CoA sintetasa en un ciclo los TCA variantes (Mullins et al. 2008). Actividades succinil-CoA transferasa similares están también presentes en *Trichomonas vaginalis* (van Grinsven et al. 2008), *Trypanosoma brucei* (Riviere et al. 2004) y *Clostridium kluyveri* (Sohling and Gottschalk, 1996c). La beta-ketoadipato:succinil-CoA transferasa codificada por *pcaI* y *pcaJ* en *Pseudomonas putida* es aún otra candidata (Kaschabek et al. 2002). Las proteínas ya mencionadas se identifican a continuación.

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
cat1	P38946.1	729048	*Clostridium kluyveri*
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	*Trichomonas vaginalis G3*
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	*Trypanosoma brucei*
pcaI	AAN69545.1	24985644	*Pseudomonas putida*
pcaJ	NP_746082.1	26990657	*Pseudomonas putida*
aarC	ACD85596.1	189233555	*Acetobacter aceti*

[0424] Una transferasa ejemplar adicional que convierte succinato en succinil-CoA, convirtiendo al mismo tiempo una 3-ketoacil-CoA en un 3-cetoácido, es succinil-CoA:3:cetoácido-CoA transferasa (EC 2.8.3.5). Succinil-CoA:3:cetoácido-CoA transferasas ejemplares están presentes en *Helicobacter pylori* (Corthesy-

Theulaz et al. 1997), *Bacillus subtilis*, y *Homo sapiens* (Fukao et al. 2000; Tanaka et al. 2002). Las proteínas ya mencionadas se identifican a continuación.

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
HPAG1_0676	YP_627417	108563101	*Helicobacter pylori*
HPAG1_0677	YP_627418	108563102	*Helicobacter pylori*
ScoA	NP_391778	16080950	*Bacillus subtilis*
ScoB	NP_391777	16080949	*Bacillus subtilis*
OXCT1	NP_000427	4557817	*Homo sapiens*
OXCT2	NP_071403	11545841	*Homo sapiens*

[0425] Convertir succinato en succinil-CoA por succinil-CoA:3:cetoácido-CoA transferasa requiere la conversión simultánea de una 3-cetoacil-CoA, tal como acetoacetil-CoA, en un 3-cetoácido tal como acetoacetato. La reconversión de un 3-cetoácido en una 3-cetoacil-CoA puede catalizarse por una acetoacetil-CoA:acetato:CoA transferasa. Acetoacetil-CoA:acetato:CoA transferasa convierte acetoacetil-CoA y acetato en acetoacetato y acetil-CoA, o viceversa. Enzimas ejemplares que incluyen los productos de los genes *atoAD* de *E. coli* (Hanai et al., Appl Environ Microbiol 73:7814-7818 (2007), *ctfAB* de *C. acetobutylicum* (Jojima et al., Appl Microbiol Biotechnol 77:1219-1224 (2008), y *ctfAB* de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kosaka et al., *Biosci.Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007)) se indican a continuación.

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
AtoA	NP_416726.1	2492994	*Escherichia coli*
AtoD	NP_416725.1	2492990	*Escherichia coli*
CtfA	NP_149326.1	15004866	*Clostridium acetobutylicum*
CtfB	NP_149327.1	15004867	*Clostridium acetobutylicum*
CtfA	AAP42564.1	31075384	*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*
CtfB	AAP42565.1	31075385	*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*

[0426] Aún otro posible aceptor de CoA es succinato de bencilo. La succinil-CoA:(R)-succinato de bencilo CoA-transferasa funciona como parte de una vía de degradación anaerobia para tolueno en organismos tales como *Thauera aromatica* (Leutwein and Heider, *J. Bact.* 183(14) 4288-4295 (2001)). Homólogos pueden encontrarse en *Azoarcus* sp. T, *Aromatoleum aromaticum* EbN1, y *Geobacter*

metallireducens GS-15. Las proteínas ya mencionadas se identifican a continuación.

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
bbsE	AAF89840	9622535	*Thauera aromatic*
Bbsf	AAF89841	9622536	*Thauera aromatic*
bbsE	AAU45405.1	52421824	*Azoarcus sp. T*
bbsF	AAU45406.1	52421825	*Azoarcus sp. T*
bbsE	YP_158075.1	56476486	*Aromatoleum aromaticum EbN1*
bbsF	YP_158074.1	56476485	*Aromatoleum aromaticum EbN1*
Gmet_1521	YP_384480.1	78222733	*Geobacter metallireducens GS-15*
Gmet_1522	YP_384481.1	78222734	*Geobacter metallireducens GS-15*

[0427] Adicionalmente, *ygfH* codifica una propionil CoA:succinato CoA transferasa en *E. coli* (Haller et al., *Biochemistry*, 39(16) 4622-4629). Homólogos cercanos pueden encontrarse, por ejemplo, en *Citrobacter youngae* ATCC 29220, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae serovar*, y *Yersinia intermedia* ATCC 29909. Las proteínas ya mencionadas se identifican a continuación.

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
ygfH	NP_417395.1	16130821	*Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655*
CIT292_04485	ZP_03838384.1	227334728	*Citrobacter youngae ATCC 29220*
SARI_04582	YP_001573497.1	161506385	*Salmonella enterica subsp. arizonae serovar*
yinte0001_14430	ZP_04635364.1	238791727	*Yersinia intermedia ATCC 29909*

[0428] Citrato liasa (EC 4.1.3.6) cataliza una serie de reacciones que tienen como resultado la escisión de citrato a acetato y oxaloacetato. La enzima es activa bajo condiciones anaerobias y se compone de tres subunidades: una proteína transportadora de acilo (ACP - *acil-carrier protein*, gamma), una ACP transferasa

(alfa), y una acil liasa (beta). La activación de la enzima usa unión covalente y acetilación de un grupo prostético inusual, 2'-(5"-fosforribosil)-3-'-defosfo-CoA, que es similar en estructura a acetil-CoA. La acilación se cataliza por CitC, una citrato liasa sintetasa. Dos proteínas adicionales, CitG y CitX, se usan para convertir la apoenzima en la holoenzima activa (Schneider et al., *Biochemistry* 39:9438-9450 (2000)). *E. coli* silvestre no tiene actividad citrato liasa; no obstante, mutantes deficientes en la síntesis del cofactor molibdeno tienen una citrato liasa activa (Clark, *FEMS Microbiol. Lett.* 55:245-249 (1990)). La enzima de *E. coli* se codifica por *citEFD*, y la citrato liasa sintetasa se codifica por *citC* (Nilekani and SivaRaman, *Biochemistry* 22:4657-4663 (1983)). La citrato liasa de *Leuconostoc mesenteroides* se ha clonado, caracterizado y expresado en *E. coli* (Bekal et al., *J. Bacteriol.* 180:647-654 (1998)). Enzimas citrato liasas se han identificado asimismo en enterobacterias, que utilizan citrato como una fuente de carbono y energía, incluyendo *Salmonella typhimurium* y *Klebsiella pneumoniae* (Bott, *Arch. Microbiol.* 167: 78-88 (1997); Bott and Dimroth, *Mol. Microbiol.* 14:347-356 (1994)). Las proteínas ya mencionadas se tabulan a continuación.

Proteína	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
citF	AAC73716.1	1786832	*Escherichia coli*
Cite	AAC73717.2	87081764	*Escherichia coli*
citD	AAC73718.1	1786834	*Escherichia coli*
citC	AAC73719.2	87081765	*Escherichia coli*
citG	AAC73714.1	1786830	*Escherichia coli*
citX	AAC73715.1	1786831	*Escherichia coli*
citF	CAA71633.1	2842397	*Leuconostoc mesenteroides*
Cite	CAA71632.1	2842396	*Leuconostoc mesenteroides*
citD	CAA71635.1	2842395	*Leuconostoc mesenteroides*
citC	CAA71636.1	3413797	*Leuconostoc mesenteroides*
citG	CAA71634.1	2842398	*Leuconostoc mesenteroides*
citX	CAA71634.1	2842398	*Leuconostoc mesenteroides*

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
citF	NP_459613.1	16763998	*Salmonella typhimurium*
cite	AAL19573.1	16419133	*Salmonella typhimurium*
citD	NP_459064.1	16763449	*Salmonella typhimurium*
citC	NP_459616.1	16764001	*Salmonella typhimurium*
citG	NP_459611.1	16763996	*Salmonella typhimurium*
citX	NP_459612.1	16763997	*Salmonella typhimurium*
citF	CAA56217.1	565619	*Klebsiella pneumoniae*
cite	CAA56216.1	565618	*Klebsiella pneumoniae*
citD	CAA56215.1	565617	*Klebsiella pneumoniae*
citC	BAH66541.1	238774045	*Klebsiella pneumoniae*
citG	CAA56218.1	565620	*Klebsiella pneumoniae*
citX	AAL60463.1	18140907	*Klebsiella pneumoniae*

[0429] Acetato cinasa (EC 2.7.2.1) cataliza la fosforilación reversible, dependiente de ATP, de acetato a acetilfosfato. Enzimas acetato cinasas ejemplares se han caracterizado en muchos organismos incluyendo *E. coli*, *Clostridium acetobutylicum* y *Methanosarcina thermophila* (Ingram-Smith et al., *J. Bacteriol.* 187:2386-2394 (2005); Fox and Roseman, *J. Biol. Chem.* 261:13487-13497 (1986); Winzer et al., *Microbioloy* 143 (Pt 10):3279-3286 (1997)). De igual manera, se ha demostrado actividad acetato cinasa en el producto del gen *purT* de *E. coli* (Marolewski et al., *Biochemistry* 33:2531-2537 (1994). Algunas enzimas butirato cinasas (EC 2.7.2.7), por ejemplo *buk1* y *buk2* de *Clostridium acetobutylicum,* aceptan también acetato como sustrato (Hartmanis, M.G., *J. Biol. Chem.* 262:617-621 (1987)).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
ackA	NP_416799.1	16130231	*Escherichia coli*
Ack	AAB18301.1	1491790	*Clostridium acetobutylicum*
Ack	AAA72042.1	349834	*Methanosarcina thermophila*
purT	AAC74919.1	1788155	*Escherichia coli*
buk1	NP_349675	15896326	*Clostridium acetobutylicum*
buk2	Q97II1	20137415	*Clostridium acetobutylicum*

[0430] La formación de acetil-CoA a partir de acetilfosfato se cataliza por fosfotransacetilasa (EC 2.3.1.8). El gen *pta* de *E. coli* codifica una enzima que convierte reversiblemente acetil-CoA en acetil-fosfato (Suzuki, T., *Biochim. Biophys. Acta* 191:559-569 (969)). Enzimas acetiltransferasas adicionales se han caracterizado en *Bacillus subtilis* (Rado and Hoch, *Biochim. Biophys. Acta* 321:114-125 (1973), *Clostridium kluyveri* (Stadtman, E., *Methods Enzymol.* 1:5896-599 (1955), y *Thermotoga maritima* (Bock et al., *J. Bacteriol.* 181:1861-1867 (1999)). Esta reacción se cataliza asimismo por algunas enzimas fosfotranbutirilasas (EC 2.3.1.19) incluyendo los productos del gen *ptb* de *Clostridium acetobutylicum* (Wiesenborn et al., *App. Environ. Microbiol.* 55:317-322 (1989); Walter et al., *Gene* 134:107-111 (1993)). Genes *ptb* adicionales se encuentran en la bacteria L2-50, que produce butirato (Louis et al., *J. Bacteriol.* 186:2099-2106 (2004) y *Bacillus megaterium* (Vazquez et al., *Curr. Microbiol.* 42:345-349 (2001).

Proteína	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
Pta	NP_416800.1	71152910	*Escherichia coli*
Pta	P39646	730415	*Bacillus subtilis*
Pta	A5N801	146346896	*Clostridium kluyveri*
Pta	Q9X0L4	6685776	*Thermotoga maritima*
Ptb	NP_349676	34540484	*Clostridium acetobutylicum*
Ptb	AAR19757.1	38425288	bacteria productora de butirato L2-50
Ptb	CAC07932.1	10046659	*Bacillus megaterium*

[0431] La acilación de acetato a acetil-CoA se cataliza por enzimas con actividad acetil-CoA sintetasa. Dos enzimas que catalizan esta reacción son acetil-CoA sintetasa formadora de AMP (EC 6.2.1.1) y acetil-CoA sintetasa formadora de ADP (EC 6.2.1.13). La acetil-CoA sintetasa (ACS), formadora de AMP, es la enzima predominante para la activación de acetato a acetil-CoA. Enzimas ACS ejemplares se encuentran en *E. coli* (Brown et al., *J. Gen. Microbiol.* 102:327-336 (1977)), *Ralstonia eutropha* (Priefert and Steinbuchel, *J. Bacteriol.* 174:6590-6599 (1992)), *Methanothermobacter thermautotrophicus* (Ingram-Smith and Smith, *Archaea* 2:95-107 (2007)), *Salmonella enterica* (Gulick et al., *Biochemistry* 42:2866-2873 (2003)) y *Saccharomyces cerevisiae* (Jogl and Tong, *Biochemistry* 43:1425-1431 (2004)). Las acetil-CoA sintetasas, formadoras de ADP, son

enzimas reversibles con una gama de sustratos generalmente amplia (Musfeldt and Schonheit, *J. Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). Dos isozimas de acetil-CoA sintetasas, formadoras de ADP, se codifican en el genoma de *Archaeoglobus fulgidus* por AF1211 y AF1983 (Musfeldt and Schonheit, *supra* (2002)). La enzima de *Haloarcula marismortui* (anotada como una succinil-CoA sintetasa) acepta también acetato como sustrato y se ha demostrado la reversibilidad de la enzima (Brasen and Schonheit, *Arch. Microbiol.* 182:277-287 (2004)). La ACD codificada por *PAE3250* de la crenarquea hipertermófila *Pyrobaculum aerophilum* mostró la gama de sustratos más amplia de todas las ACDs caracterizadas, que reaccionan con acetato, isobutiril-CoA (sustrato preferido) y fenilacetil-CoA (Brasen and Schonheit, *supra* (2004)). Evolución dirigida o generación mediante ingeniería genética puede usarse para modificar esta enzima para operar a la temperatura fisiológica del organismo hospedero. Las enzimas de *A. fulgidus*, *H. marismortui* y *P. aerophilum* se han clonado, expresado funcionalmente y caracterizado todas en *E. coli* (Brasen and Schonheit, *supra* (2004); Musfeldt and Schonheit, *supra* (2002)). Candidatos adicionales incluyen la succinil-CoA sintetasa codificada por *sucCD* en *E. coli* (Buck et al., *Biochemistry* 24:6245-6252 (1985)) y la acil-CoA ligasa de *Pseudomonas putida* (Fernandez-Valverde et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1149-1154 (1993)). Las proteínas ya mencionadas se tabulan a continuación.

Proteína	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
acs	AAC77039.1	1790505	*Escherichia coli*
acoE	AAA21945.1	141890	*Ralstonia eutropha*
acs1	ABC87079.1	86169671	*Methanothermobacter thermautotrophicus*
acs1	AAL23099.1	16422835	*Salmonella enterica*
ACS1	Q01574.2	257050994	*Saccharomyces cerevisiae*
AF1211	NP_070039.1	11498810	*Archaeoglobus fulgidus*
AF1983	NP_070807.1	11499565	*Archaeoglobus fulgidus*
scs	YP_135572.1	55377722	*Haloarcula marismortui*
PAE3250	NP_560604.1	18313937	*Pyrobaculum aerophilum* str. IM2
sucC	NP_415256.1	16128703	*Escherichia coli*
sucD	AAC73823.1	1786949	*Escherichia coli*

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
paaF	AAC24333.2	22711873	*Pseudomonas putida*

[0432] Los rendimientos de producto por C-mol de sustrato de células microbianas, que sintetizan productos de fermentación reducida tales como ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, están limitados por equivalentes reductores insuficientes en el material de alimentación carbohidrato. Equivalentes reductores, o electrones, pueden extraerse de componentes de gas síntesis, tales como CO y H_2 usando enzimas monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH) e hidrogenasa, respectivamente. Los equivalentes reductores se pasan entonces a aceptores tales como ferredoxinas oxidadas, quinonas oxidadas, citocromos oxidados, $NAD(P)^+$, agua, o peróxido de hidrógeno para formar ferredoxina reducida, quinonas reducidas, citocromos reducidos, NAD(P)H, H_2, o agua, respectivamente. Ferredoxina reducida y NAD(P)H son particularmente útiles, ya que pueden servir como portadores redox para varias enzimas de la vía de Wood-Ljungdahl y el ciclo de los TCA reductores.

[0433] Disponibilidad redox adicional de CO y/o H_2 puede mejorar los rendimientos de productos reducidos tales como ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. El rendimiento teórico máximo para producir ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato a partir de glucosa es 1,33 mol de MAA por mol de glucosa bajo condiciones aerobias mediante las vías divulgadas aquí:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 1{,}33\ C_4H_6O_2 + 0{,}67\ CO_2 + 2\ H_2O$$

[0434] Cuando se encuentran disponibles ambos materiales de alimentación de azúcar y gas de síntesis, los componentes del gas de síntesis CO y H_2 pueden utilizarse para generar equivalentes reductores empleando la hidrogenasa y la CO deshidrogenasa. Los equivalentes reductores generados de componentes de gas de síntesis se utilizarán para potenciar las vías de producción de glucosa a ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. Teóricamente, se conservarán todos los carbonos en la glucosa, teniendo así como resultado un rendimiento teórico máximo para producir ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato a partir de glucosa con 2 mol de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato por mol de glucosa bajo condiciones aerobias o anaerobias, como se describe aquí.

$$1\ C_6H_{12}O_6 + 2\ CO_2 + 6\ H_2 \rightarrow 2\ C_4H_6O_2 + 6\ H_2O$$

o

$$1\ C_6H_{12}O_6 + 2\ CO + 4\ H_2 \rightarrow 2\ C_4H_6O_2 + 4\ H_2O$$

[0435] Como se muestra en el ejemplo anterior, una estrategia de material de alimentación combinada, en la que gas de síntesis se combina con material de alimentación a base de azúcar u otro sustrato de carbono, puede mejorar en gran medida los rendimientos teóricos. En este enfoque de alimentación conjunta, componentes de gas de síntesis H_2 y CO pueden utilizarse por la hidrogenasa y CO deshidrogenasa para generar equivalentes reductores, que pueden usarse para potenciar las vías de producción química, en las cuales los carbonos de azúcar u otros sustratos de carbono se conservarán en un grado máximo y se mejorarán los rendimientos teóricos. En el caso de la producción de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato a partir de glucosa o azúcar, los rendimientos teóricos mejoran desde 1,33 mol de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato por mol de glucosa a 2 mol de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato por mol de glucosa. Tales mejoras aportan beneficios ecológicos y económicos e intensifican en gran medida la producción química sostenible.

[0436] Aquí se describen las enzimas y los correspondientes genes usados para extraer redox a partir de componentes de gas de síntesis. CODH es una enzima reversible que interconvierte CO y CO_2 a expensas o ganancia de electrones. El papel fisiológico natural de la CODH en complejos ACS/CODH es convertir CO_2 en CO para incorporación en acetil-CoA por acetil-CoA sintasa. No obstante, tales enzimas CODH son apropiadas para la extracción de equivalentes reductores de CO debido a la naturaleza reversible de tales enzimas. Expresar tales enzimas CODH en ausencia de ACS les permiten operar en la dirección opuesta a su papel fisiológico natural (es decir, oxidación de CO).

[0437] En *M. thermoacetica*, *C. hydrogenoformans*, *C. carboxidivorans P7*, y varios otros organismos, genes adicionales que codifican CODH se localizan por fuera de los operones ACS/CODH. Estas enzimas proporcionan un medio para extraer electrones (o equivalentes reductores) de la conversión de monóxido de carbono en dióxido de carbono. El gen *M. thermoacetica* (Número de Accesión a Genbank: YP_430813) se expresa por sí mismo en un operón y se cree que transfiere electrones de CO a un mediador externo como ferredoxina en una

reacción de "ping-pong". El mediador reducido se acopla entonces a otros portadores reducidos de fosfato de dinucleótidos adenina nicolinamida (NAD(P)H) o procesos celulares dependientes de ferredoxina (Ragsdale, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125: 129–136 (2008)). Los genes que codifican las CODH-II y CooF de *C. hydrogenoformans*, una proteína vecina, se clonaron y secuenciaron (Gonzalez and Robb, *FEMS Microbiol Lett.* 191:243-247 (2000)). El complejo resultante era ligado a membrana, aunque se demostró que fracciones citoplasmáticas de CODH-II catalizan la formación de NADPH, sugiriendo un papel anabólico (Svetlitchnyi et al., *J Bacteriol.* 183:5134-5144 (2001)). La estructura cristalina de la CODH-II se encuentra también disponible (Dobbek et al., *Science* 293:1281-1285 (2001)). Enzimas CODH similares libres de ACS pueden hallarse en un arreglo diverso de organismos que incluyen *Geobacter metallireducens* GS-15, *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266, *Clostridium cellulolyticum* H10, *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* cepa ATCC 27774, *Pelobacter carbinolicus* DSM 2380, y *Campylobacter curvus* 525.92.

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
CODH (putative)	YP_430813	83590804	*Moorella thermoacetica*
CODH-II (CooS-II)	YP_358957	78044574	*Carboxidothermus hydrogenoformans*
CooF	YP_358958	78045112	*Carboxidothermus hydrogenoformans*
CODH (putative)	ZP_05390164.1	255523193	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_0341	ZP_05390341.1	255523371	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_1756	ZP_05391756.1	255524806	*Clostridium carboxidivorans P7*
CcarbDRAFT_2944	ZP_05392944.1	255526020	*Clostridium carboxidivorans P7*
CODH	YP_384856.1	78223109	*Geobacter metallireducens GS-15*
Cpha266_0148 (cytochrome c)	YP_910642.1	119355998	*Chlorobium phaeobacteroides DSM 266*
Cpha266_0149	YP_910643.1	119355999	*Chlorobium*

(CODH)			*phaeobacteroides DSM 266.*
Ccel_0438	YP_002504800.1	220927891	*Clostridium cellulolyticum H10*
Ddes_0382 (CODH)	YP_002478973.1	220903661	*Desulfovibrio desulfuricans subsp. desulfuricans str. ATCC 27774*
Ddes_0381 (CooC)	YP_002478972.1	220903660	*Desulfovibrio desulfuricans subsp. desulfuricans str. ATCC 27774*
Pcar_0057 (CODH)	*YP_355490.1*	*7791767*	*Pelobacter carbinolicus DSM 2380*
Pcar_0058 (CooC)	*YP_355491.1*	*7791766*	*Pelobacter carbinolicus DSM 2380*
Pcar_0058 (HypA)	*YP_355492.1*	*7791765*	*Pelobacter carbinolicus DSM 2380*
CooS (CODH)	*YP_001407343.1*	*154175407*	*Campylobacter curvus 525.92*

[0438] En algunos casos, genes que codifican hidrogenasa se localizan adyacentes a una CODH. En *Rhodospirillum rubrum*, las proteínas CODH/hidrogenasa codificadas forman un complejo de enzimas ligadas a membrana que se ha indicado que es un sitio en el que se genera energía, en la forma de un gradiente de protones, a partir de la conversión de CO y H_2O en CO_2 y H_2 (Fox et al., *J Bacteriol.* 178:6200-6208 (1996)). La CODH-I de *C. hydrogenoformans* y sus genes adyacentes se han propuesto para catalizar un papel funcional similar, basado en su similitud con el grupo de genes de CODH/hidrogenasa de *R. rubrum* (Wu et al., *PLoS Genet.* 1:e65 (2005)). Se demostró igualmente que la CODH-I de *C. hydrogenoformans* exhibe actividades intensas de oxidación de CO y reducción de CO_2 cuando se vinculan a un electrodo (Parkin et al., *J Am.Chem.Soc.* 129:10328-10329 (2007)). Las secuencias proteicas de genes ejemplares de CODH e hidrogenasa pueden identificarse por los siguientes números de accesión a GenBank.

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
CODH-I (CooS-I)	YP_360644	78043418	*Carboxidothermus hydrogenoformans*
CooF	YP_360645	78044791	*Carboxidothermus hydrogenoformans*
HypA	YP_360646	78044340	*Carboxidothermus hydrogenoformans*
CooH	YP_360647	78043871	*Carboxidothermus hydrogenoformans*
CooU	YP_360648	78044023	*Carboxidothermus hydrogenoformans*
CooX	YP_360649	78043124	*Carboxidothermus hydrogenoformans*
CooL	YP_360650	78043938	*Carboxidothermus hydrogenoformans*
CooK	YP_360651	78044700	*Carboxidothermus hydrogenoformans*
CooM	YP_360652	78043942	*Carboxidothermus hydrogenoformans*
CooC	*YP_360654.1*	78043296	*Carboxidothermus hydrogenoformans*
CooA-1	YP_360655.1	78044021	*Carboxidothermus hydrogenoformans*
CooL	AAC45118	1515468	*Rhodospirillum rubrum*
CooX	AAC45119	1515469	*Rhodospirillum rubrum*
CooU	AAC45120	1515470	*Rhodospirillum rubrum*
CooH	AAC45121	1498746	*Rhodospirillum rubrum*
CooF	AAC45122	1498747	*Rhodospirillum rubrum*
CODH (CooS)	AAC45123	1498748	*Rhodospirillum rubrum*
CooC	AAC45124	1498749	*Rhodospirillum rubrum*
CooT	AAC45125	1498750	*Rhodospirillum rubrum*
CooJ	AAC45126	1498751	*Rhodospirillum rubrum*

[0439] Nativos a *E. coli* y otras bacterias entéricas son múltiples genes que codifican hasta cuatro hidrogenasas (Sawers, G., *Antonie Van Leeuwenhoek* 66:57-88 (1994); Sawers et al., *J Bacteriol.* 164:1324-1331 (1985); Sawers and Boxer, *Eur.J Biochem.* 156:265-275 (1986); Sawers et al., *J Bacteriol.* 168:398-404 (1986)). Dada la multiplicidad de actividades enzimáticas, *E. coli* u otro organismo hospedero puede proporcionar suficiente actividad hidrogenasa para dividir el hidrógeno molecular entrante y reducir el aceptor correspondiente. *E. coli* posee dos hidrogenasas de captación, Hyd-1 y Hyd-2, codificadas por los grupos de genes *hyaABCDEF* y *hybOABCDEFG*, respectivamente (Lukey et al., How E. coli is equipped to oxidize hydrogen under different redox conditions, *J Biol Chem* published online Nov 16, 2009). Hyd-1 es tolerante a oxígeno, irreversible, y se acopla a la reducción de quinona mediante el citocromo *hyaC*. Hyd-2 es sensible a O_2, reversible, y transfiere electrones a *hybA* de la ferredoxina periplasmática la cual, a su vez, reduce una quinona mediante la proteína de membrana integral *hybB*. Quinonas reducidas pueden servir como la fuente de electrones para fumarato reductasa en la rama reductora del ciclo de los TCA. Ferredoxinas reducidas pueden usarse por enzimas tales como NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasas para generar NADPH o NADH. Alternativamente pueden emplearse como donadores de electrones para reacciones tales como piruvato ferredoxina oxidorreductasa, AKG ferredoxina oxidorreductasa, y 5,10-metileno-H4folato reductasa.

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
HyaA	AAC74057.1	1787206	*Escherichia coli*
HyaB	AAC74058.1	1787207	*Escherichia coli*
HyaC	AAC74059.1	1787208	*Escherichia coli*
HyaD	AAC74060.1	1787209	*Escherichia coli*
HyaE	AAC74061.1	1787210	*Escherichia coli*
HyaF	AAC74062.1	1787211	*Escherichia coli*

Protein	ID GenBank	Número GI	Organism
HybO	AAC76033.1	1789371	*Escherichia coli*
HybA	AAC76032.1	1789370	*Escherichia coli*
HybB	AAC76031.1	2367183	*Escherichia coli*
HybC	AAC76030.1	1789368	*Escherichia coli*
HybD	AAC76029.1	1789367	*Escherichia coli*

HybE	AAC76028.1	1789366	*Escherichia coli*
HybF	AAC76027.1	1789365	*Escherichia coli*
HybG	AAC76026.1	1789364	*Escherichia coli*

[0440] Los sistemas hidrógeno-liasa de *E. coli* incluyen hidrogenasa 3, un complejo de enzimas ligadas a membrana que utiliza ferredoxina como aceptor, e hidrogenasa 4 que usa igualmente un aceptor ferredoxina. Hidrogenasa 3 y 4 se codifican por lo grupos de genes *hyc* y *hyf*, respectivamente. Se ha demostrado que la hidrogenasa 3 es una enzima reversible (Maeda et al., *Appl Microbiol Biotechnol* 76(5):1035-42 (2007)). La actividad hidrogenasa en *E. coli* es también dependiente de la expresión de los genes *hyp*, cuyas correspondientes proteínas se encuentran involucradas en el ensamblaje de los complejos hidrogenasa (Jacobi et al., *Arch.Microbiol* 158:444-451 (1992); Rangarajan et al., *J. Bacteriol.* 190:1447-1458 (2008)).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
HycA	NP_417205	16130632	*Escherichia coli*
HycB	NP_417204	16130631	*Escherichia coli*
HycC	NP_417203	16130630	*Escherichia coli*
HycD	NP_417202	16130629	*Escherichia coli*
HycE	NP_417201	16130628	*Escherichia coli*
HycF	NP_417200	16130627	*Escherichia coli*
HycG	NP_417199	16130626	*Escherichia coli*
HycH	NP_417198	16130625	*Escherichia coli*
HycI	NP_417197	16130624	*Escherichia coli*

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
HyfA	NP_416976	90111444	*Escherichia coli*
HyfB	NP_416977	16130407	*Escherichia coli*
HyfC	NP_416978	90111445	*Escherichia coli*
HyfD	NP_416979	16130409	*Escherichia coli*
HyfE	NP_416980	16130410	*Escherichia coli*
HyfF	NP_416981	16130411	*Escherichia coli*
HyfG	NP_416982	16130412	*Escherichia coli*
HyfH	NP_416983	16130413	*Escherichia coli*
HyfI	NP_416984	16130414	*Escherichia coli*

HyfJ	NP_416985	90111446	*Escherichia coli*
HyfR	NP_416986	90111447	*Escherichia coli*

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
HypA	NP_417206	16130633	*Escherichia coli*
HypB	NP_417207	16130634	*Escherichia coli*
HypC	NP_417208	16130635	*Escherichia coli*
HypD	NP_417209	16130636	*Escherichia coli*
HypE	NP_417210	226524740	*Escherichia coli*
HypF	NP_417192	16130619	*Escherichia coli*

[0441] Las hidrogenasas de *M. thermoacetica* son apropiadas para un hospedero que carece de actividad endógena suficiente. *M. thermoacetica* puede crecer sin CO_2 como la fuente exclusiva de carbono, indicando que equivalentes reductores se extraen de H_2 para posibilitar la síntesis de acetil-CoA mediante la vía de Wood-Ljungdahl (Drake, H. L., *J. Bacteriol.* 150:702-709 (1982); Drake and Daniel, *Res. Microbiol.* 155:869-883 (2004); Kellum and Drake, *J. Bacteriol.* 160:466-469 (1984)) (véase Figuras 12 y 13). *M. thermoacetica* tiene homólogos a varios genes *hyp*, *hyc*, y *hyf* de *E. coli*. Las secuencias proteicas codificadas por estos genes se identifican por los siguientes números de accesión a GenBank.

[0442] Proteínas en *M. thermoacetica* cuyos genes son homólogos a los genes *hyp* de *E. coli* se muestran a continuación.

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
Moth_2175	YP_431007	83590998	*Moorella thermoacetica*
Moth_2176	YP_431008	83590999	*Moorella thermoacetica*
Moth_2177	YP_431009	83591000	*Moorella thermoacetica*
Moth_2178	YP_431010	83591001	*Moorella thermoacetica*
Moth_2179	YP_431011	83591002	*Moorella thermoacetica*
Moth_2180	YP_431012	83591003	*Moorella thermoacetica*

Moth_2181	YP_431013	83591004	*Moorella thermoacetica*

[0443] Proteínas en *M. thermoacetica* que son homólogas a las proteínas hidrogenasa 3 y/o 4 de *E. coli* se enumeran a continuación.

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
Moth_2182	YP_431014	83591005	*Moorella thermoacetica*
Moth_2183	YP_431015	83591006	*Moorella thermoacetica*
Moth_2184	YP_431016	83591007	*Moorella thermoacetica*
Moth_2185	YP_431017	83591008	*Moorella thermoacetica*
Moth_2186	YP_431018	83591009	*Moorella thermoacetica*
Moth_2187	YP_431019	83591010	*Moorella thermoacetica*
Moth_2188	YP_431020	83591011	*Moorella thermoacetica*
Moth_2189	YP_431021	83591012	*Moorella thermoacetica*
Moth_2190	YP_431022	83591013	*Moorella thermoacetica*
Moth_2191	YP_431023	83591014	*Moorella thermoacetica*
Moth_2192	YP_431024	83591015	*Moorella thermoacetica*

[0444] Adicionalmente, varios grupos de genes que codifican funcionalidad hidrogenasa están presentes en *M. thermoacetica*, y sus correspondientes secuencias proteicas se señalan a continuación.

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
Moth_0439	YP_429313	83589304	*Moorella thermoacetica*
Moth_0440	YP_429314	83589305	*Moorella thermoacetica*
Moth_0441	YP_429315	83589306	*Moorella thermoacetica*

Moth_0442	YP_429316	83589307	*Moorella thermoacetica*
Moth_0809	YP_429670	83589661	*Moorella thermoacetica*
Moth_0810	YP_429671	83589662	*Moorella thermoacetica*
Moth_0811	YP_429672	83589663	*Moorella thermoacetica*
Moth_0812	YP_429673	83589664	*Moorella thermoacetica*
Moth_0814	YP_429674	83589665	*Moorella thermoacetica*
Moth_0815	YP_429675	83589666	*Moorella thermoacetica*
Moth_0816	YP_429676	83589667	*Moorella thermoacetica*
Moth_1193	YP_430050	83590041	*Moorella thermoacetica*
Moth_1194	YP_430051	83590042	*Moorella thermoacetica*
Moth_1195	YP_430052	83590043	*Moorella thermoacetica*
Moth_1196	YP_430053	83590044	*Moorella thermoacetica*
Moth_1717	YP_430562	83590553	*Moorella thermoacetica*
Moth_1718	YP_430563	83590554	*Moorella thermoacetica*
Moth_1719	YP_430564	83590555	*Moorella thermoacetica*
Moth_1883	YP_430726	83590717	*Moorella thermoacetica*
Moth_1884	YP_430727	83590718	*Moorella thermoacetica*
Moth_1885	YP_430728	83590719	*Moorella thermoacetica*
Moth_1886	YP_430729	83590720	*Moorella thermoacetica*
Moth_1887	YP_430730	83590721	*Moorella thermoacetica*
Moth_1888	YP_430731	83590722	*Moorella thermoacetica*
Moth_1452	YP_430305	83590296	*Moorella thermoacetica*
Moth_1453	YP_430306	83590297	*Moorella thermoacetica*
Moth_1454	YP_430307	83590298	*Moorella thermoacetica*

[0445] *Ralstonia eutropha* H16 usa hidrógeno como fuente de energía con oxígeno como aceptor de electrones terminales. Su [NiFe]-hidrogenasa de captación ligada a membrana es una hidrogenasa "tolerante a O_2" (Cracknell, et al. Proc Nat Acad Sci, 106(49) 20681-20686 (2009)), que está periplasmáticamente orientada y conectada a la cadena respiratoria mediante un citocromo tipo b (Schink and Schlegel, *Biochim. Biophys. Acta*, 567, 315-324 (1979); Bernhard et al., *Eur. J. Biochem.* 248, 179–186 (1997)). *R. eutropha* contiene asimismo una hidrogenasa soluble, tolerante a O_2, codificada por el operón *Hox*, el cual es citoplasmático y reduce directamente NAD+ a expensas de hidrógeno (Schneider and Schlegel, *Biochim. Biophys. Acta* 452, 66–80 (1976);

Burgdorf, *J. Bact.* 187(9) 3122-3132(2005)). Enzimas hidrogenasas solubles están adicionalmente presentes en varios otros organismos incluyendo *Geobacter sulfurreducens* (Coppi, *Microbiology* 151, 1239–1254 (2005)), *Synechocystis* cepa PCC 6803 (Germer, *J. Biol. Chem.*, 284(52), 36462–36472 (2009)), y *Thiocapsa roseopersicina* (Rakhely, *Appl. Environ. Microbiol.* 70(2) 722–728 (2004)). La enzima de *Synechocystis* es capaz de generar NADPH a partir de hidrógeno. La sobreexpresión de ambos, el operón *Hox* de *Synechocystis* cepa PCC 6803 y los genes accesorios codificados por el operón *Hyp* de *Nostoc* sp. PCC 7120, llevaron a una actividad hidrogenasa incrementada, comparada con la expresión de los genes únicamente (Germer, *J. Biol. Chem.* 284(52), 36462–36472 (2009)).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
HoxF	NP_942727.1	38637753	*Ralstonia eutropha H16*
HoxU	NP_942728.1	38637754	*Ralstonia eutropha H16*
HoxY	NP_942729.1	38637755	*Ralstonia eutropha H16*
HoxH	NP_942730.1	38637756	*Ralstonia eutropha H16*
HoxW	NP_942731.1	38637757	*Ralstonia eutropha H16*
HoxI	NP_942732.1	38637758	*Ralstonia eutropha H16*
HoxE	NP_953767.1	*39997816*	*Geobacter sulfurreducens*
HoxF	NP_953766.1	*39997815*	*Geobacter sulfurreducens*
HoxU	NP_953765.1	*39997814*	*Geobacter sulfurreducens*
HoxY	NP_953764.1	*39997813*	*Geobacter sulfurreducens*
HoxH	NP_953763.1	*39997812*	*Geobacter sulfurreducens*
GSU2717	NP_953762.1	*39997811*	*Geobacter sulfurreducens*

HoxE	NP_441418.1	16330690	*Synechocystis* cepa PCC 6803
HoxF	NP_441417.1	16330689	*Synechocystis* cepa PCC 6803
Función desconocida	NP_441416.1	16330688	*Synechocystis* str. PCC 6803
HoxU	NP_441415.1	16330687	*Synechocystis* str. PCC 6803
HoxY	NP_441414.1	16330686	*Synechocystis* cepa PCC 6803
Función desconocida	NP_441413.1	16330685	*Synechocystis* cepa PCC 6803
Función desconocida	NP_441412.1	16330684	*Synechocystis* cepa PCC 6803
HoxH	NP_441411.1	16330683	*Synechocystis* cepa PCC 6803
HypF	NP_484737.1	17228189	*Nostoc* sp. PCC 7120
HypC	NP_484738.1	17228190	*Nostoc* sp. PCC 7120
HypD	NP_484739.1	17228191	*Nostoc* sp. PCC 7120
Función desconocida	NP_484740.1	17228192	*Nostoc* sp. PCC 7120
HypE	NP_484741.1	17228193	*Nostoc* sp. PCC 7120
HypA	NP_484742.1	17228194	*Nostoc* sp. PCC 7120
HypB	NP_484743.1	17228195	*Nostoc* sp. PCC 7120
Hox1E	AAP50519.1	37787351	*Thiocapsa roseopersicina*
Hox1F	AAP50520.1	37787352	*Thiocapsa roseopersicina*
Hox1U	AAP50521.1	37787353	*Thiocapsa roseopersicina*
Hox1Y	AAP50522.1	37787354	*Thiocapsa roseopersicina*
Hox1H	AAP50523.1	37787355	*Thiocapsa roseopersicina*

[0446] Varias enzimas y los correspondientes genes usados para fijar dióxido de carbono a piruvato o fosfoenolpiruvato para formar los intermediarios del ciclo de los TCA, oxaloacetato o malato se describen a continuación.

[0447] La carboxilación de fosfoenolpiruvato a oxaloacetato se cataliza por fosfoenolpiruvato carboxilasa. Enzimas PEP carboxilasa ejemplares se codifican por *ppc* en *E. coli* (Kai et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 414:170-179 (2003), *ppcA* en *Metilobacterium extorquens AM1* (Arps et al., *J. Bacteriol.* 175:3776-3783 (1993), y *ppc* en *Corynebacterium glutamicum* (Eikmanns et al., *Mol. Gen. Genet.* 218:330-339 (1989).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
Ppc	NP_418391	16131794	*Escherichia coli*
ppcA	AAB58883	28572162	*Metilobacterium extorquens*
Ppc	ABB53270	80973080	*Corynebacterium glutamicum*

[0448] Una enzima alternativa para convertir fosfoenolpiruvato en oxaloacetato es PEP carboxicinasa, que forma simultáneamente una ATP, carboxilando al mismo tiempo PEP. En la mayoría de los organismos la PEP carboxicinasa desempeña una función gluconeogénica y convierte oxaloacetato en PEP a expensas de una ATP. *S. cerevisiae* es un organismo tal cuya PEP carboxicinasa nativa, *PCK1*, desempeña un papel gluconeogénico (Valdes-Hevia et al., *FEBS Lett.* 258:313-316 (1989). *E. coli* es otro organismo tal, ya que se cree que el papel de PEP carboxicinasa en producir oxaloacetato es menor cuando se compara con la PEP carboxilasa, la cual no forma ATP, posiblemente debido a la K_m más alta para bicarbonato de PEP carboxicinasa (Kim et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1238-1241 (2004)). No obstante, la actividad de la PEP carboxicinasa nativa de *E. coli* de PEP hacia oxaloacetato se ha demostrado recientemente en mutantes *ppc* de *E. coli* K-12 (Kwon et al., *J. Microbiol. Biotechnol.* 16:1448-1452 (2006)). Estas cepas no exhibieron defectos de crecimiento y tuvieron una producción cada vez mayor de succinato en concentraciones altas de $NaHCO_3$. Cepas mutantes de *E. coli* pueden adoptar Pck como la enzima dominante, fijadora de CO_2, siguiendo la evolución adaptativa (Zhang et al. 2009). En algunos organismos, particularmente bacterias del primer estómago de los rumiantes, la PEP carboxicinasa es muy eficiente en producir oxaloacetato a partir de PEP y generar ATP. Ejemplos de genes de PEP carboxicinasa que se han clonado en *E. coli* incluyen los de *Mannheimia succiniciproducens* (Lee et al., *Biotechnol. Bioprocess*

Eng. 7:95-99 (2002)), *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (Laivenieks et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2273-2280 (1997), y *Actinobacillus succinogenes* (Kim et al. *supra*). La enzima PEP carboxicinasa codificada por *Haemophilus influenza* es efectiva en formar oxaloacetato a partir de PEP.

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
PCK1	NP_013023	6322950	*Saccharomyces cerevisiae*
pck	NP_417862.1	16131280	*Escherichia coli*
pckA	YP_089485.1	52426348	*Mannheimia succiniciproducens*
pckA	O09460.1	3122621	*Anaerobiospirillum succiniciproducens*
pckA	Q6W6X5	75440571	*Actinobacillus succinogenes*
pckA	P43923.1	1172573	*Haemophilus influenza*

[0449] Piruvato carboxilasa (EC 6.4.1.1) convierte directamente piruvato en oxaloacetato a expensas de una ATP. Las enzimas piruvato carboxilasas se codifican por *PYC1* (Walker et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176:1210-1217 (1991) y *PYC2* (Walker et al., *supra*) en *Saccharomyces cerevisiae*, y *pyc* en *Mycobacterium smegmatis* (Mukhopadhyay and Purwantini, *Biochim. Biophys. Acta* 1475:191-206 (2000)).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
PYC1	NP_011453	6321376	*Saccharomyces cerevisiae*
PYC2	NP_009777	6319695	*Saccharomyces cerevisiae*
Pyc	YP_890857.1	118470447	*Mycobacterium smegmatis*

[0450] La enzima málica puede aplicarse para convertir CO_2 y piruvato en malato a expensas de un equivalente reductor. Las enzimas málicas para este propósito pueden incluir, sin limitación, la enzima málica (dependiente de NAD) y la enzima málica (dependiente de NADP). Por ejemplo, una de las enzimas málicas de *E. coli* (Takeo, *J. Biochem.* 66:379-387 (1969)) o una enzima similar con actividad más elevada puede expresarse para posibilitar la conversión de piruvato y CO_2 en malato. Fijando carbono a piruvato, por oposición a PEP, la enzima málica permite conservar el enlace fosfato de alta energía de PEP por piruvato cinasa, con lo cual se genera ATP en la formación de piruvato o por el sistema de fosfotransferasa para el transporte de glucosa. Aunque por lo general

se asume que las enzimas málicas operan en la dirección de la formación de piruvato a partir de malato, se ha demostrado que la sobreexpresión de la enzima dependiente de NAD, codificada por maeA, aumenta la producción de succinato en *E. coli*, restaurando al mismo tiempo el fenotipo □pfl-□ldhA letal bajo condiciones anaerobias, operando en la dirección de fijación de carbono (Stols and Donnelly, *Appl. Environ. Microbiol.* 63(7) 2695-2701 (1997)). Una observación similar se hizo luego de sobreexpresar la enzima málica de *Ascaris suum* en *E. coli* (Stols et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65(1), 153-158 (1997)). La segunda enzima málica de *E. coli*, codificada por *maeB*, es dependiente de NADP y descarboxila también oxaloacetato y otros alfa-cetoácidos (Iwakura et al., *J. Biochem.* 85(5):1355-65 (1979)).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
maeA	NP_415996	90111281	*Escherichia coli*
maeB	NP_416958	16130388	*Escherichia coli*
NAD-ME	P27443	126732	*Ascaris suum*

[0451] Las enzimas usadas para convertir oxaloacetato (formado a partir, por ejemplo, de PEP carboxilasa, PEP carboxicinasa, o piruvato carboxilasa) o malato (formado a partir, por ejemplo, de enzima málica o malato deshidrogenasa) en succinil-CoA mediante la rama reductora del ciclo de los TCA son malato deshidrogenasa, fumarato deshidratasa (fumarasa), fumarato reductasa, y succinil-CoA transferasa. Los genes para cada una de las enzimas se describen aquí más arriba.

[0452] Enzimas, genes y métodos para generar mediante ingeniería genética vías de succinil-CoA a varios productos en un microorganismo se conocen ahora en el arte. Los equivalentes reductores adicionales obtenidos de CO y/o H_2, como se divulga aquí, mejoran los rendimientos de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato cuando se utiliza material de alimentación a base de carbohidrato. Por ejemplo, ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato pueden producirse a partir de succinil-CoA (véase Figuras). Enzimas ejemplares para la conversión de succinil-CoA en ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato incluyen las enzimas divulgadas aquí.

[0453] Enzimas, genes y métodos para generar mediante ingeniería genética vías de intermediarios de glicólisis a varios productos en un microorganismo son

conocidos en el arte. Los equivalentes reductores adicionales obtenidos de CO y H_2, como se describe aquí, mejoran los rendimientos de todos estos productos en carbohidratos. Por ejemplo, ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato pueden producirse del intermediario de glicólisis, succinato. Enzimas ejemplares para la conversión de succinato en MAA incluyen succinil-CoA transferasa, succinil-CoA sintetasa, succinil-CoA reductasa (formadora de aldehído) , 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, 4-hidroxibutirato cinasa, fosfotrans-4-hidroxibutirilasa, succinato reductasa, succinil-CoA reductasa (formadora de alcohol), 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa, 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa, 3-hidroxiisobutirato deshidratasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, metacrilil-CoA sintetasa, metacrilil-CoA transferasa y metacrilil-CoA hidrolasa.

EJEMPLO XVI

Métodos para Manejar CO y Cultivos Anaerobios

[0454] Este ejemplo describe métodos usados en manejar CO y cultivos anaerobios.

[0455] A. Manejo de CO en pequeñas cantidades para análisis y cultivos pequeños. CO es un gas inodoro, incoloro e insípido, venenoso. En consecuencia, cultivos y análisis que utilizaban CO requerían un manejo especial. Varios análisis, incluyendo la oxidación de CO, la síntesis de acetil-CoA, la concentración de CO usando mioglobina, y tolerancia/utilización de CO en cultivos de lotes pequeños, exigían que se dispensaran y manejaran pequeñas cantidades del gas CO en una capucha de humos. Análisis bioquímicos exigían saturar cantidades muy pequeñas (<2 mL) del medio de análisis bioquímico o amortiguador con CO y luego realizar el análisis. La totalidad de estos pasos de manejo de CO se llevaron a cabo en una capucha de humos con el equipo de bastidor (*the sash set*) a la altura apropiada y con el ventilador prendido; se dispensó CO de un cilindro de gas comprimido y el regulador se conectó a una línea de Schlenk. Esta última garantiza que se dispensen concentraciones iguales de CO a cada uno de varios posibles tubos o viales. La línea Schlenk se instaló con un lavador de oxígeno en el lado de entrada y un generador de burbujas de liberación de presión y ventilación en el otro lado. Tubos de ensayo eran anaerobios y contenían CO. En consecuencia, los tubos de ensayo de sellaron herméticamente con un tapón de goma y se agregaron reactivos o se extrajeron usando agujas y jeringas a prueba de gas. En segundo lugar, se criaron pequeños cultivos (~50 mL) saturando CO

en frascos de suero taponados herméticamente. Al igual que con los análisis bioquímicos, los cultivos microbianos saturados con CO se equilibraron en la capucha de humos usando la disposición de la línea de Schlenk. Tanto los análisis bioquímicos como los cultivos microbianos estaban en recipientes portátiles, sellados, y en pequeños volúmenes, que contribuían a un manejo seguro de la capucha de humos. El tanque de CO comprimido se hallaba adyacente a la capucha de humos.

[0456] Normalmente, se utiliza una línea de Schlenk para dispensar CO a tubos, cada uno ventilado. Los tapones de goma en los tubos se perforaron con agujas de jeringas desechables, calibre 19 o 20, y se ventilaron con las mismas. Se empleó un generador de burbujas de aceite con un tanque de CO y un lavador de oxígeno. Los tubos de vidrio o cuarzo del espectrofotómetro tienen un orificio circular en la parte superior, en la cual se ajustó un tapón cilíndrico Kontes, Sz7 774250-0007. La unidad detectora de CO se ubicó próxima a la capucha de humos.

[0457] B. Manejo de CO en cantidades más grandes alimentado a cultivos a gran escala. A cultivos de fermentación se alimentan CO o una mezcla de CO y H_2 para simular gas de síntesis como material de alimentación en producción fermentativa. Por consiguiente, cantidades de células que varían desde 1 litro a varios litros pueden incluir la adición de gas CO para aumentar la concentración disuelta de CO en el medio. En estas circunstancias, cantidades bastante grandes y administradas continuamente de gas CO se agregan a los cultivos. En diferentes puntos, los cultivos se cosechan o se extraen muestras. Alternativamente, se cosechan células con una centrífuga de flujo continuo integrado, que es parte del fermentador.

[0458] Los procesos fermentativos se llevan a cabo bajo condiciones anaerobias. En algunos casos, es antieconómico bombear oxígeno o aire a los fermentadores para asegurar una saturación adecuada de oxígeno, con el fin de ofrecer un ambiente respiratorio. Adicionalmente, la potencia reductora generada durante la fermentación anaerobia puede ser necesaria en la formación de producto en lugar de la respiración. Por lo demás, muchas de las enzimas para varias vías son sensibles a oxígeno en grados variables. Acetógenos clásicos tales como *M. thermoacetica* son anaerobios obligados, y las enzimas en la vía Wood-Ljungdahl son altamente sensibles a inactivación irreversible por oxígeno molecular. Aunque existen acetógenos tolerantes a oxígeno, el repertorio de enzimas en la vía de Wood-Ljungdahl podría ser incompatible en la presencia de

oxígeno, porque la mayoría son metalo-enzimas, los componentes claves son ferredoxinas, y la regulación puede desviar el metabolismo de la vía de Wood-Ljungdahl para maximizar la adquisición de energía. Al mismo tiempo, células en el cultivo actúan como secuestrantes de oxígeno que moderan la necesidad de medidas extremas en la presencia de un crecimiento celular excesivo.

[0459] C. Cámara anaerobia y condiciones. Cámaras anaerobias ejemplares se encuentran disponibles en el comercio (véase, por ejemplo, Vacuum Atmospheres Company, Hawthorne CA; MBraun, Newburyport MA). Las condiciones incluían una concentración de O_2 de 1 ppm, o menos, y 1 atm de N_2 puro. En un ejemplo, se utilizaron 3 lavadores de oxígeno/regeneradores de catalizador, y la cámara incluía un electrodo de O_2 (tal como Teledyne; City of Industry CA). Casi todas las unidades y reactivos se alternaron cuatro veces en la esclusa de aire de la cámara antes de abrir la puerta de la cámara interna. Reactivos con un volumen > 5mL se rociaron con N_2 puro antes de la introducción en la cámara. Los guantes se cambian dos veces/año y los recipientes de catalizador se regeneraron periódicamente cuando la cámara presentaba una respuesta crecientemente lenta a cambios en los niveles de oxígeno. La presión de la cámara se controló mediante válvulas de una vía, activadas por solenoides. Esta característica permitió ajustar la presión de la cámara a un nivel mayor que los alrededores para permitir la transferencia de tubos muy pequeños a través de la válvula de purga.

[0460] Las cámaras anaerobias alcanzaron niveles de O_2 que fueron consistentemente muy bajos y se necesitaban para condiciones anaerobias altamente sensibles al oxígeno. No obstante, el crecimiento y manejo de células usualmente no requiere tales precauciones. En una configuración de cámara anaerobia alternativa, puede usarse platino o paladio como catalizador que requiere algo de gas de hidrógeno en la mezcla. En lugar de usar válvulas solenoides, la liberación de presión puede controlarse por un generador de burbujas. En lugar de usar monitoreo de O_2 basado en instrumentos, pueden utilizarse tiras de prueba.

[0461] D. Microbiología anaerobia. Se manejaron cultivos pequeños, como ya se describió, para el manejo de CO. En particular, frascos de suero o medio se tapan con tapones de goma y se emplean tapas de aluminio rizadas hacia adentro para sellar el frasco. El medio, tal como medio nutritivamente rico para el cultivo de bacterias (*Terrific Broth*), se prepara en una manera convencional y se dispensa a un frasco de suero de tamaño apropiado. Los frascos se rocían con nitrógeno durante ~30 minutos de burbujeo moderado. Esto elimina la mayor parte del

oxígeno del medio y, luego de este paso, cada frasco se tapa con un tapón de goma (tal como tapones tabicados de 20 mm Bellco; Bellco, Vineland, NJ) y se sella con tapas rizadas hacia adentro (Bellco 20 mm). A continuación los frascos se esterilizan en una autoclave empleando un ciclo de escape (líquido) lento. Por lo menos algunas veces puede empujarse suavemente una aguja a través del tapón para proporcionar un escape durante la esterilización en la autoclave; la aguja necesita retirarse inmediatamente después de la extracción de la autoclave. Los componentes restantes se agregan al medio, por ejemplo, amortiguador o antibióticos, mediante jeringa y aguja. Antes de la adición de agentes reductores, los frascos se equilibran durante 30 - 60 minutos con nitrógeno (o CO, dependiendo del uso). Se agrega un agente reductor tal como 100 x 150 mM de sulfuro de sodio, 200 mM de HCl de cisteína. Esto se hace pesando el sulfuro de sodio en un vaso de pico, seco, y la cisteína en un frasco de suero, poniendo ambos en la cámara anaerobia, disolviendo el sulfuro de sodio en agua anaerobia, agregando luego esta a la cisteína en el frasco de suero. El frasco se tapona inmediatamente, ya que la solución de sulfuro de sodio genera gas de sulfuro de hidrógeno al contacto con la cisteína. Cuando se inyecta al cultivo, se usa un filtro de jeringa para esterilizar la solución. Se agregan otros componentes mediante agujas de jeringa, tales como B12 (10 □M cianocobalamina), cloruro de níquel ($NiCl_2$, 20 microM de concentración final de 40 mM de solución concentrada en agua anaerobia en la cámara y se esteriliza en la autoclave o usando un filtro de jeringa luego de la inyección al cultivo), y sulfato de amonio ferroso (la concentración final necesaria es 100 □M — elaborada como solución concentrada 100-1000x en agua anaerobia en la cámara y esterilizada en la autoclave, o empleando un filtro de jeringa luego de la inyección en el cultivo). Para facilitar un crecimiento más rápido bajo condiciones anaerobias, los frascos de 1 litro se inocularon con 50 mL de un pre-cultivo desarrollado anaerobiamente. La inducción del promotor pA1-lacO1 en los vectores se realizó por la adición de isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) a una concentración final de 0,2 mM y se llevó a cabo durante alrededor de 3 horas.

[0462] Grandes cultivos pueden criarse en frascos de mayor tamaño usando adición continua de gas con generación simultánea de burbujas. Un tapón de goma con un generador metálico de burbujas se pone en el frasco luego de la adición del medio y se rocía con nitrógeno durante 30 minutos o más antes de preparar el resto del frasco. Cada frasco se organiza de manera que un filtro estéril esterilice el gas burbujeado, y las mangueras en los frascos pueden

comprimirse con pequeñas pinzas en forma de C. El medio y las células se agitan con barras agitadoras magnéticas. Una vez se añaden todos los componentes del medio y las células, los frascos se incuban en un incubador en un cuarto sin aire, pero con rociado continuo de nitrógeno a los frascos.

EJEMPLO XVIII

Análisis (CODH) de Oxidación de CO

[0463] Este ejemplo describe métodos de análisis para medir la oxidación de CO (CO deshidrogenasa; CODH).

[0464] El operón CODH/ACS del gen 7 de *Moorella thermoacetica* se clonó en vectores de expresión de *E. coli*. El fragmento de ADN intacto de ~10 kbp se clonó, y es probable que algunos de los genes en esta región se expresen a partir de sus propios promotores endógenos y contengan todos sitios de unión ribosómica endógena. Estos clones se analizaron con respecto a oxidación de CO, usando un análisis que cuantitativamente mide la actividad CODH. Antisueros contra los productos de los genes de *M. thermoacetica* se usaron para los *Western blots* para calcular la actividad específica. *M. thermoacetica* es gram positiva, y se espera que elementos del sitio de unión ribosómicos funcionen bien en *E. coli*. Se calculó que esta actividad, descrita con más detalle a continuación, es ~1/50th de la actividad específica de *M. thermoacetica*. Es posible que la actividad CODH de células recombinantes de *E. coli* pueda estar limitada por el hecho de que enzimas de *M. thermoacetica* tienen óptimos de temperatura de alrededor de 55°C. En consecuencia, una vía CODH/ACS mesófila podría ser ventajosa tal como la especie cercana de *Moorella*, que es mesófila y tiene un operón CODH/ACS aparentemente intacto y una vía de Wood-Ljungdahl, *Desulfitobacterium hafniense*. Acetógenos como organismos hospederos potenciales incluyen, pero no se limitan a, *Rhodospirillum rubrum, Moorella thermoacetica* y *Desulfitobacterium hafniense.*

[0465] La oxidación de CO es el más sensible y más robusto de los análisis de CODH/ACS. Es probable que un sistema que utiliza gas de síntesis, basado en *E. coli*, necesite en última instancia ser tan anaerobio como los sistemas *Clostridial* (es decir, *Moorella*), especialmente para actividad máxima. Una mejora en CODH debe ser posible pero estará limitada en última instancia por la solubilidad de gas CO en agua.

[0466] Inicialmente, cada uno de los genes se clonó individualmente en vectores de expresión. Se generaron unidades de expresión combinada para múltiples subunidades/1 complejo. Se determinó la expresión en *E. coli* en el nivel

de proteína. Se elaboraron los dos operones CODH/ACS combinados de *M. thermoacetica* y los clones de expresión individual.

[0467] Análisis de oxidación de CO. Este análisis es uno de los análisis más sencillos, confiables y más versátiles de actividades enzimáticas en la vía de Wood-Ljungdahl y examina la CODH (Seravalli et al., *Biochemistry* 43:3944-3955 (2004)). Una actividad típica CODH específica de *M. thermoacetica* es 500 U a 55°C o ~60U a 25°C. Este ensayo emplea la reducción de metil viológeno en la presencia de CO. Este se mide a 578 nm en tubos de vidrio anaerobios, con tapones.

[0468] En más detalle, tubos de vidrio con tapones de goma se prepararon después de lavar primero los tubos cuatro veces en agua desionizada y una vez con acetona. Una pequeña cantidad de grasa de vacío se untó en la cara superior de la empaquetadura de goma. El tubo se gasificó con CO, se secó 10 minutos con una aguja calibre 22 más una aguja de escape. Se agregó un volumen de 0,98 mL de amortiguador de reacción (50 mM Hepes, pH 8.5, 2mM ditiotreitol (DTT) usando una aguja calibre 22, con un escape, y 100% CO. Una solución concentrada de metil viológeno (CH_3 viológeo) era 1 M en agua. Cada análisis utilizó 20 microlitros para 20 mM de concentración final. Cuando se agregó metil viológeno, se empleó una aguja calibre 18 (parcial) usada como una camisa para facilitar el uso de una jeringa Hamilton para extraer el CH_3 viológeno. Se tomaron 4 -5 alícuotas y se descartaron para lavar y equilibrar la jeringa con gas. Se agregó una pequeña cantidad de ditionita de sodio (0,1 M de solución concentrada) cuando se elaboraba la solución concentrada de CH_3 viológeno para reducir ligeramente el CH_3 viológeno. Se equilibró la temperatura a 55°C en un espectrofotómetro Olis calentado (Bogart GA). Se ejecutó primero una reacción blanco (CH_3 viológeno + amortiguador) para medir la tasa base de la reducción de CH_3 viológeno. Extractos celulares crudos de *E. coli* de ACS90 y ACS91 (operón CODH-ACS de *M. thermoacetica* con y sin, respectivamente, el primer *cooC*). Se agregaron 10 microlitros de extracto a la vez, se mezclaron y se analizaron. El CH_3 viológeno reducido se torna de color púrpura. Los resultados de un análisis se señalan en Tabla 2.

Tabla 2. Actividades de Oxidación de CO Extracto Crudo.

ACS90	7,7 mg/ml	ACS91	11,8 mg/ ml	
Mta98	9,8 mg/ml	Mta99	11,2 mg/ ml	
Extracto	**Vol**	**OD/**	**U/ml**	**U/mg**
ACS90	10 microlitros	0,073	0,376	0,049
ACS91	10 microlitros	0,096	0,494	0,042
Mta99	10 microlitros	0,0031	0,016	0,0014
ACS90	10 microlitros	0,099	0,51	0,066
Mta99	25 microlitros	0,012	0,025	0,0022
ACS91	25 microlitros	0,215	0,443	0,037
Mta98	25 microlitros	0,019	0,039	0,004
ACS91	10 microlitros	0,129	0,66	0,056
Promedios				
ACS90	0,057 U/mg			
ACS91	0,045 U/mg			
Mta99	0,0018 U/mg			

[0469] Mta98/Mta99 son cepas de *E. coli* MG1655 que expresan genes de metanol metiltransferasa de *M. thermoacetia* y, en consecuencia, son controles negativos para las cepas ACS90 ACS91 de *E. coli* que contienen operones CODH de *M. thermoacetica*.

[0470] Si ~ 1% de la proteína celular es CODH, entonces estas cifras serían aproximadamente 100X menores que la actividad 500 U/mg de CODH pura de *M. thermoacetica*. Cálculos actuales basados en *Western blots* son 0,5% de la proteína celular, de manera que la actividad es alrededor de 50X menor que para CODH de *M. thermoacetica*. No obstante, este experimento demuestra actividad de oxidación de CO en *E. coli* recombinante con una cantidad mucho menor en los controles negativos. La pequeña cantidad de oxidación de CO (reducción de CH_3 viológeno) observada en los controles negativos indica que *E. coli* puede tener una capacidad limitada de reducir CH_3 viológeno.

[0471] Para calcular las concentraciones finales de las proteínas CODH y Mtr, se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), seguida por análisis *Western blot* en los mismos extractos celulares usados en los

análisis de oxidación de CO, ACS, metiltransferasa y Fe-S corrinoides. Los antisueros usados fueron proteínas CODH-ACS y Mtr policlonales a purificadas de *M. thermoacetica* y se visualizaron usando un anticuerpo secundario anti-conejo-en cabra conectado a una fosfatasa alcalina. Los *Westerns* se realizaron y los resultados se muestran en Figura 14. Las cantidades de CODH en ACS90 y ACS91 se calcularon a 50 ng por comparación con las calles del control. La expresión de los genes del operón CODH-ACS incluyendo 2 subunidades CODH y la metiltransferasa se confirmaron por medio de análisis *Western blot*. Por consiguiente, las células recombinantes de *E. coli* expresan múltiples componentes de un operón de 7 genes. Adicionalmente, tanto la metiltransferasa como la proteína ferro-sulfurosa corrinoide fueron activas en las mismas células recombinantes de *E. coli*. Estas proteínas son parte del mismo operón clonado en las mismas células.

[0472] Los análisis de oxidación de CO se repitieron usando extractos de células de *Moorella thermoacetica* para los controles positivos. Aunque la actividad CODH en ACS90 y ACS91 de *E. coli* era medible, fue alrededor de 130 – 150 X menor que el control de *M. thermoacetica*. Los resultados del análisis se muestran en Figura 15. Concretamente, se cultivaron células (*M. thermoacetica* o *E. coli* con el operón CODH/ACS; ACS90 o ACS91 o un vector vacío: pZA33S) y se prepararon extractos como ya se describió. Se realizaron análisis como ya se describió a 55°C en varias horas del día en que se prepararon los extractos. La reducción de metilviológeno fue seguida a 578 nm durante un transcurso de tiempo de 120 segundos.

[0473] Estos resultados describen el análisis (CODH) de oxidación de CO. Células recombinantes de *E. coli* expresaron actividad de oxidación de CO como se midió por el análisis de reducción de metil viológeno.

EJEMPLO XVIII

Experimento de Tolerancia de CO de *E. coli* CO y Análisis de Concentración de CO (análisis de mioglobina)

[0474] Este ejemplo describe la tolerancia de *E. coli* a altas concentraciones de CO.

[0475] Para examinar si *E. coli* puede crecer anaerobiamente o no en la presencia de cantidades saturadoras de CO, se organizaron cultivos en frascos de suero de 120 ml con 50 ml de medio Terrific Broth (más solución reductora, $NiCl_2$, $Fe(II)NH_4SO_4$, cianocobalamina, IPTG y cloranfenicol) como ya se describió para microbiología anaerobia en pequeños volúmenes. Una mitad de estos frascos se

equilibró con gas nitrógeno durante 30 minutos y una mitad de equilibró con gas CO durante 30 minutos. Se utilizó un vector vacío (pZA33) como control, y cultivos que contenían el vector vacío pZA33 así como los dos ACS90 y ACS91 se examinaron con N_2 y CO. Todos se inocularon y criaron durante 36 horas con agitación (250 rpm) a 37°C. Al final del período de 36 horas, el examen de los frascos reveló altas cantidades de crecimiento en todos. El grueso del crecimiento observado ocurrió durante la noche con un rezago prolongado.

[0476] Dado que todos los cultivos parecían crecer bien en la presencia de CO, se confirmaron las concentraciones finales de CO. Esto se efectuó usando un análisis del cambio espectral de la mioglobina luego de la exposición a CO. La mioglobina reducida con ditionita de sodio tiene un pico de absorbancia a 435 nm; este pico se cambia a 423 nm con CO. Debido a la baja longitud de onda y a la necesidad de registrar un espectro completo a partir de 300 nm en adelante, tienen que usarse tubos de cuarzo. La concentración de CO se mide contra una curva estándar y depende de la constante de la Ley de Henry para CO de solubilidad máxima en agua = 970 micromolar a 20°C y 1 atm.

[0477] Para la prueba con mioglobina de la concentración de CO, los tubos se lavaron 10X con agua, 1X con acetona y luego se taponaron como con el análisis CODH. Se insufló N_2 en los tubos durante ~10 minutos. Un volumen de 1 ml de amortiguador anaerobio (HEPES, pH 8.0, 2mM DTT) se agregó al blanco (no equilibrado con CO) con una jeringa Hamilton. Se agregaron un volumen de 10 microlitros de mioglobina (~1 mM — puede variarse, solo necesita una cantidad bastante grande) y 1 microlitro de ditionita (20 mM de solución concentrada). Se elaboró una curva estándar de CO usando amortiguador saturado con CO agregado en incrementos de 1 microlitro. Se registraron la altura y el cambio del pico para cada incremento. Los cultivos analizados fueron pZA33/CO, ACS90/CO, y ACS91/CO. Cada uno de estos se agregó en incrementos de 1 microlitro al mismo tubo. En la mitad del experimento se montó y usó un segundo tubo. Los resultados se muestran en Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones de Monóxido de Carbono, 36 horas.

Cepa y Condiciones de Crecimiento	**Concentración Final de CO (micromolar)**
pZA33-CO	930
ACS90-CO	638
	494
	734
	883
promedio	**687**
SD	**164**
ACS91-CO	728
	812
	760
	611
promedio	**728**
SD	**85**

[0478] Los resultados señalados en Tabla 3 indican que los cultivos crecieron sin importar si se cultivó o no una cepa en la presencia de CO o no. Estos resultados señalan que *E. coli* puede tolerar la exposición a CO bajo condiciones anaerobias y que células de *E. coli*, que expresan el operón CODH-ACS, pueden metabolizar alguna parte del CO.

[0479] Estos resultados demuestran que las células de *E. coli*, sin importar si expresan CODH/ACS o no, fueron capaces de crecer en la presencia de cantidades saturadoras de CO. Por lo demás, estas crecieron igualmente bien que los controles en nitrógeno en lugar de CO. Este experimento demostró que cepas de laboratorio de *E. coli* son insensibles a CO en los niveles alcanzados en el proyecto de gas de síntesis a presión atmosférica normal. Además, experimentos preliminares indicaron que las células recombinantes de *E. coli*, que expresaban CODH/ACS, consumían efectivamente algo de CO, probablemente por oxidación a dióxido de carbono.

EJEMPLO XVIX

Vías para la Producción de MAA y Ácido 3-Hidroxiisobutírico a Partir de Succinato mediante Metilmalonil-CoA

[0480] El ciclo de los TCA reductores mejora el rendimiento del ácido metacrílico (MAA) cuando se utiliza un material de alimentación a base de carbohidrato. La producción de MAA puede lograrse en un organismo recombinante por la vía mostrada en Figura 16A.

[0481] Por ejemplo, MAA y/o ácido 3-hidroxiisobutírico pueden producirse a partir de succinato mediante un intermediario metilmalonil-CoA, como se muestra en Figura 16A. Enzimas ejemplares para la conversión de succinato en MAA o ácido 3-hidroxiisobutírico por esta ruta incluyen succinil-CoA transferasa, succinil-CoA sintetasa, metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, metilmalonil-CoA reductasa, metilmalonato semialdehído reductasa y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa.

[0482] En esta vía, intermediarios metabólicos centrales se canalizan primero en succinato. Para la formación de succinato, fosfoenolpiruvato (PEP) se convierte en oxaloacetato mediante PEP carboxicinasa o PEP carboxilasa. Alternativamente, PEP se convierte primero en piruvato por piruvato cinasa y luego a oxaloacetato por metilmalonil-CoA carboxitransferasa o piruvato carboxilasa. Oxaloacetato se convierte entonces en succinato por medio del ciclo de los TCA reductores.

[0483] Succinato se activa entonces a succinil-CoA por una succinil-CoA transferasa o sintetasa. Metilmalonil-CoA mutasa forma luego metilmalonil-CoA a partir de succinil-CoA. Metilmalonil-CoA se reduce entonces a metilmalonato semialdehído. La reducción posterior de metilmalonato semialdehído produce ácido 3-hidroxiisobutírico, el cual puede secretarse como un producto o transformarse posteriormente en MAA mediante deshidratación.

[0484] Enzimas candidatas ejemplares para las transformaciones mostradas en Figura 16A se describen a continuación. Las enzimas succinil-CoA transferasa y sintetasa se describieron previamente en Ejemplo XV (ciclo de los RTCA).

[0485] Metilmalonil-CoA mutasa. Metilmalonil-CoA mutasa es una enzima dependiente de cobalamina que convierte succinil-CoA en metilmalonil-CoA. En *E. coli*, la mutasa reversible, dependiente de adenosilcobalamina, participa en una vía de tres pasos que lleva a la conversión de succinato en propionato. Enzimas MCM ejemplares se describen en Ejemplo V.

[0486] Alternativamente, isobutiril-CoA mutasa (ICM) podría catalizar la transformación propuesta. ICM es una metilmutasa dependiente de cobalamina en

la familia de MCM que re-arregla reversiblemente el esqueleto de carbono de la butiril-CoA en isobutiril-CoA (Ratnatilleke, *J Biol Chem.* 274:31679-31685 (1999)). Enzimas ICM ejemplares se describen en Ejemplo VII.

[0487] Metilmalonil-CoA epimerasa. Metilmalonil-CoA epimerasa (MMCE) es la enzima que interconvierte (R)-metilmalonil-CoA y (S)-metilmalonil-CoA. MMCE es una enzima esencial en la descomposición de ácidos grasos de número impar y de los aminoácidos valina, isoleucina y metionina. Enzimas MMCE ejemplares se describen en Ejemplo V.

[0488] Metilmalonil-CoA reductasa. La reducción de metilmalonil-CoA a su correspondiente aldehído, metilmalonato semialdehído, se cataliza por una aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA. Enzimas ejemplares se describen en Ejemplo V.

[0489] Metilmalonato semialdehído reductasa. La reducción de metilmalonato semialdehído a 3-hidroxiisobutirato se cataliza por metilmalonato semialdehído reductasa o 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa. Esta enzima participa en la degradación de valina, leucina e isoleucina y se ha identificado en bacterias, eucariotas y mamíferos. Enzimas metilmalonato semialdehído reductasas ejemplares se describen en Ejemplo V.

[0490] 3-Hidroxiisobutirato deshidratasa. La deshidratación de 3-hidroxiisobutirato a ácido metacrílico se cataliza por una enzima con actividad 3-hidroxiisobutirato deshidratasa. Enzimas 3-hidroxiisobutirato deshidratasas ejemplares se describen en Ejemplo V.

[0491] Un ciclo de los TCA reductores activos mejora el rendimiento del producto derivado de acetil-CoA, ácido metacrílico (MAA), como se muestra en las vías ejemplares de Figura 17. Vías del ciclo de los TCA reductores se describen aquí, así como la conversión de succinil-CoA en ácido metacrílico (véase también Figuras 3 y 16A y Ejemplo V). Figuras 17A y 17B muestran vías ejemplares. Las transformaciones enzimáticas se llevan a cabo por las enzimas, tal como se muestra. Figura 17A muestra las vías para fijación de CO_2 a succinil-CoA usando el ciclo de los TCA reductores. Figura 17B muestra vías ejemplares para la biosíntesis de ácido 3-hidroxiisobutírico y ácido metacrílico a partir de succinil-CoA; las transformaciones enzimáticas mostradas se llevan a cabo por las siguientes enzimas: A. Metilmalonil-CoA mutasa, B. Metilmalonil-CoA epimerasa, C. Metilmalonil-CoA reductasa, D. Metilmalonato semialdehído reductasa, E. 3-hidroxiisobutirato deshidratasa.

EJEMPLO XX

Vías para la Producción de MAA y Ácido 3-Hidroxiisobutírico a Partir de Succinato mediante 4-Hidroxibutiril-CoA

[0492] El ciclo de los TCA reductores mejora el rendimiento del ácido metacrílico (MAA) cuando se utiliza un material de alimentación a base de carbohidrato. La producción de MAA puede alcanzarse en un organismo recombinante como se muestra en Figura 16B.

[0493] Por ejemplo, MAA y/o ácido 3-hidroxiisobutírico pueden producirse a partir de succinato por medio de un intermediario 4-hidroxibutiril-CoA por un número de rutas alternas representadas en Figura 16B. Enzimas ejemplares para estas rutas incluyen: succinil-CoA transferasa, succinil-CoA sintetasa, succinil-CoA reductasa (formadora de aldehído) , 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, 4-hidroxibutirato cinasa, fosfotrans-4-hidroxibutirilasa, succinato reductasa, succinil-CoA reductasa (formadora de alcohol), 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa, 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa, 3-hidroxiisobutirato deshidratasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, metacrilil-CoA sintetasa, metacrilil-CoA transferasa y metacrilil-CoA hidrolasa.

[0494] La formación del intermediario 4-hidroxibutiril-CoA a partir de succinato procede a través de varias rutas representadas en Figura16B. Primero se convierte succinato en succinil-CoA por una CoA transferasa o sintetasa. Succinil-CoA se convierte entonces en semialdehído succínico por una aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA. Alternativamente, succinato se convierte directamente en semialdehído succínico por una ácido reductasa. El intermediario semialdehído succínico se reduce a 4-hidroxibutirato (4-HB) por una 4-hidroxibutirato deshidrogenasa. Una aldehído deshidrogenasa/alcohol deshidrogenasa bifuncional convierte directamente succinil-CoA en 4-HB. La activación de 4-HB a su acil-CoA se cataliza por una CoA transferasa o sintetasa. Alternativamente, 4-HB puede convertirse en un intermediario 4-hidroxibutiril-fosfato y transformarse posteriormente en 4-HB-CoA por una fosfotrans-4-hidroxibutirilasa.

[0495] La isomerización de 4-hidroxibutiril-CoA a 3-hidroxiisobutiril-CoA se cataliza por una 4-HB-CoA metilmutasa. La eliminación de la fracción CoA de 3-hidroxiisobutiril-CoA produce 3-hidroxiisobutirato, el cual puede segregarse como un producto o transformarse posteriormente en MAA por deshidratación. La deshidratación de 3-hidroxiisobutiril-CoA a metacrilil-CoA, seguida por la

eliminación de la fracción CoA por una CoA hidrolasa, transferasa o sintetasa, es otra ruta para la formación de MAA.

[0496] Enzimas candidatas ejemplares para las transformaciones mostradas en Figuras 16A y 16B se describen más adelante. Las enzimas succinil-CoA transferasa y sintetasa se describieron previamente en Ejemplo I (ciclo de los RTCA). Metilmalonil-CoA mutasa y metilmalonil-CoA epimerasa se describieron en Ejemplo III. Enzimas candidatas 3-hidroxiisobutirato deshidratasas se describieron en Ejemplo III.

[0497] Tabla 4 muestra clases de enzimas que pueden realizar los pasos descritos en Figura 16B. Enzimas ejemplares se describen con más detalle a continuación.

Tabla 4. Enzimas ejemplares que llevan a cabo los pasos en Figura 16B.

Etiqueta	**Función**	**Paso**
1.1.1.a	Oxidorreductasa (oxo a alcohol)	5
1.1.1.c	CoA reductasa (formadora de alcohol)	9
1.2.1.b	CoA reductasa (formadora de aldehído)	4
1.2.1.e	Oxidorreductasa (ácido a aldehído)	8
2.3.1.a	Fosfotransacilasa	7
2.7.2.a	Cinasa	6
2.8.3.a	Coenzima-A transferasa	3,10, 12,15
3.1.2.a	Tiolésterhidrolasa (específica de CoA)	12, 15
4.2.1.a	Deshidratasa	13,14
5.4.99.a	Metil mutasa	11
6.2.1.a	Ácido-tiol ligasa/CoA sintetasa	3,10, 12,15

[0498] 1.1.1.a. Enzimas que exhiben actividad 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (EC 1.1.1.61) reducen succinato semialdehído a 4-hidroxibutirato (Paso 5 de Figura 16B). Tales enzimas se han caracterizado en *Ralstonia eutropha* (Bravo et al., *J Forens Sci*, 49:379-387 (2004)), *Clostridium kluyveri* (Wolff et al., *Protein Expr.Purif.* 6:206-212 (1995)) y *Arabidopsis thaliana* (Breitkreuz et al., *J Biol Chem*, 278:41552-41556 (2003)). La enzima de *A. thaliana* se clonó y caracterizó en levadura (Breitkreuz et al., *J.Biol.Chem.* 278:41552-41556 (2003)). Aún otro

gene es *adhI* de alcohol deshidrogenasa de *Geobacillus thermoglucosidasius* (Jeon et al., *J Biotechnol* 135:127-133 (2008)).

PROTEÍNA	ID GENBANK	NÚMERO GI	ORGANISMO
4hbd	YP_726053.1	113867564	*Ralstonia eutropha* H16
4hbd	L21902.1	146348486	*Clostridium kluyveri* DSM 555
4hbd	Q94B07	75249805	*Arabidopsis thaliana*
adhI	AAR91477.1	40795502	*Geobacillus thermoglucosidasius*

[0499] 1.1.1.c. Una enzima bifuncional con actividad acil-CoA reductasa y alcohol deshidrogenasa puede convertir directamente succinil-CoA en 4-hidroxibutirato. Oxidorreductasas bifuncionales ejemplares que convierten una acil-CoA en alcohol incluyen las que transforman sustratos tales como acetil-CoA en etanol (por ejemplo, *adhE* de *E. coli* (Kessler et al., *FEBS.Lett.* 281:59-63 (1991))) y butiril-CoA en butanol (por ejemplo, *adhE2* de *C. acetobutylicum* (Fontaine et al., *J.Bacteriol.* 184:821-830 (2002))). Las enzimas de *C. acetobutylicum* codificadas por *bdh* I y *bdh* II (Walter, et al., *J. Bacteriol.* 174:7149-7158 (1992)), reducen acetil-CoA y butiril-CoA a etanol y butanol, respectivamente. Aparte de reducir acetil-CoA a etanol, se ha demostrado que la enzima codificada por *adhE* en *Leuconostoc mesenteroides* oxida el compuesto de cadena ramificada isobutiraldehído a isobutiril-CoA (Kazahaya et al., *J.Gen.Appl.Microbiol.* 18:43-55 (1972); Koo et al., *Biotechnol Lett,* 27:505-510 (2005)). Otra enzima ejemplar puede convertir malonil-CoA en 3-HP. Una enzima dependiente de NADPH con esta actividad se ha caracterizado en *Chloroflexus aurantiacus*, donde participa en el ciclo de 3-hidroxipropionato (Hugler et al., *J Bacteriol*, 184:2404-2410 (2002); Strauss et al., *Eur J Biochem*, 215:633-643 (1993)). Esta enzima, con una masa de 300 kDa, es altamente específica y muestra poca similitud de secuencia con otras oxidorreductasas conocidas (Hugler et al., *supra*). No se han mostrado enzimas en otros organismos que catalicen esta reacción específica; no obstante, existe evidencia bioinformática de que otros organismos pueden tener vías similares (Klatt et al., *Env Microbiol*, 9:2067-2078 (2007)). Enzimas candidatas en otros organismos, incluyendo *Roseiflexus castenholzii*, *Erythrobacter sp. NAP1* y la proteobacteria gamma marina HTCC2080, pueden inferirse por similitud de secuencias.

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
adhE	NP_415757.1	16129202	*Escherichia coli*

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
adhE2	AAK09379.1	12958626	*Clostridium acetobutylicum*
adhE	AAV66076.1	55818563	*Leuconostoc mesenteroides*
bdh I	NP_349892.1	15896543	*Clostridium acetobutylicum*
bdh II	NP_349891.1	15896542	*Clostridium acetobutylicum*
mcr	AAS20429.1	42561982	*Chloroflexus aurantiacus*
Rcas_2929	YP_001433009.1	156742880	*Roseiflexus castenholzii*
NAP1_02720	ZP_01039179.1	85708113	*Erythrobacter sp. NAP1*
MGP2080_00535	ZP_01626393.1	119504313	*marine gamma proteobacterium HTCC2080*

[0500] Moléculas de acil-CoA de cadena más larga pueden reducirse a sus correspondientes alcoholes por enzimas tales como el *FAR* de jojoba (*Simmondsia chinensis*), que codifica una acil-CoA reductasa formadora de alcohol. Su sobreexpresión en *E. coli* tuvo como resultado actividad FAR y la acumulación de alcohol graso (Metz et al., *Plant Physiol*, 122:635-644 (2000)).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
FAR	AAD38039.1	5020215	*Simmondsia chinensis*

[0501] 1.2.1.b. La reducción de succinil-CoA a su correspondiente aldehído, succinato semialdehído, se cataliza por succinil-CoA reductasa (formadora de aldehído). Enzimas ejemplares incluyen succinil-CoA reductasa (EC 1.2.1.76), acetil-CoA reductasa, butiril-CoA reductasa y acil-CoA reductasa grasa. Enzimas con actividad succinil-CoA reductasa se codifican por *sucD* de *Clostridium kluyveri* (Sohling, *J. Bacteriol.* 178:871-880 (1996)) y *sucD* de *P. gingivalis* (Takahashi, *J. Bacteriol* 182:4704-4710 (2000)). Enzimas succinil-CoA reductasas adicionales participan en el ciclo de 3-hidroxipropionato/4-hidroxibutirato de arqueas termófilas incluyendo *Metallosphaera sedula* (Berg et al., *Science* 318:1782-1786 (2007)) y *Thermoproteus neutrophilus* (Ramos-Vera et al., *J Bacteriol*, 191:4286-4297 (2009)). La enzima de *M. sedula*, codificada por *Msed_0709*, es estrictamente

dependiente de NADPH y posee asimismo actividad malonil-CoA reductasa. La enzima de *T. neutrophilus* es activa con NADPH y NADH. La enzima que acila acetaldehído deshidrogenasa en *Pseudomonas sp*, codificada por *bphG*, es todavía otra, ya que se ha demostrado que oxida y acila acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, isobutiraldehído y formaldehído (Powlowski, *J. Bacteriol.* 175:377-385 (1993)). Además de reducir acetil-CoA a etanol, se ha demostrado que la enzima codificada por *adhE* en *Leuconostoc mesenteroides* oxida el compuesto de cadena ramificada isobutiraldehído a isobutiril-CoA (Kazahaya, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 18:43-55 (1972); y Koo et al., *Biotechnol Lett.* 27:505-510 (2005)). Butiraldehído deshidrogenasa cataliza una reacción similar, la conversión de butiril-CoA en butiraldehído, en organismos solventogénicos tales como *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kosaka et al., *Biosci Biotechnol Biochem.*, 71:58-68 (2007)). Enzimas acil-CoA reductasas grasas se codifican por *acr1* de *Acinetobacter calcoaceticus* (Reiser, *Journal of Bacteriology* 179:2969-2975 (1997)) y *Acinetobacter sp. M-1* (Ishige et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1192-1195 (2002)).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
MSED_0709	YP_001190808.1	146303492	*Metallosphaera sedula*
Tneu_0421			*Thermoproteus neutrophilus*
sucD	P38947.1	172046062	*Clostridium kluyveri*
sucD	NP_904963.1	34540484	*Porphyromonas gingivalis*
bphG	BAA03892.1	425213	*Pseudomonas sp*
adhE	AAV66076.1	55818563	*Leuconostoc mesenteroides*
bld	AAP42563.1	31075383	*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*
acr1	YP_047869.1	50086359	*Acinetobacter calcoaceticus*
acr1	AAC45217	1684886	*Acinetobacter baylyi*
acr1	BAB85476.1	18857901	*Acinetobacter sp. Strain M-1*

[0502] 1.2.1.e. La conversión directa de succinato en succinato semialdehído se cataliza por una ácido carboxílico reductasa. Enzimas ejemplares incluyen ácido carboxílico reductasa, alfa-aminoadipato reductasa y ácido retinoico reductasa. Ácido carboxílico reductasa (CAR), hallada en *Nocardia iowensis,* cataliza la reducción dependiente de magnesio, de ATP y NADPH, de ácidos carboxílicos en sus correspondientes aldehídos (Venkitasubramanian et al., *J*

Biol.Chem. 282:478-485 (2007)). El sustrato natural de esta enzima es benzoato y la enzima exhibe una amplia aceptación de sustratos aromáticos incluyendo p-toluato (Venkitasubramanian et al., *Biocatalysis in Pharmaceutical and Biotechnology Industries*. CRC press (2006)). La enzima de *Nocardia iowensis*, codificada por *car,* se clonó y expresó funcionalmente en *E. coli* (Venkitasubramanian et al., *J Biol.Chem.* 282:478-485 (2007)). CAR requiere activación pos-translacional por una fosfopanteteína transferasa (PPTasa), que convierte la apoenzima inactiva en la holoenzima activa (Hansen et al., *Appl.Environ.Microbiol* 75:2765-2774 (2009)). La expresión del gen *npt*, que codifica una PPTasa específica, produce actividad mejorada de la enzima. Una enzima candidata adicional hallada en *Streptomyces griseus* se codifica por los genes *griC* y *griD*. Se cree que esta enzima convierte ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico en 3-amino-4-hidroxibenzaldehído, ya que la deleción de *griC* o *griD* llevó a la acumulación de ácido 3-acetilamino-4-hidroxibenzoico extracelular, un producto del ciclo del metabolismo de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico (Suzuki, et al., *J. Antibiot.* 60(6):380-387 (2007)). La co-expresión de *griC* y *griD* con SGR_665, una enzima similar en secuencia al *npt* de *Nocardia iowensi*, puede ser beneficiosa.

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

[0503] Genes *car* y *npt* adicionales pueden identificarse basándose en homología de secuencia.

Nombre del gen	**GI No.**	**No. de Accesión a GenBank**	**Organismo**
fadD9	121638475	YP_978699.1	*Mycobacterium bovis* BCG
BCG_2812c	121638674	YP_978898.1	*Mycobacterium bovis* BCG
nfa20150	54023983	YP_118225.1	*Nocardia farcinica* IFM 10152

nfa40540	54026024	YP_120266.1	*Nocardia farcinica* IFM 10152
SGR_6790	182440583	YP_001828302.1	*Streptomyces griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350
SGR_665	182434458	YP_001822177.1	*Streptomyces griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350
MSMEG_2956	YP_887275.1	YP_887275.1	*Mycobacterium smegmatis MC2 155*
MSMEG_5739	YP_889972.1	118469671	*Mycobacterium smegmatis MC2 155*
MSMEG_2648	YP_886985.1	118471293	*Mycobacterium smegmatis MC2 155*
MAP1040c	NP_959974.1	41407138	*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis K-10*
MAP2899c	NP_961833.1	41408997	*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis K-10*
MMAR_2117	YP_001850422.1	183982131	*Mycobacterium marinum M*
MMAR_2936	YP_001851230.1	183982939	*Mycobacterium marinum M*
MMAR_1916	YP_001850220.1	183981929	*Mycobacterium marinum M*
TpauDRAFT_33060	ZP_04027864.1	227980601	*Tsukamurella paurometabola*

			DSM 20162
TpauDRAFT_20920	ZP_04026660.1	ZP_04026660.1	*Tsukamurella paurometabola DSM 20162*
CPCC7001_1320	ZP_05045132.1	254431429	*Cyanobium PCC7001*
DDBDRAFT_0187729	XP_636931.1	66806417	*Dictyostelium discoideum AX4*

[0504] Una enzima con características similares, alfa-aminoadipato reductasa (AAR, EC 1.2.1.31), participa en las vías de biosíntesis de lisina en algunas especies fúngicas. Esta enzima reduce naturalmente alfa-aminoadipato a alfa-aminoadipato semialdehído. El grupo carboxilo se activa primero a través de la formación, dependiente de ATP, de un adenilato que se reduce entonces por NAD(P)H para producir el aldehído y AMP. Al igual que CAR, esta enzima utiliza magnesio y requiere activación por una PPTasa. Enzimas candidatas para AAR y su correspondiente PPTasa se encuentran en *Saccharomyces cerevisiae* (Morris et al., *Gene* 98:141-145 (1991)), *Candida albicans* (Guo et al., *Mol.Genet.Genomics* 269:271-279 (2003)), y *Schizosaccharomyces pombe* (Ford et al., *Curr.Genet.* 28:131-137 (1995)). La AAR de *S. pombe* exhibió actividad significativa cuando se expresó en *E. coli* (Guo et al., *Yeast* 21:1279-1288 (2004)). La AAR de *Penicillium chrysogenum* acepta S-carboximetil-L-cisteína como un sustrato alternativo, pero no reaccionó con adipato, L-glutamato o diaminopimelato (Hijarrubia et al., *J Biol.Chem.* 278:8250-8256 (2003)). El gen que codifica La PPTasa de *P. chrysogenum* no se ha identificado hasta la fecha y no se identificaron aciertos de alta confiabilidad por búsqueda de homología de secuencia.

Gen	No. de Accesión a GenBank	GI No.	Organismo
LYS2	AAA34747.1	171867	*Saccharomyces cerevisiae*
LYS5	P50113.1	1708896	*Saccharomyces cerevisiae*
LYS2	AAC02241.1	2853226	*Candida albicans*
LYS5	AAO26020.1	28136195	*Candida albicans*
Lys1p	P40976.3	13124791	*Schizosaccharomyces pombe*

Gen	No. de Accesión a GenBank	GI No.	Organismo
Lys7p	Q10474.1	1723561	*Schizosaccharomyces pombe*
Lys2	CAA74300.1	3282044	*Penicillium chrysogenum*

[0505] 2.3.1.a. Una enzima con actividad fosfotrans-4-hidroxibutirilasa se requiere para convertir 4-hidroxibutiril-fosfato en 4-hidroxibutiril-CoA. Aciltransferasas ejemplares, que transfieren fosfato, incluyen fosfotransacetilasa (EC 2.3.1.8) y fosfotransbutirilasa (EC 2.3.1.19). El gen *pta* de *E. coli* codifica una fosfotransacetilasa que convierte reversiblemente acetil-CoA en acetil-fosfato (Suzuki, *Biochim.Biophys.Acta* 191:559-569 (1969)). Esta enzima puede utilizar asimismo propionil-CoA como sustrato, formando propionato en el proceso (Hesslinger et al., *Mol.Microbiol* 27:477-492 (1998)). Otras fosfato acetiltransferasas, que exhiben actividad en propionil-CoA, se encuentran en *Bacillus subtilis* (Rado et al., *Biochim.Biophys.Acta* 321:114-125 (1973)), *Clostridium kluyveri* (Stadtman, *Methods Enzymol* 1:596-599 (1955)), y *Thermotoga maritima* (Bock et al., *J Bacteriol.* 181:1861-1867 (1999)). Análogamente, el gen *ptb* de *C. acetobutylicum* codifica fosfotransbutirilasa, una enzima que convierte reversiblemente butiril-CoA en butiril-fosfato (Wiesenborn et al., *Appl Environ.Microbiol* 55:317-322 (1989); Walter et al., *Gene* 134:107-111 (1993)). Genes *ptb* adicionales se hallan en la bacteria productora de butirato L2-50 (Louis et al., *J.Bacteriol.* 186:2099-2106 (2004)) y *Bacillus megaterium* (Vazquez et al., *Curr.Microbiol* 42:345-349 (2001)).

Proteína	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
pta	NP_416800.1	71152910	*Escherichia coli*
pta	P39646	730415	*Bacillus subtilis*
pta	A5N801	146346896	*Clostridium kluyveri*
pta	Q9X0L4	6685776	*Thermotoga maritima*
ptb	NP_349676	34540484	*Clostridium acetobutylicum*
ptb	AAR19757.1	38425288	bacteria productora de butirato L2-50
ptb	CAC07932.1	10046659	*Bacillus megaterium*

[0506] 2.7.2.a. Enzimas cinasas o fosfotransferasas en la clase EC 2.7.2 transforman ácidos carboxílicos en ácidos fosfónicos con hidrólisis concurrente de

una ATP. Enzimas candidatas 4-hidroxibutirato cinasas ejemplares incluyen butirato cinasa (EC 2.7.2.7), isobutirato cinasa (EC 2.7.2.14), aspartocinasa (EC 2.7.2.4), acetato cinasa (EC 2.7.2.1) y gamma-glutamil cinasa (EC 2.7.2.11). Butirato cinasa cataliza la conversión reversible de butiril-fosfato en butirato durante la acidógenesis en la especie *Clostridial* (Cary et al., *Appl Environ Microbiol* 56:1576-1583 (1990)). La enzima de *Clostridium acetobutylicum* se codifica por los dos productos del gen *buk* (Huang et al., *J Mol.Microbiol Biotechnol* 2:33-38 (2000)). Otras enzimas butirato cinasas se encuentran en *C. butyricum* y *C. tetanomorphum* (Twarog et al., *J Bacteriol.* 86:112-117 (1963)). Una enzima relacionada, isobutirato cinasa de *Thermotoga maritima,* se expresó en *E. coli* y se cristalizó (Diao et al., *J Bacteriol.* 191:2521-2529 (2009); Diao et al., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 59:1100-1102 (2003)). Aspartocinasa cataliza la fosforilación, dependiente de ATP, de aspartato y participa en la síntesis de varios aminoácidos. La enzima aspartocinasa III en *E. coli,* codificada por *lysC,* tiene una amplia gama de sustratos y se han dilucidado los residuos catalíticos implicados en la especificidad de sustrato (Keng et al., *Arch Biochem Biophys* 335:73-81 (1996)). Dos cinasas adicionales en *E. coli* son también acetato cinasa y gamma-glutamil cinasa. La acetato cinasa de *E. coli*, codificada por *ackA* (Skarstedt et al., *J.Biol.Chem.* 251:6775-6783 (1976)), fosforila propionato además de acetato (Hesslinger et al., *Mol.Microbiol* 27:477-492 (1998)). La gamma-glutamil cinasa de *E. coli*, codificada por *proB* (Smith et al., *J.Bacteriol.* 157:545-551 (1984)), fosforilas el grupo ácido gamma carbónico de glutamato.

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

[0507] 2.8.3.a. Las CoA transferasas catalizan la transferencia reversible de una fracción CoA de una molécula a otra. Varias transformaciones en Figura 16B requieren una actividad CoA transferasa: succinil-CoA transferasa, 4-hidroxibutiril-

CoA transferasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa y metacrilil-CoA transferasa. Enzimas candidatas para succinil-CoA transferasa se han descrito previamente aquí y son igualmente aplicables a esta vía. Enzimas CoA transferasas ejemplares adicionales incluyen los productos de los genes *cat1*, *cat2*, y *cat3* de *Clostridium kluyveri* los cuales han demostrado exhibir actividad succinil-CoA, 4-hidroxibutiril-CoA y butiril-CoA transferasa, respectivamente (Seedorf et al., *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 105:2128-2133 (2008); Sohling et al., *J Bacteriol.* 178:871-880 (1996)). Actividades CoA transferasa similares están también presentes en *Trichomonas vaginalis* (van Grinsven et al., *J.Biol.Chem.* 283:1411-1418 (2008)) y *Trypanosoma brucei* (Riviere et al., *J.Biol.Chem.* 279:45337-45346 (2004)).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
cat1	P38946.1	729048	*Clostridium kluyveri*
cat2	P38942.2	172046066	*Clostridium kluyveri*
cat3	EDK35586.1	146349050	*Clostridium kluyveri*
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	*Trichomonas vaginalis G3*
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	*Trypanosoma brucei*

[0508] La enzima glutaconil-CoA-transferasa (EC 2.8.3.12) de la bacteria anaerobia *Acidaminococcus fermentans* reacciona con glutaconil-CoA y 3-butenoil-CoA (Mack et al., 226:41-51 (1994)), sustratos similares en estructura a 2,3-dehidroadipil-CoA. Los genes que codifican esta enzima son *gctA* y *gctB*. Esta enzima tiene actividad reducida, pero detectable, con otros derivados de CoA incluyendo glutaril-CoA, 2-hidroxiglutaril-CoA, adipil-CoA, crotonil-CoA y acrilil-CoA (Buckel et al., *Eur.J Biochem.* 118:315-321 (1981)). La enzima se ha clonado y expresado en *E. coli* (Mack et al., *Eur.J.Biochem.* 226:41-51 (1994)). Se ha detectado asimismo actividad glutaconato CoA-transferasa en *Clostridium sporosphaeroides* y *Clostridium symbiosum*. Enzimas glutaconato CoA-transferasas adicionales pueden inferirse por homología con la secuencia proteica de *Acidaminococcus fermentans*.

Proteína	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
gctA	CAA57199.1	559392	*Acidaminococcus fermentans*
gctB	CAA57200.1	559393	*Acidaminococcus fermentans*
gctA	ACJ24333.1	212292816	*Clostridium symbiosum*
gctB	ACJ24326.1	212292808	*Clostridium symbiosum*
gctA	NP_603109.1	19703547	*Fusobacterium nucleatum*

gctB	NP_603110.1	19703548	*Fusobacterium nucleatum*

[0509] Una CoA transferasa que puede utilizar acetil-CoA como donador de CoA es acetoacetil-CoA transferasa, codificada por los genes *atoA* (subunidad alfa) y *atoD* (subunidad beta) de *E. coli* (Korolev et al., *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 58:2116-2121 (2002); Vanderwinkel et al., 33:902-908 (1968)). Esta enzima tiene una amplia gama de sustratos (Sramek et al., *Arch Biochem Biophys* 171:14-26 (1975)) y se ha demostrado que transfiere la fracción CoA a acetato de una variedad de sustratos CoA lineales y ramificados, incluyendo isobutirato (Matthies et al., *Appl Environ.Microbiol* 58:1435-1439 (1992)), valerato (Vanderwinkel et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 33:902-908 (1968)) y butanoato (Vanderwinkel et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 33:902-908 (1968)). Esta enzima se induce en el nivel transcripcional por acetoacetato, de manera que la modificación del control regulador puede ser necesaria para generar mediante ingeniería genética esta enzima en una vía (Pauli et al., *Eur.J Biochem.* 29:553-562 (1972)). Enzimas similares existen en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Duncan et al., 68:5186-5190 (2002)), *Clostridium acetobutylicum* (Cary et al., *Appl Environ Microbiol* 56:1576-1583 (1990); Wiesenborn et al., *Appl Environ Microbiol* 55:323-329 (1989)), y *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kosaka et al., *Biosci.Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007)).

Gen	**GI #**	**No. de Accesión**	**Organismo**
atoA	2492994	P76459.1	*Escherichia coli*
atoD	2492990	P76458.1	*Escherichia coli*
actA	62391407	YP_226809.1	*Corynebacterium glutamicum*
cg0592	62389399	YP_224801.1	*Corynebacterium glutamicum*
ctfA	15004866	NP_149326.1	*Clostridium acetobutylicum*
ctfB	15004867	NP_149327.1	*Clostridium acetobutylicum*
ctfA	31075384	AAP42564.1	*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*
ctfB	31075385	AAP42565.1	*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*

[0510] 3.1.2.a. 3-Hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa cataliza la conversión de 3-hidroxiisobutiril-CoA a 3-hidroxiisobutirato. Esta enzima participa en las vías de degradación de valina (Shimomura et al., *J Biol Chem.* 269:14248-14253 (1994)). Genes que codifican esta enzima incluyen *hibch* de *Rattus norvegicus* (Shimomura

et al., *Methods Enzymol.* 324:229-240 (2000)) y *Homo sapiens* (Shimomura et al., *supra*). Genes candidatos similares pueden identificarse igualmente por homología de secuencia, incluyendo *hibch* de *Saccharomyces cerevisiae* y *BC_2292* de *Bacillus cereus*.

Nombre del gen	**# de Accesión a GenBank**	**GI#**	**Organismo**
hibch	Q5XIE6.2	146324906	*Rattus norvegicus*
hibch	Q6NVY1.2	146324905	*Homo sapiens*
hibch	P28817.2	2506374	*Saccharomyces cerevisiae*
BC_2292	AP09256	29895975	*Bacillus cereus*

[0511] Metilmalonil-CoA se convierte en metilmalonato por metilmalonil-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.7). Esta enzima, aislada del hígado de *Rattus norvegicus*, es también activa en malonil-CoA y propionil-CoA como sustratos alternativos (Kovachy et al., *J. Biol. Chem.*, 258: 11415-11421 (1983)). El gen asociado con esta enzima no se ha identificado hasta la fecha. CoA hidrolasas ejemplares con amplias gamas de sustratos son candidatas apropiadas, como lo son las enzimas 3-HIB-CoA hidrolasas, ya descritas. La enzima codificada por *acot12* del cerebro de *Rattus norvegicus* (Robinson et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 71:959-965 (1976)) puede reaccionar con butiril-CoA, hexanoil-CoA y malonil-CoA. La ácido dicarboxílico tioesterasa humana, codificada por *acot8,* exhibe actividad en glutaril-CoA, adipil-CoA, suberil-CoA, sebacil-CoA y dodecanodioil-CoA (Westin et al., *J.Biol.Chem.* 280:38125-38132 (2005)). El homólogo más cercano de *E. coli* a esta enzima, *tesB*, puede hidrolizar también una gama de CoA tiolésteres (Naggert et al., *J Biol Chem* 266:11044-11050 (1991)). Una enzima similar se ha caracterizado igualmente en el hígado de la rata (Deana R., *Biochem Int* 26:767-773 (1992)). Enzimas adicionales con actividad hidrolasa en *E. coli* incluyen *ybgC*, *paaI* y *ybdB* (Kuznetsova, et al., *FEMS Microbiol Rev*, 2005, 29(2):263-279; Song et al., *J Biol Chem*, 2006, 281(16):11028-38). Aunque su secuencia no se ha reportado, la enzima de la mitocondria de la hoja de guisante tiene una amplia gama de sustratos, con actividad demostrada en acetil-CoA, propionil-CoA, butiril-CoA, palmitoil-CoA, oleoil-CoA, succinil-CoA, y crotonil-CoA (Zeiher et al., *Plant.Physiol.* 94:20-27 (1990)). La acetil-CoA hidrolasa, *ACH1*, de *S. cerevisiae*

representa otra hidrolasa candidata (Buu et al., *J.Biol.Chem.* 278:17203-17209 (2003)).

Nombre del gen	**# Accesión a GenBank**	**GI#**	**Organismo**
acot12	NP_570103.1	18543355	*Rattus norvegicus*
tesB	NP_414986	16128437	*Escherichia coli*
acot8	CAA15502	3191970	*Homo sapiens*
acot8	NP_570112	51036669	*Rattus norvegicus*
tesA	NP_415027	16128478	*Escherichia coli*
ybgC	NP_415264	16128711	*Escherichia coli*
paaI	NP_415914	16129357	*Escherichia coli*
ybdB	NP_415129	16128580	*Escherichia coli*
ACH1	NP_009538	6319456	*Saccharomyces cerevisiae*

[0512] Todavía otra hidrolasa candidata es la glutaconato CoA-transferasa de *Acidaminococcus fermentans.* Esta enzima se transformó por mutagénesis dirigida al sitio en una acil-CoA hidrolasa con actividad en glutaril-CoA, acetil-CoA y 3-butenoil-CoA (Mack et al., *FEBS.Lett.* 405:209-212 (1997)). Esto sugiere que las enzimas que codifican succinil-CoA:3-cetoácido-CoA transferasas y acetoacetil-CoA:acetil-CoA transferasas pueden servir como candidatas para este paso de reacción pero requerirían ciertas mutaciones para cambiar su función.

Nombre del genname	**# de Accesión a GenBank**	**GI#**	**Organismo**
gctA	CAA57199	559392	*Acidaminococcus fermentans*
gctB	CAA57200	559393	*Acidaminococcus fermentans*

[0513] 4.2.1.a. Dos transformaciones en Figura 16B requieren enzimas deshidratasas. La deshidratación de 3-hidroxiisobutirato a MAA se cataliza por 3-hidroxiisobutirato. Enzimas candidatas para esta transformación se describen en Ejemplo VII. La deshidratación de 3-hidroxiisobutiril-CoA a metacrilil-CoA se cataliza por una enzima con actividad 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa. Enzimas ejemplares incluyen enoil-CoA hidratasas y crotonasas.

[0514] Enoil-CoA hidratasas (EC 4.2.1.17) catalizan la deshidratación de una gama de sustratos 3-hidroxiacil-CoA (Roberts et al., *Arch.Microbiol* 117:99-108 (1978); Agnihotri et al., *Bioorg.Med.Chem.* 11:9-20 (2003); Conrad et al., *J Bacteriol.* 118:103-111 (1974)). La enoil-CoA hidratasa de *Pseudomonas putida*, codificada por *ech*, cataliza la conversión de 3-hidroxibutiril-CoA en crotonil-CoA (Roberts et al., *Arch.Microbiol* 117:99-108 (1978)). Esta transformación se cataliza además por el producto del gen *crt* de *Clostridium acetobutylicum*, el producto del gen *crt1* de *C. kluyveri,* y otros organismos clostridiales (Atsumi et al., *Metab Eng* 10:305-311 (2008); Boynton et al., *J Bacteriol.* 178:3015-3024 (1996); Hillmer et al., *FEBS Lett.* 21:351-354 (1972)). Enoil-CoA hidratasas candidatas adicionales son *phaA* y *phaB*, de *P. putida*, y *paaA* y *paaB* de *P. fluorescens* (Olivera et al., *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A* 95:6419-6424 (1998)). Se predice que el producto del gen *pimF* en *Rhodopseudomonas palustris* codifica una enoil-CoA hidratasa que participa en la degradación de pimeloil-CoA (Harrison et al., *Microbiology* 151:727-736 (2005)). Por último, se ha demostrado que un número de genes de *Escherichia coli* exhiben funcionalidad enoil-CoA hidratasa incluyendo *maoC* (Park et al., *J Bacteriol.* 185:5391-5397 (2003)), *paaF* (Ismail et al., *Eur.J Biochem.* 270:3047-3054 (2003); Park et al., *Appl. Biochem. Biotechnol* 113-116:335-346 (2004); Park et al., *Biotechnol Bioeng* 86:681-686 (2004)) y *paaG* (Ismail et al., *Eur.J Biochem.* 270:3047-3054 (2003); Park and Lee, *Appl.Biochem.Biotechnol* 113-116:335-346 (2004); Park and Yup, *Biotechnol Bioeng* 86:681-686 (2004)).

Gen	No. de Accesión a GenBank	GI No.	Organismo
ech	NP_745498.1	26990073	*Pseudomonas putida*
crt	NP_349318.1	15895969	*Clostridium acetobutylicum*
crt1	YP_001393856	153953091	*Clostridium kluyveri*
phaA	NP_745427.1	26990002	*Pseudomonas putida*
phaB	NP_745426.1	26990001	*Pseudomonas putida*
paaA	ABF82233.1	106636093	*Pseudomonas fluorescens*
paaB	ABF82234.1	106636094	*Pseudomonas fluorescens*
maoC	NP_415905.1	16129348	*Escherichia coli*
paaF	NP_415911.1	16129354	*Escherichia coli*
paaG	NP_415912.1	16129355	*Escherichia coli*

[0515] Alternativamente, los productos de los genes de *E. coli*, *fadA* y *fadB*, codifican un complejo multi-enzimático involucrado en la oxidación de ácidos grasos, que exhibe actividad enoil-CoA hidratasa (Yang et al., *Biochemistry* 30:6788-6795 (1991); Yang, *J Bacteriol.* 173:7405-7406 (1991); Nakahigashi et al., *Nucleic Acids Res.* 18:4937 (1990)). Inactivar un regulador negativo, codificado por *fadR*, puede utilizarse para activar el producto del gen *fadB* (Sato et al., *J Biosci.Bioeng* 103:38-44 (2007)). Los genes *fadI* y *fadJ* codifican funciones similares y se expresan naturalmente bajo condiciones anaerobias (Campbell et al., *Mol.Microbiol* 47:793-805 (2003)).

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
fadA	YP_026272.1	49176430	*Escherichia coli*
fadB	NP_418288.1	16131692	*Escherichia coli*
fadI	NP_416844.1	16130275	*Escherichia coli*
fadJ	NP_416843.1	16130274	*Escherichia coli*
fadR	NP_415705.1	16129150	*Escherichia coli*

[0516] 5.4.99.a. 4-Hidroxibutiril-CoA se re-arregla para formar 3-hidroxiisobutiril-CoA por una enzima con actividad4-hidroxibutiril-CoA mutasa. Esta actividad no se ha demostrado hasta la fecha. Metilmalonil-CoA mutasa e isobutiril-CoA mutasa catalizan transformaciones similares. Enzimas candidatas metilmalonil-CoA mutasas e isobutiril-CoA mutasas ejemplares se describen en Ejemplos V y VII.

[0517] 6.2.1.a. La conversión de sustratos acil-CoA en sus productos de ácido puede catalizarse por una CoA ácido-tiol ligasa o CoA sintetasa en la familia de enzimas6.2.1. Enzimas de Figura 16B en esta clase incluyen succinil-CoA sintetasa, 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa y metacrilil-CoA sintetasa. Enzimas succinil-CoA sintetasas candidatas se describieron previamente. Enzimas ejemplares para catalizar actividades 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa y metacrilil-CoA sintetasa se describen aquí y a continuación. Acetil-CoA sintetasa formadora de ADP (ACD, EC 6.2.1.13) es una enzima que acopla la conversión de acil-CoA ésteres a sus correspondientes ácidos con la síntesis concomitantes de ATP. Se demostró que ACD I de *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por AF1211, opera en una variedad de sustratos de cadena lineal y ramificada, incluyendo isobutirato, isopentanoato y fumarato (Musfeldt et al., *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). Una

segunda ACD reversible en *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por AF1983, demostró tener también una amplia gama de sustratos con alta actividad en los compuestos cíclicos fenilacetato e indolacetato (Musfeldt and Schonheit, *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). La enzima de *Haloarcula marismortui* (anotada como una succinil-CoA sintetasa) acepta propionato, butirato y ácidos de cadena ramificada (isovalerato e isobutirato) como sustratos, y se demostró que opera en las direcciones hacia adelante y hacia atrás (Brasen et al., *Arch Microbiol* 182:277-287 (2004)). La ACD codificada por *PAE3250* de la crenarquea hipertermófila *Pyrobaculum aerophilum* mostró la gama más amplia de sustratos de todas las ACDs caracterizadas, reaccionando con acetil-CoA, isobutiril-CoA (sustrato preferido) y fenilacetil-CoA (Brasen et al, *supra*). Evolución dirigida o generación mediante ingeniería genética puede usarse para modificar esta enzima para operar a la temperatura fisiológica del organismo hospedero. Todas las enzimas de *A. fulgidus*, *H. marismortui* y *P. aerophilum* se han clonado, expresado funcionalmente y caracterizado en *E. coli* (Brasen and Schonheit, *supra*; Musfeldt and Schonheit, *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). Una candidata adicional es succinil-CoA sintetasa, codificada por *sucCD* de *E. coli* y los genes *LSC1* y *LSC2* de *Saccharomyces cerevisiae*. Estas enzimas catalizan la formación de succinil-CoA a partir de succinato con el consumo concomitante de una ATP en una reacción en la cual es reversible *in vivo* (Buck et al., *Biochemistry* 24:6245-6252 (1985)). Se ha demostrado que la acil CoA ligasa de *Pseudomonas putida* funciona en varios sustratos alifáticos incluyendo ácidos acético, propiónico, butírico, valérico, hexanoico, heptanoico y octanoico en compuestos aromáticos tales como ácidos fenilacético y fenoxiacético (Fernandez-Valverde et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 59:1149-1154 (1993)). Una enzima relacionada, malonil CoA sintetasa (6.3.4.9) de *Rhizobium leguminosarum* podría convertir varios diácidos, a saber, malonato de etilo, propilo, alilo, isopropilo, dimetilo, ciclopropilo, ciclopropilmetileno, ciclobutilo y bencilo en sus correspondientes monotioésteres (Pohl et al., *J.Am.Chem.Soc.* 123:5822-5823 (2001)).

Proteína	**ID GenBank**	**Número GI**	**Organismo**
AF1211	NP_070039.1	11498810	*Archaeoglobus fulgidus*
AF1983	NP_070807.1	11499565	*Archaeoglobus fulgidus*
scs	YP_135572.1	55377722	*Haloarcula marismortui*
PAE3250	NP_560604.1	18313937	*Pyrobaculum aerophilum* str. IM2

Proteína	ID GenBank	Número GI	Organismo
sucC	NP_415256.1	16128703	*Escherichia coli*
sucD	AAC73823.1	1786949	*Escherichia coli*
LSC1	NP_014785	6324716	*Saccharomyces cerevisiae*
LSC2	NP_011760	6321683	*Saccharomyces cerevisiae*
paaF	AAC24333.2	22711873	*Pseudomonas putida*
matB	AAC83455.1	3982573	*Rhizobium leguminosarum*

[0518] Un ciclo de los TCA reductores activos mejora el rendimiento del producto derivado de acetil-CoA, ácido metacrílico (MAA), como se muestra en las vías ejemplares de Figura 18. Vías del ciclo de los TCA reductores se describen aquí así como la conversión de succinato en 4-hidroxibutiril-CoA y ácido metacrílico (véase asimismo Figuras 5 y 16B y Ejemplo VII). Figuras 18A y 18B muestran vías ejemplares. Las transformaciones enzimáticas se llevan a cabo por las enzimas, tal como se muestra. Figura 18A muestra las vías para la fijación de CO_2 a succinato usando el ciclo de los TCA reductores. Figura 18B muestra vías ejemplares para la biosíntesis de ácido 3-hidroxiisobutírico y ácido metacrílico a partir de succinato; las transformaciones enzimáticas mostradas se llevan a cabo por las siguientes enzimas: A. 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, B. Metacrilil-CoA sintetasa, transferasa o hidrolasa, C. Succinil-CoA transferasa o sintetasa, D. Succinil-CoA reductasa (formadora de aldehído), E. 4-Hidroxibutirato deshidrogenasa, F. 4-Hidroxibutirato cinasa, G. Fosfotrans-4-hidroxibutirilasa, H. Succinato reductasa, I. Succinil-CoA reductasa (formadora de alcohol), J. 4-Hidroxibutiril-CoA sintetasa o transferasa, K. 4-Hidroxibutiril-CoA mutasa, L. 3-Hidroxiisobutiril-CoA sintetasa, transferasa o hidrolasa, M. 3-Hidroxiisobutirato deshidratasa.

Ejemplo XXI

Vías para la Producción de MAA y Ácido 2-Hidroxiisobutírico a Partir de Acetil-CoA

[0519] Un ciclo de los TCA reductores activos mejora el rendimiento del producto derivado de acetil-CoA, ácido metacrílico (MAA), como se muestra en la distribución del flujo de Figura 16C. En esta vía, MAA se produce a partir de acetil-CoA en cinco pasos enzimáticos. En el primer paso, dos moléculas de acetil-CoA se combinan para formar acetoacetil-CoA. Acetoacetil-CoA se reduce posteriormente a 3-hidroxibutiril-CoA. Una metilmutasa re-arregla entonces el

esqueleto de carbono de 3-hidroxibutiril-CoA a 2-hidroxiisobutiril-CoA, la cual se deshidrata después para formar metacrilil-CoA. Alternativamente, 2-hidroxiisobutiril-CoA puede convertirse en 2-hidroxiisobutirato, secretarse y recuperarse como producto. El paso final de convertir metacrilil-CoA en MAA puede llevarse a cabo por una sola enzima o una serie de enzimas. Una estrategia alternativa para convertir metacrilil-CoA en MAA implica un proceso de pasos múltiples en el cual MAA-CoA se convierte en MAA mediante 3-hidroxiisobutirato. Por este proceso, MAA-CoA se convierte primero en 3-hidroxiisobutiril-CoA, la cual puede convertirse subsiguientemente en 3-hidroxiisobutirato por 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa. 3-Hidroxiisobutirato puede convertirse entonces en MAA biocatalíticamente mediante una 3-hidroxiisobutirato deshidratasa, o secretarse y convertirse en MAA por deshidratación química.

[0520] Enzimas candidatas para cada paso de la vía se describen aquí. Enzimas CoA transferasa, sintetasa e hidrolasa, que catalizan la conversión de metacrilil-CoA en MAA, se describieron más arriba en Ejemplo VII. Enzimas que describen la conversión indirecta de metacrilil-CoA en 3-hidroxiisobutirato y ácido metacrílico se describen asimismo más arriba.

[0521] Acetoacetil-CoA tiolasa. La formación de acetoacetil-CoA a partir de dos unidades acetil-CoA se cataliza por acetil-CoA tiolasa. Enzimas ejemplares se describen en Ejemplo X.

EJEMPLO XXII

Vías para la Producción de MAA a Partir de Piruvato y Acetil-CoA

[0522] Un ciclo de los TCA reductores activos mejora el rendimiento del producto derivado de acetil-CoA, ácido metacrílico (MAA). Una distribución del flujo que muestra este rendimiento mejorado se indica en Figura 16D.

[0523] Figura 16E (véase también Figura 1 y Ejemplo I) representa vías ejemplares a MAA a partir de acetil-CoA y piruvato mediante el intermediario citramalato. Se muestran asimismo vías a MAA a partir de aconitato. En una vía, acetil-CoA y piruvato se convierten en citramalato por citramalato sintasa. La deshidratación de citramalato puede producir citraconato o mesaconato. Mesaconato y citraconato se interconvierten por una cis/trans isomerasa. La descarboxilación de mesaconato o citraconato produce MAA. En una vía alternativa, citramalato se forma a partir de acetil-CoA y piruvato mediante un intermediario citramalil-CoA, catalizado por citramalil-CoA liasa y citramalil-coA hidrolasa, transferasa o sintetasa. Se muestran además vías de aconitato a MAA. En una vía, aconitato se descarboxila primero a itaconato por aconitato

descarboxilasa. Itaconato se isomeriza entonces a citraconato por itaconato delta-isomerasa. La conversión de citraconato a MAA procede directamente por descarboxilación o indirectamente mediante mesaconato. En una vía alternativa, el intermediario itaconato se convierte primero en itaconil-CoA por una CoA transferasa o sintetasa. La hidratación de itaconil-CoA produce citramalil-CoA, la cual se convierte entonces en MAA como se describe previamente.

[0524] Tabla 1, como se señala en Ejemplo I muestra clases de enzimas que pueden realizar los pasos descritos en Figura 16E. Enzimas ejemplares se describen a continuación y con mayor detalle en Ejemplo I.

[0525] EC 2.3.1.a Sintasa. Citramalato sintasa (EC 2.3.1.182) cataliza la conversión de acetil-CoA y piruvato en citramalato y coenzima A. Enzimas ejemplares se describen en Ejemplo I.

[0526] EC 2.8.3.a CoA transferasa (Paso E). CoA transferasas catalizan la transferencia reversible de una fracción CoA de una molécula a otra. Dos transformaciones en Figura 16E utilizan una CoA transferasa: conversión de citramalil-CoA en citramalato y activación de itaconato a itaconil-CoA. Citramalil-CoA transferasa (EC 2.8.3.7 y 2.8.3.11) transfiere una fracción CoA de citramalil-CoA a un donador. Una enzima citramalato:succinil-CoA transferasa es activa en el ciclo de 3-hidroxipropionato de la asimilación de glioxilato. Eenzimas ejemplares se describen en Ejemplo I.

[0527] EC 3.2.1.a CoA hidrolasa. Enzimas en la familia 3.1.2 hidrolizan moléculas de acil-CoA a sus correspondientes ácidos. Varias CoA hidrolasas con amplias gamas de sustratos son candidatas apropiados para exhibir actividad citramalil-CoA hidrolasa. Enzimas ejemplares se describen en Ejemplo I.

[0528] EC 4.1.1.a Descarboxilasa. El paso final de la síntesis de MAA en Figura 16E es la descarboxilación de mesaconato o citraconato. Enzimas ejemplares se describen en Ejemplo I.

[0529] EC 4.1.3.a Liasa. Citramalil-CoA liasa (EC 4.1.3.25) convierte acetil-CoA y piruvato en citramalil-CoA. Esta enzima participa en el ciclo de 3-hidroxipropionato (3-HP) de la asimilación de glioxilato, donde actúa en la dirección de degradación de citramalil-CoA. Enzimas ejemplares se describen en Ejemplo I.

[0530] EC 4.2.1.a Deshidratasa. La deshidratación de citramalato a citraconato se cataliza por una enzima con actividad citramalato deshidratasa (formadora de citraconato) (EC 4.2.1.35). Esta enzima, junto con la citramalato sintasa, participa en la vía de la biosíntesis de isoleucina, independiente de treonina, caracterizada

en *Methanocaldococcus jannaschii* y *Leptospira interrrogans*. La deshidratación de citramalato en estos organismos, se cataliza por isopropilmalato isomerasa (IPMI), la cual cataliza tanto la deshidratación de citramalato a citraconato como la subsiguiente trans-adición de agua a citraconato para formar metilmalato (Xu et al., *J Bacteriol.* 186:5400-5409 (2004); Drevland et al., *J Bacteriol.* 189:4391-4400 (2007)). Enzimas ejemplares se describen en Ejemplo I.

[0531] EC 5.2.1.a Cis/trans isomerasa. La cis/trans isomerización de mesaconato y citraconato se cataliza por una enzima con actividad citraconato isomerasa. Candidatas apropiadas incluyen aconitato isomerasa (EC 5.3.3.7), maleato *cis,trans*-isomerasa (EC 5.2.1.1), maleilacetona *cis,trans*-isomerasa y *cis,trans*-isomerasa de ácidos grasos insaturados (Cti). Aconitato isomerasa interconvierte *cis*- y *trans*-aconitato. Enzimas ejemplares se describen en Ejemplo I.

[0532] EC 5.3.3.a Delta-isomerasa. La conversión de itaconato en citraconato se cataliza por itaconato delta-isomerasa. Enzimas ejemplares se describen en Ejemplo I.

[0533] EC 6.2.1 CoA sintetasa. La conversión de citramalil-CoA en citramalato e itaconato en itaconil-CoA puede catalizarse por una CoA ácido-tiol ligasa o CoA sintetasa en la familia de enzimas 6.2.1. Enzimas ejemplares se describen en Ejemplo I.

[0534] Un ciclo de los TCA reductores activos mejora el rendimiento del producto derivado de acetil-CoA, ácido metacrílico (MAA), como se muestra en las vías ejemplares de Figura 19. Vías del ciclo de los TCA reductores se describe aquí, así como la conversión de acetil-CoA y/o piruvato mediante el intermediario citramalato en ácido metacrílico (véase también Figuras 1 y 16E y Ejemplo I). Figuras 19A y 19B muestran vías ejemplares. Figura 19A muestra las vías para fijación de CO_2 a acetil-CoA y piruvato usando el ciclo de los TCA reductores. Figura 19B muestra vías ejemplares para la biosíntesis de metacrilato a partir de acetil-CoA y piruvato; las transformaciones enzimáticas mostradas se llevan a cabo por las siguientes enzimas: 1. Citramalato sintasa, 2. Citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), 3. Citraconato descarboxilasa, 4. Citramalil-CoA liasa, 5. Citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, 6. Citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), 7. Citraconato isomerasa, 8. Mesaconato descarboxilasa, 9. Aconitato descarboxilasa, 10. Itaconato isomerasa, 11. Itaconil-CoA transferasa o sintetasa, 12. Itaconil-CoA hidratasa.

[0535] Un ciclo de los TCA reductores activos mejora el rendimiento del producto derivado de acetil-CoA, ácido metacrílico (MAA), como se muestra en las vías ejemplares de Figura 20. Las vías del ciclo de los TCA reductores se describen aquí, así como la conversión de acetil-CoA a ácido metacrílico o ácido 2-hidroxiisobutírico (véase además Figuras 8 y Ejemplo X). Figuras 20A y 20B muestran vías ejemplares. Figura 20A muestra las vías para fijación de CO_2 a acetil-CoA usando el ciclo de los TCA reductores. Figura 20B muestra vías ejemplares para la biosíntesis de ácido metacrílico y ácido 2-hidroxiisobutírico a partir de acetil-CoA.

[0536] Un ciclo de los TCA reductores activos mejora el rendimiento del producto derivado de acetil-CoA, ácido metacrílico (MAA), como se muestra en las vías ejemplares de Figura 21. Vías del ciclo de los TCA reductores se describen aquí, así como la conversión de acetil-CoA mediante el intermediario 3-hidroxiisobutiril-CoA en ácido metacrílico (véase también Figuras 5, 8 y 9 y Ejemplos VII, X, XI y XIV). Figuras 21A y 21B muestran vías ejemplares. Figura 21A muestra las vías para la fijación de CO_2 a acetil-CoA usando el ciclo de los TCA reductores. Figura 21B muestra vías ejemplares para la biosíntesis de ácido metacrílico y ácido 3-hidroxiisobutírico a partir de acetil-CoA; las transformaciones enzimáticas mostradas se llevan a cabo por las siguientes enzimas: 1) Acetoacetil-CoA tiolasa (AtoB), 2) 3-Hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa (Hbd), 3) Crotonasa (Crt), 4) Crotonil-CoA hidratasa (4-Budh), 5) 4-Hidroxibutiril-CoA mutasa, 6) 3-Hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa, sintetasa, o transferasa, 7) ácido 3-hidroxiisobutírico deshidratasa, 8) 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, 9) metacrilil-CoA hidrolasa, sintetasa, o transferasa. Crotonil-CoA hidratasa, formadora de 4-hidroxibutirl-CoA, es la reacción inversa de 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, las cuales catalizan la conversión reversible de 4-hidroxibutiril-CoA en Crotonil-CoA (véase Ejemplo XIV). Por consiguiente, en una modalidad de la invención, una vía de ácido metacrílico comprende acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, también designada aquí como 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa (véase Figuras 9 y 21), crotonasa, 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, también designada aquí como crotonil-CoA hidratasa, 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa. Alternativamente, una vía de ácido metacrílico comprende acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, 4-

hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa (véase Figura 21).

EJEMPLO XXIII

Ácido Carboxílico Reductasas Ejemplares

[0537] Este ejemplo describe el uso de ácido carboxílico reductasas para llevar a cabo la conversión de un ácido carboxílico en un aldehído.

[0538] 1.2.1.e Ácido reductasa. La conversión de ácidos inactivados en aldehídos puede llevarse a cabo por una ácido reductasa. Ejemplos de tales conversiones incluyen, pero no se limitan a, la conversión de 4-hidroxibutirato, succinato, alfa-ketoglutarato, y 4-aminobutirato en 4-hidroxibutanal, succinato semialdehído, 2,5-dioxopentanoato, y 4-aminobutanal, respectivamente. Una ácido carboxílico reductasa notable puede hallarse en *Nocardia iowensis*, la cual cataliza la reducción, dependiente de magnesio, de ATP y NADPH, de ácidos carboxílicos a sus correspondientes aldehídos (Venkitasubramanian et al., *J. Biol. Chem.* 282:478-485 (2007)). Esta enzima se codifica por el gen *car* y se clonó y expresó funcionalmente en *E. coli* (Venkitasubramanian et al., *J. Biol. Chem.* 282:478-485 (2007)). La expresión del producto del gen *npt* mejoró la actividad de la enzima mediante modificación pos-transcripcional. El gen *npt* codifica una fosfopanteteína transferasa (PPTasa) específica, que convierte la apoenzima inactiva en la holoenzima activa. El sustrato natural de esta enzima es ácido vanílico, y la enzima exhibe una amplia aceptación de sustratos alifáticos y aromáticos (Venkitasubramanian et al., in *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*, ed. R.N. Patel, Chapter 15, pp. 425-440, CRC Press LLC, Boca Raton, FL. (2006)).

Gen	No. de Accesión	GI No.	Organismo
car	AAR91681.1	40796035	*Nocardia iowensis* (sp. NRRL 5646)
npt	ABI83656.1	114848891	*Nocardia iowensis* (sp. NRRL 5646)

[0539] Genes *car* y *npt* adicionales pueden identificarse basándose en homología de secuencia.

Gen	No. de Accesión	GI No.	Organismo
fadD9	YP_978699.1	121638475	*Mycobacterium bovis* BCG
BCG_2812c	YP_978898.1	121638674	*Mycobacterium bovis* BCG

nfa20150	YP_118225.1	54023983	*Nocardia farcinica* IFM 10152
nfa40540	YP_120266.1	54026024	*Nocardia farcinica* IFM 10152
SGR_6790	YP_001828302.1	182440583	*Streptomyces griseus* subsp. griseus NBRC 13350
SGR_665	YP_001822177.1	182434458	*Streptomyces griseus* subsp. griseus NBRC 13350

[0540] Una enzima candidata adicional hallada en *Streptomyces griseus* se codifica por los genes *griC* y *griD*. Se cree que esta enzima convierte ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico en 3-amino-4-hidroxibenzaldehído como deleción de *griC* o *griD* [que llevó] a la acumulación de ácido 3-acetilamino-4-hidroxibenzoico extracelular, un producto del ciclo del metabolismo del ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico (Suzuki, et al., *J. Antibiot.* 60(6):380-387 (2007)). La co-expresión de *griC* y *griD* con SGR_665, una enzima similar en secuencia al *npt* de *Nocardia iowensis* puede ser beneficiosa.

Gen	**No.de Accesión**	**GI No.**	**Organismo**
griC	182438036	YP_001825755.1	*Streptomyces griseus* subsp. griseus NBRC 13350
griD	182438037	YP_001825756.1	*Streptomyces griseus* subsp. griseus NBRC 13350
MSMEG_2956	YP_887275.1	YP_887275.1	*Mycobacterium smegmatis MC2 155*
MSMEG_5739	YP_889972.1	118469671	*Mycobacterium smegmatis MC2 155*
MSMEG_2648	YP_886985.1	118471293	*Mycobacterium*

			smegmatis MC2 155
MAP1040c	NP_959974.1	41407138	*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K-10
MAP2899c	NP_961833.1	41408997	*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K-10
MMAR_2117	YP_001850422.1	183982131	*Mycobacterium marinum M*
MMAR_2936	YP_001851230.1	183982939	*Mycobacterium marinum M*
MMAR_1916	YP_001850220.1	183981929	*Mycobacterium marinum M*
TpauDRAFT_33060	ZP_04027864.1	227980601	*Tsukamurella paurometabola DSM 20162*
TpauDRAFT_20920	ZP_04026660.1	227979396	*Tsukamurella paurometabola DSM 20162*
CPCC7001_1320	ZP_05045132.1	254431429	*Cyanobium PCC7001*
DDBDRAFT_0187729	XP_636931.1	66806417	*Dictyostelium discoideum AX4*

[0541] Una enzima con características similares, alfa-aminoadipato reductasa (AAR, EC 1.2.1.31), participa en las vías de la biosíntesis de lisina en algunas especies fúngicas. Esta enzima reduce naturalmente alfa-aminoadipato a alfa-aminoadipato semialdehído. El grupo carboxilo se activa primeramente por la formación, dependiente de ATP, de un adenilato que se reduce entonces por NAD(P)H para producir el aldehído y AMP. Al igual que CAR, esta enzima utiliza magnesio y requiere activación por una PPTasa. Enzimas candidatas para AAR y su correspondiente PPTasa se encuentran en *Saccharomyces cerevisiae* (Morris

et al., *Gene* 98:141-145 (1991)), *Candida albicans* (Guo et al., *Mol. Genet. Genomics* 269:271-279 (2003)), y *Schizosaccharomyces pombe* (Ford et al., *Curr. Genet.* 28:131-137 (1995)). La AAR de *S. pombe* exhibió actividad significativa cuando se expresó en *E. coli* (Guo et al., *Yeast* 21:1279-1288 (2004)). La AAR de *Penicillium chrysogenum* acepta S-carboximetil-L-cisteína como sustrato alternativo, pero no reaccionó con adipato, L-glutamato o diaminopimelato (Hijarrubia et al., *J. Biol. Chem.* 278:8250-8256 (2003)). El gen que codifica la PPTasa de *P. chrysogenum* no se ha identificado hasta la fecha.

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

[0542] Clonación y Expresión de Ácido Carboxílico Reductasa. *Escherichia coli* se usa como un organismo diana para generar mediante ingeniería genética la vía para ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. *E. coli* proporciona un hospedero excelente para generar un microorganismo no existente por naturaleza capaz de producir ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. *E. coli* es receptiva a manipulación genética y se conoce por ser capaz de producir efectivamente varios intermediarios y productos bajo varias condiciones de oxigenación.

[0543] Para generar una cepa de un organismo microbiano tal como una cepa de *E. coli* generada mediante ingeniería genética para producir ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, ácidos nucleicos que codifican una ácido carboxílico reductasa y fosfopanteteína transferasa se expresan en *E. coli* usando técnicas bien conocidas de biología molecular (véase, por ejemplo, Sambrook, supra, 2001; Ausubel supra, 1999). En particular, genes *car* de *Nocardia iowensis* (designada 720), *Mycobacterium smegmatis* mc(2)155

(designada 890), *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* K-10 (designada 891) y *Mycobacterium marinum M* (designada 892) se clonaron en vectores pZS*13 (Expressys, Ruelzheim, Germany) bajo control de promotores PA1/lacO. El gen *npt* (ABI83656.1) (es decir, 721) se clonó en el vector pKJL33S, un derivado del vector plásmido mini-F original PML31 bajo control de promotores y sitios de unión ribosómicos similares a los usados en pZS*13.

[0544] El gen *car* (GNM_720) se clonó por PCR de ADN genómico de *Nocardia*. Sus secuencias proteicas y de ácido nucleico se muestran en Figuras 22A y 22B, respectivamente. Una versión optimizada en codones del gen *npt* (GNM_721) se sintetizó por GeneArt (Regensburg, Germany). Sus secuencias proteicas y de ácido nucleico se muestran en Figuras 23A y 23B, respectivamente. Las secuencias proteicas y de ácido nucleico para los genes mc(2)155 de *Mycobacterium smegmatis* (designado 890), K-10de *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (designado 891) y *Mycobacterium marinum M* (designado 892) y enzimas pueden hallarse en Figuras 24, 25 y 26, respectivamente. Los plásmidos se transforman en una célula hospedera para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la producción de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato.

[0545] Se generaron variantes CAR adicionales. Una versión optimizada en codones de CAR 891 se generó y designó 891GA. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de CAR 891GA se muestran en Figuras 27A y 27B, respectivamente. Se generaron más de 2000 variantes CAR. En particular, combinaciones de todos los 20 aminoácidos se hicieron en las posiciones V295, M296, G297, G391, G421, D413, G414, Y415, G416, y S417, y se analizaron asimismo variantes. Variantes CAR ejemplares incluyen: E16K; Q95L; L100M; A1011T; K823E; T941S; H15Q; D198E; G446C; S392N; F699L; V883I; F467S; T987S; R12H; V295G; V295A; V295S; V295T; V295C; V295V; V295L; V295I; V295M; V295P; V295F; V295Y; V295W; V295D; V295E; V295N; V295Q; V295H; V295K; V295R; M296G; M296A; M296S; M296T; M296C; M296V; M296L; M296I; M296M; M296P; M296F; M296Y; M296W; M296D; M296E; M296N; M296Q; M296H; M296K; M296R; G297G; G297A; G297S; G297T; G297C; G297V; G297L; G297I; G297M; G297P; G297F; G297Y; G297W; G297D; G297E; G297N; G297Q; G297H; G297K; G297R; G391G; G391A; G391S; G391T; G391C; G391V; G391L; G391I; G391M; G391P; G391F; G391Y; G391W; G391D; G391E; G391N; G391Q; G391H; G391K; G391R; G421G; G421A; G421S; G421T; G421C; G421V; G421L; G421I G421M; G421P; G421F; G421Y; G421W; G421D; G421E; G421N; G421Q;

G421H; G421K; G421R; D413G; D413A; D413S; D413T; D413C; D413V; D413L; D413I; D413M; D413P; D413F; D413Y; D413W; D413D; D413E; D413N; D413Q; D413H; D413K; D413R; G414G; G414A; G414S; G414T; G414C; G414V; G414L; G414I; G414M; G414P; G414F; G414Y; G414W; G414D; G414E; G414N; G414Q; G414H; G414K; G414R; Y415G; Y415A; Y415S; Y415T; Y415C; Y415V; Y415L; Y415I; Y415M; Y415P; Y415F; Y415Y; Y415W; Y415D; Y415E; Y415N; Y415Q; Y415H; Y415K; Y415R; G416G; G416A; G416S; G416T; G416C; G416V; G416L; G416I; G416M; G416P; G416F; G416Y; G416W; G416D; G416E; G416N; G416Q; G416H; G416K; G416R; S417G; S417A; S417S; S417T; S417C; S417V S417L; S417I; S417M; S417P; S417F; S417Y; S417W; S417D; S417E; S417N; S417Q; S417H; S417K; y S417R.

[0546] Las variantes CAR se detectaron selectivamente con respecto a su actividad, y se encontró que numerosas variantes CAR exhibían actividad CAR.

[0547] Este ejemplo describe el uso de CAR para convertir ácidos carboxílicos en aldehídos.

EJEMPLO XXIV

VÍA PARA LA CONVERSIÓN DE 4-HIDROXIBUTIRIL-COA EN METACRILATO DE METILO

[0548] Este ejemplo describe una vía para convertir 4-hidroxibutiril-CoA en metacrilato de metilo como un éster de metacrilato ejemplar.

[0549] Una vía ejemplar a metacrilato de metilo se muestra en Figura 30. Concretamente, 4-hidroxibutiril-CoA puede convertirse en 3-hidroxibutiril-CoA, como ya se describió. 3-Hidroxiisobutiril-CoA puede convertirse en 3-hidroxiisobutirato metil éster como se muestra en Figura 30 usando una alcohol transferasa, como ya se describió, en particular una metil transferasa (véase Ejemplo III; véase también WO/2007/039415 y la Patente de los Estados Unidos No. 7,901,915). 3-Hidroxiisobutirato metil éster puede convertirse en metacrilato de metilo por una deshidratasa o por conversión química, como ya se describió, por ejemplo, para la conversión de metacrilato en ésteres de metacrilato (véase Figura 2). Deshidratasas ejemplares incluyen las ya descritas, por ejemplo, en Ejemplos V, VI, X y XII.

[0550] Ácidos nucleicos (especialmente un ADN) que codifican una enzima capaz de efectuar la transferencia de una fracción alcohol de un material de partida alcohol como se define aquí a (met)acrilil CoA bajo eliminación de la fracción CoA, tal como una clase de enzimas transferasa (EC 2) o hidrolasa (EC 3), v.gr. lipasa, esterasa (tal como acetil colina esterasa), transferasa (tal como

colina acetil transferasa), proteasa o acilasa (tal como aminoacilasa) (incluyendo codificar una o más de tales enzimas).

[0551] Una enzima del grupo 2 EC, que es una transferasa incluye, por ejemplo, transaminasas, transamidasas, transcetolasas, transfosforilasas o colina acetil transferasa que son conocidas por catalizar el movimiento de un grupo químico de un compuesto a otro. Una clase 3 EC; hidrolasa, la cual es igualmente capaz de catalizar las reacciones de transesterificación, incluye, por ejemplo, lipasas de *Candida antartica* (CAL B), lipasa pancreáctica porcina (PPL - *porcine pancreatic lipase*), *Candid rugosa* (CRL) *Pseudomonas cepacia* (PCL) y similares; esterasas tales como esterasa de hígado porcino (PLE - *pig liver esterase*) acetil colina esterasa; al igual que proteasas tales como subtilisina proteasa, por ejemplo de *Aspergillus* spp., *Bacillus* spp., *Rhizopus* spp y otras hidrolasas, tales como penicilina amidasa o, por ejemplo, L-amino acilasa, pueden ser enzimas apropiadas para catalizar la transferencia.

[0552] Estas enzimas pueden derivarse de un procariota tal como una bacteria, un eucariota o un organismo superior, tal como lipasa de *Candida* spp., esterasa o colina acetil transferasa de células de mamífero, y pueden suministrarse a la reacción como tal. Alternativamente, pueden producirse también biosintéticamente a partir materiales de partida apropiados derivados de biomasa.

[0553] Aunque este ejemplo describe la conversión en metacrilato a partir de metilo, se entiende por los expertos en el arte que pueden elaborarse otros ésteres de metacrilato usando una vía similar y seleccionando una transferasa apropiada para el éster deseado.

EJEMPLO XXV

CONVERSIÓN DE 3-HIDROXIISOBUTIRATO, 2-HIDROXIISOBUTIRATO, 3-HIDROXIISOBUTIRIL-COA O 2-HYRDOXYISOBUTIRIL-COA EN UN ÉSTER DE METACRILATO

[0554] Este ejemplo describe La conversión de 3-hidroxiisobutirato, 2-hidroxiisobutirato, 3-hidroxiisobutiril-CoA o 2-hidroxiisobutiril-CoA en un éster de metacrilato.

[0555] Escenarios alternativos incluidos aquí son:

(1) A. Azúcares en 3-hidroxiisobutiril-CoA (enzimática, vías descritas previamente), B. 3-hidroxiisobutiril-CoA en éster de 3-hidroxiisobutirato por una alcohol transferasa, C. éster de 3-hidroxiisobutirato en éster de metacrilato por una enzima deshidratasa o conversión química

(2) A. Azúcares en 2-hidroxiisobutiril-CoA (enzimática, vías descritas previamente), B. 2-hidroxiisobutiril-CoA en éster de 2-hidroxiisobutirato por una alcohol transferasa, C. éster de 2-hidroxiisobutirato en éster de metacrilato por una enzima deshidratasa o conversión química

(3) A. Azúcares en 3-hidroxiisobutirato (enzimática, vías descritas previamente), B. 3-hidroxiisobutirato en éster de 3-hidroxiisobutirato por una enzima formadora de éster de 3-hidroxiisobutirato, C. éster de 3-hidroxiisobutirato en éster de metacrilato por una enzima deshidratasa o conversión química

(4) A. Azúcares en 2-hidroxiisobutirato (enzimática, vías descritas previamente), B. 2-hidroxiisobutirato en éster de 2-hidroxiisobutirato por una enzima formadora de éster de 2-hidroxiisobutirato, C. éster de 2-hidroxiisobutirato en éster de metacrilato por una enzima deshidratasa o conversión química

(5) A. 3-Hidroxiisobutirato exógeno suministrado a un organismo (podría ser un producto de otro organismo (es decir, co-cultivo o fermentación separada) o podría derivarse de otras fuentes), B. 3-hidroxiisobutirato en éster de 2-hidroxiisobutirato por una enzima formadora de éster de 3-hidroxiisobutirato, C. éster de 3-hidroxiisobutirato en éster de metacrilato por una enzima deshidratasa o conversión química

(6) A. 3-Hidroxiisobutirato exógeno suministrado a un organismo (podría ser un producto de otro organismo (es decir, co-cultivo o fermentación separada) o podría derivarse de otras fuentes), B. 3-hidroxiisobutirato en 3-hidroxiisobutiril-CoA por una CoA transferasa o sintetasa, C. formación de éster de 3-hidroxiisobutirato por una enzima alcohol transferasa, C. éster de 3-hidroxiisobutirato en éster de metacrilato por una enzima deshidratasa o conversión química

(7) A. 2-Hidroxiisobutirato exógeno suministrado a un organismo (podría ser un producto de otro organismo (es decir, co-cultivo o fermentación separada) o podría derivarse de otras fuentes), B. 2-hidroxiisobutirato en éster de 2-hidroxiisobutirato por una enzima formadora de éster de 2-hidroxiisobutirato, C. éster de 2-hidroxiisobutirato en éster de metacrilato por una enzima deshidratasa o conversión química

(8) A. 2-Hidroxiisobutirato exógeno suministrado a un organismo (podría ser un producto de otro organismo (es decir, co-cultivo o fermentación separada) o podría derivarse de otras fuentes), B. 2-hidroxiisobutirato en 2-hidroxiisobutiril-CoA por una CoA transferasa o sintetasa, C. formación de éster de 2-hidroxiisobutirato por una enzima alcohol transferasa, C. éster de 2-hidroxiisobutirato en éster de metacrilato por una enzima deshidratasa o conversión química

[0556] Vías a ésteres de metacrilato a partir de 3-hidroxibutirato, 2-hidroxibutirato, 3-hidroxiisobutiril-CoA y 2-hidroxiisobutiril-CoA se muestran en Figuras 28 y 29. Vías ejemplares a estos precursores de éster de metacrilato se han descrito previamente en esta solicitud y se muestran en Figuras 3, 5 y 8. 3-Hidroxibutirato puede formarse a partir de succinil-CoA por la vía mostrada en Figura 3 o a partir de 4-hidroxibutiril-CoA, como se muestra en Figura 5. 3-Hidroxibutiril-CoA puede formarse a partir de 4-hidroxibutiril-CoA por la vía mostrada en Figura 5. 2-Hidroxiisobutirato y 2-hidroxibutiril-CoA pueden formarse por la vía descrita en Figura 8.

[0557] 2-Hidroxiisobutirato y su CoA éster, 2-hidroxiisobutiril-CoA, pueden interconvertirse por una 2-hidroxiisobutiril-CoA transferasa o 2-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa. Análogamente, 3-hidroxiisobutirato y su CoA éster, 3-hidroxiisobutiril-CoA, pueden interconvertirse por una 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa. Enzimas CoA transferasas y sintetasas ejemplares se describen más arriba en Ejemplos I y VII.

[0558] La deshidratación de éster 3-hidroxiisobutírico a éster metacrílico puede llevarse a cabo bajo condiciones similares a la deshidratación de ácido 3-hidroxiisobutírico a ácido metacrílico. Estas condiciones de reacción son moderadas (referencia: solicitud de Patente de los Estados Unidos 20100068773).

[0559] La deshidratación química de éster de 2-hidroxiisobutirato a éster de metacrilato es análoga a la deshidratación de ácido 2-hidroxiisobutírico a ácido metacrílico, la cual se divulga, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos No. 3,666,805 y 5,225,594. En estas referencias, ácido 2-hidroxiisobutírico se deshidrata usando óxidos e hidróxidos de metal, resinas de intercambio iónico, alúmina, sílice, aminas, fosfinas, alcóxidos de metales alcalinos o carboxilatos, a temperaturas de reacción típicamente entre 160-250 grados C. En un método (Patente de los Estados Unidos No. 5,225,594), ácido 2-hidroxiisobutírico e hidróxido de sodio se hicieron reaccionar a 185 – 195 grados C bajo vacío (300 torr) con agitación, resultando en una conversión de 97,1% de ácido 2-

hidroxiisobutírico, y un rendimiento de 96% de ácido metacrílico. Un enfoque similar podría aplicarse para deshidratar éster 2-hidroxiisobutírico a éster metacrílico.

[0560] De principio a fin de esta solicitud se han referenciado varias publicaciones. Las divulgaciones de estas publicaciones en su totalidad, incluyendo publicaciones de GenBank y Número GI, se incorporan aquí por referencia en esta solicitud, con el fin de describir más completamente el estado del arte al cual pertenece esta invención. Aunque la invención se ha descrito con referencia a los Ejemplos señalados aquí, debe entenderse que pueden introducirse varias modificaciones, sin apartarse del espíritu de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un organismo microbiano no existente por naturaleza que tiene una vía de ácido metacrílico, el citado organismo microbiano conteniendo por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, la citada vía de ácido metacrílico comprendiendo una vía seleccionada de:

(a) citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), y citraconato descarboxilasa;

(b) citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa;

(c) citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), citraconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa;

(d) citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), y mesaconato descarboxilasa;

(e) citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), y citraconato descarboxilasa;

(f) citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa;

(g) citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), y mesaconato descarboxilasa;

(h) citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), citraconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa;

(i) aconitato descarboxilasa, itaconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa;

(j) aconitato descarboxilasa, itaconato isomerasa, citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa;

(k) aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), y citraconato descarboxilasa;

(l) aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa;

(m) aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), y mesaconato descarboxilasa; y

(n) aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), citraconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa;

(o) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; y

(p) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa.

2. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 1, en donde el citado organismo microbiano comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de ácido metacrílico.

3. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 2, en donde el citado organismo microbiano comprende ácidos nucleicos exógenos que codifican cada una de las enzimas de por lo menos una de las vías seleccionadas de (a)-(p).

4. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 1, en donde el citado organismo microbiano no existente por naturaleza comprende además una vía de éster de metacrilato, que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de éster de metacrilato, expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de metacrilato, la citada vía de éster de metacrilato comprendiendo metacrilil-CoA sintetasa, metacrilil-CoA transferasa, y alcohol transferasa.

5. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 4, en donde el citado organismo microbiano comprende dos o tres ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de éster de metacrilato.

6. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 4, en donde los citados tres ácidos nucleicos exógenos codifican metacrilil-CoA sintetasa, metacrilil-CoA transferasa, y alcohol transferasa.

7. Un organismo microbiano no existente por naturaleza que tiene una vía de éster de metacrilato, el citado organismo microbiano conteniendo por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de éster de metacrilato, expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de metacrilato, la citada vía de éster de metacrilato comprendiendo metacrilil-CoA transferasa.

8. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 7, en donde la vía de éster de metacrilato comprende además metacrilil-CoA sintetasa y alcohol transferasa.

9. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 7, en donde el citado organismo microbiano comprende dos o tres ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de éster de metacrilato.

10. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 7, en donde los citados tres ácidos nucleicos exógenos codifican metacrilil-CoA sintetasa, metacrilil-CoA transferasa y alcohol transferasa.

11. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 7, en donde el citado organismo microbiano no existente por naturaleza contiene además una vía de ácido metacrílico seleccionada de:

(a) citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), y citraconato descarboxilasa;

(b) citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa;

(c) citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), citraconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa;

(d) citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), y mesaconato descarboxilasa;

(e) citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), y citraconato descarboxilasa;

(f) citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa;

(g) citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), y mesaconato descarboxilasa;

(h) citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), citraconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa;

(i) aconitato descarboxilasa, itaconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa;

(j) aconitato descarboxilasa, itaconato isomerasa, citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa;

(k) aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), y citraconato descarboxilasa;

(l) aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa;

(m) aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), y mesaconato descarboxilasa;

(n) aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), citraconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa;

(o) 3-hidroxiisobutirato deshidratasa;

(p) metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa;

(q) metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa;

(r) metilmalonil-CoA mutasa, alcohol/aldehído deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa;

(s) metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, alcohol/aldehído deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa;

(t) metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-amino-2-metilpropionato transaminasa, y 3-amino-2-metilpropionato amoníaco liasa;

(u) metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-amino-2-metilpropionato transaminasa, y 3-amino-2-metilpropionato amoníaco liasa;

(v) 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa;

(w) aspartato aminotransferasa, glutamato mutasa, 3-metilaspartasa, y mesaconato descarboxilasa;

(x) alfa-ketoglutarato reductasa, 2-hidroxiglutamato mutasa, 3-metilmalato deshidratasa, y mesaconato descarboxilasa;

(y) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y metacrilil-CoA transferasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA sintetasa;

(z) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, enoil-CoA hidratasa, y 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa;

(aa) 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, vinilacetil-CoA □-isomerasa, crotonasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y cualquiera de metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA transferasa;

(bb) 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa;

(cc) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa, isobutiril-CoA mutasa, isobutiril-CoA deshidrogenasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa;

(dd) lactato deshidrogenasa, lactato-CoA transferasa, lactoil-CoA deshidratasa, acil-CoA deshidrogenasa, propionil-CoA carboxilasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa;

(ee) valina aminotransferasa, 2-ketoisovalerato deshidrogenasa, isobutiril-CoA deshidrogenasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa;

(ff) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; y

(gg) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa.

12. Un organismo microbiano no existente por naturaleza que tiene una vía de ácido metacrílico, el citado organismo microbiano conteniendo por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico; el citado organismo microbiano no existente por naturaleza comprendiendo además:

(i) una vía de los TCA reductores que comprende por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, u opcionalmente isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, citril-CoA sintetasa o citril-CoA liasa;

(ii) una vía de los TCA reductores que comprende por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o

(iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores;

en donde la citada vía de ácido metacrílico comprende una vía seleccionada de:

(a) citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), y citraconato descarboxilasa;

(b) citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa;

(c) citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), citraconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa;

(d) citramalato sintasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), y mesaconato descarboxilasa;

(e) citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), y citraconato descarboxilasa;

(f) citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa;

(g) citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), y mesaconato descarboxilasa;

(h) citramalil-CoA liasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), citraconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa;

(i) aconitato descarboxilasa, itaconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa;

(j) aconitato descarboxilasa, itaconato isomerasa, citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa;

(k) aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), y citraconato descarboxilasa;

(l) aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de citraconato), citraconato isomerasa, y mesaconato descarboxilasa;

(m) aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), y mesaconato descarboxilasa;

(n) aconitato descarboxilasa, itaconil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalil-CoA deshidratasa, citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa, citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato), citraconato isomerasa, y citraconato descarboxilasa;

(o) 3-hidroxiisobutirato deshidratasa;

(p) metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa;

(q) metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa;

(r) metilmalonil-CoA mutasa, alcohol/aldehído deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa;

(s) metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, alcohol/aldehído deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa;

(t) metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-amino-2-metilpropionato transaminasa, y 3-amino-2-metilpropionato amoníaco liasa;

(u) metilmalonil-CoA mutasa, metilmalonil-CoA epimerasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-amino-2-metilpropionato transaminasa, y 3-amino-2-metilpropionato amoníaco liasa;

(v) 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa;

(w) aspartato aminotransferasa, glutamato mutasa, 3-metilaspartasa, y mesaconato descarboxilasa;

(x) alfa-ketoglutarato reductasa, 2-hidroxiglutamato mutasa, 3-metilmalato deshidratasa, y mesaconato descarboxilasa;

(y) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y metacrilil-CoA transferasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA sintetasa;

(z) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, enoil-CoA hidratasa, y 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa;

(aa) 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, vinilacetil-CoA □-isomerasa, crotonasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, 2-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y cualquiera de metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA transferasa;

(bb) 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa;

(cc) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa, isobutiril-CoA mutasa, isobutiril-CoA deshidrogenasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa;

(dd) lactato deshidrogenasa, lactato-CoA transferasa, lactoil-CoA deshidratasa, acil-CoA deshidrogenasa, propionil-CoA carboxilasa, metilmalonil-CoA reductasa, 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa;

(ee) valina aminotransferasa, 2-ketoisovalerato deshidrogenasa, isobutiril-CoA deshidrogenasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa;

(ff) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa, y 3-hidroxiisobutirato deshidratasa; y

(gg) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, crotonasa, 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, 4-hidroxibutiril-CoA mutasa, 3-hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa, y metacrilil-CoA sintetasa o metacrilil-CoA hidrolasa o metacrilil-CoA transferasa.

13. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 12, en donde el citado organismo microbiano comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de ácido metacrílico.

14. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 13, en donde el citado organismo microbiano comprende ácidos nucleicos exógenos que codifican cada una de las enzimas de por lo menos una de las vías seleccionadas de (a)-(gg).

15. Un organismo microbiano no existente por naturaleza que tiene una vía de ácido 2-hidroxiisobutírico, el citado organismo microbiano conteniendo por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido 2-hidroxiisobutírico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido 2-hidroxiisobutírico; el citado organismo microbiano no existente por naturaleza comprendiendo además:

(i) una vía de los TCA reductores que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-

ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, u opcionalmente isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, citril-CoA sintetasa o citril-CoA liasa;

(ii) una vía de los TCA reductores que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o

(iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores;

en donde la citada vía de ácido 2-hidroxiisobutírico comprende una vía seleccionada de:

(a) acetoacetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA reductasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, y 2-hidroxiisobutiril-CoA transferasa o 2-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 2-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa; y

(b) 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, vinilacetil-CoA □-isomerasa, crotonasa, 3-hidroxibutiril-CoA mutasa, y cualquiera de 2-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 2-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 2-hidroxiisobutiril-CoA transferasa.

16. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 15, en donde el citado organismo microbiano comprende dos, tres, cuatro o cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de ácido metacrílico.

17. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 15, en donde el citado organismo microbiano comprende ácidos nucleicos exógenos que codifican cada una de las enzimas de por lo menos una de las vías seleccionadas de (a)-(b).

18. Un organismo microbiano no existente por naturaleza que tiene una vía de ácido 3-hidroxiisobutírico, el citado organismo microbiano conteniendo por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido 3-hidroxiisobutírico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido 3-hidroxiisobutírico; el citado organismo microbiano no existente por naturaleza comprendiendo además:

(i) una vía de los TCA reductores que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-

citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, u opcionalmente isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, citril-CoA sintetasa o citril-CoA liasa;

(ii) una vía de los TCA reductores que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o

(iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores;

en donde la citada vía de ácido 3-hidroxiisobutírico comprende una vía seleccionada de:

(a) 4-hidroxibutiril-CoA mutasa; y

(b) 4-hidroxibutiril-CoA mutasa y 3-hidroxiisobutiril-CoA sintetasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa o 3-hidroxiisobutiril-CoA transferasa.

19. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 18, en donde el citado organismo microbiano comprende dos ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de ácido metacrílico.

20. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 18, en donde el citado organismo microbiano contiene ácidos nucleicos exógenos que codifican cada una de las enzimas de por lo menos una de las vías seleccionadas de (a)-(b).

21. Un organismo microbiano no existente por naturaleza que tiene una vía 3-hidroxiisobutiril-CoA, el citado organismo microbiano conteniendo por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido 3-hidroxiisobutírico, expresada en una cantidad suficiente para producir ácido 3-hidroxiisobutírico; el citado organismo microbiano no existente por naturaleza comprendiendo además:

(i) una vía de los TCA reductores que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, u opcionalmente isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, citril-CoA sintetasa o citril-CoA liasa;

(ii) una vía de los TCA reductores que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o

(iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores;

en donde la citada vía de 3-hidroxiisobutiril-CoA comprende 4-hidroxibutiril-CoA mutasa.

22. Un organismo microbiano no existente por naturaleza que tiene una vía de éster de metacrilato, el citado organismo microbiano conteniendo por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de éster de metacrilato, expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de metacrilato, la citada vía de éster de metacrilato comprendiendo una alcohol transferasa o una enzima formadora de éster, y una deshidratasa.

23. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 22, en donde el citado organismo microbiano contiene dos ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de éster de metacrilato.

24. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 22, en donde los citados dos ácidos nucleicos exógenos codifican una alcohol transferasa y una deshidratasa o una enzima formadora de éster y una deshidratasa.

25. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 22, en donde la citada deshidratasa convierte un éster de 3-hidroxiisobutirato o un éster de 2-hidroxiisobutirato en el citado éster de metacrilato; o en donde la citada alcohol transferasa convierte 3-hidroxiisobutiril-CoA en un éster de 3-hidroxiisobutirato o una 2-hidroxiisobutiril-CoA en un éster de 2-hidroxiisobutirato.

26. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 22, en donde el citado organismo microbiano comprende una vía de éster de metacrilato que contiene:

(a) una 3-hidroxiisobutirato-CoA transferasa o una 3-hidroxiisobutirato-CoA sintetasa; una alcohol transferasa; y una deshidratasa;

(b) una enzima formadora de éster de 3-hidroxiisobutirato y una deshidratasa;

(c) una 2-hidroxiisobutirato-CoA transferasa o una 2-hidroxiisobutirato-CoA sintetasa; una alcohol transferasa; y una deshidratasa; o

(d) una enzima formadora de éster de 2-hidroxiisobutirato y una deshidratasa.

27. Un organismo microbiano no existente por naturaleza que tiene una vía de metacrilato de metilo, el citado organismo microbiano conteniendo por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de metacrilato de metilo, expresada en una cantidad suficiente para producir un metacrilato de metilo, la citada vía de metacrilato de metilo comprendiendo una alcohol transferasa o una enzima formadora de éster, y una deshidratasa.

28. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 27, en donde el citado organismo microbiano contiene dos ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de metacrilato de metilo.

29. El organismo microbiano no existente por naturaleza de la reivindicación 27, en donde los citados dos ácidos nucleicos exógenos codifican una alcohol transferasa y una deshidratasa o una enzima formadora de éster y una deshidratasa.

30. El organismo microbiano no existente por naturaleza de cualquiera de las reivindicaciones 7-11 y 21-29, que comprende además:

(i) una vía de los TCA reductores que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, u opcionalmente una isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, citril-CoA sintetasa o citril-CoA liasa;

(ii) una vía de los TCA reductores que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o

(iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores.

31. El organismo microbiano no existente por naturaleza de cualquiera de las reivindicaciones 12, 15, 18, 21 o 30, en donde el citado organismo microbiano que comprende (i) incluye además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima

seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, ferredoxina, y combinaciones de las anteriores.

32. El organismo microbiano no existente por naturaleza de cualquiera de las reivindicaciones 12, 15, 18, 21 o 30, en donde el citado organismo microbiano que comprende (ii) incluye además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, y combinaciones de las anteriores.

33. El organismo microbiano no existente por naturaleza de cualquiera de las reivindicaciones 12, 15, 18, 21 o 30, en donde el citado organismo microbiano contiene dos, tres, cuatro o cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno las enzimas de (i), (ii) o (iii).

34. El organismo microbiano no existente por naturaleza de cualquiera de las reivindicaciones 12, 15, 18, 21 o 30, en donde el citado organismo microbiano que comprende (i) incluye tres ácidos nucleicos exógenos que codifican una ATP-citrato liasa o citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa;

en donde el citado organismo microbiano que comprende (ii) incluye cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa o una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o

en donde el citado organismo microbiano que comprende (iii) incluye dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una CO deshidrogenasa y una H_2 hidrogenasa.

35. El organismo microbiano no existente por naturaleza de cualquiera de las reivindicaciones 1-34, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo, o en donde el citado organismo microbiano no existente por naturaleza está en un medio de cultivo sustancialmente anaerobio.

36. Un método para producir un éster de metacrilato que comprende cultivar un organismo microbiano no existente por naturaleza bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir un éster de 3-hidroxiisobutirato, un éster de 2-hidroxiisobutirato, o metil-3-hidroxiisobutirato, en donde el citado organismo microbiano no existente por naturaleza contiene un ácido nucleico exógeno que codifica una alcohol transferasa; o una enzima formadora de un éster

de 3-hidroxiisobutirato, una enzima formadora de un éster de 2-hidroxiisobutirato o una enzima formadora de un éster de metil-3-hidroxiisobutirato, expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de 3-hidroxiisobutirato, un éster de 2-hidroxiisobutirato o metil-3-hidroxiisobutirato, y deshidratar químicamente el citado éster de 3-hidroxiisobutirato o éster de 2-hidroxiisobutirato para producir un éster de metacrilato, o deshidratar químicamente el citado metil-3-hidroxiisobutirato para producir metacrilato de metilo.

37. El método de la reivindicación 36, en donde el citado organismo microbiano comprende:

una vía de un éster de 3-hidroxiisobutirato que incluye:

(a) una 3-hidroxiisobutirato-CoA transferasa o una 3-hidroxiisobutirato-CoA sintetasa; y una alcohol transferasa; o

(b) una enzima formadora de un éster de 3-hidroxiisobutirato; o

una vía de un éster de 2-hidroxiisobutirato que incluye:

(a) una 2-hidroxiisobutirato-CoA transferasa o una 2-hidroxiisobutirato-CoA sintetasa; y una alcohol transferasa; o

(b) una enzima formadora de un éster de 2-hidroxiisobutirato.

38. Un método para producir un éster de metacrilato que comprende cultivar un organismo microbiano no existente por naturaleza bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir un éster de 3-hidroxiisobutirato, un éster de 2-hidroxiisobutirato, o metil-3-hidroxiisobutirato, en donde el citado organismo microbiano no existente por naturaleza contiene un ácido nucleico exógeno que codifica una alcohol transferasa; o una enzima formadora de un éster de 3-hidroxiisobutirato, una enzima formadora de un éster de 2-hidroxiisobutirato, o una enzima formadora de un éster de metil-3-hidroxiisobutirato, expresada en una cantidad suficiente para producir un éster de 3-hidroxiisobutirato, un éster de 2-hidroxiisobutirato, o metil-3-hidroxiisobutirato, y el citado organismo microbiano no existente por naturaleza comprendiendo además:

(i) una vía de los TCA reductores que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, u opcionalmente isocitrato deshidrogenasa, aconitasa, citril-CoA sintetasa o citril-CoA liasa;

(ii) una vía de los TCA reductores que contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de los TCA reductores, en donde el

citado por lo menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o

(iii) por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una CO deshidrogenasa, una H_2 hidrogenasa, y combinaciones de las anteriores, y

deshidratar químicamente el citado un éster de 3-hidroxiisobutirato o éster de 2-hidroxiisobutirato para producir un éster de metacrilato; o deshidratar químicamente el citado metil-3-hidroxiisobutirato para producir metacrilato de metilo.

39. El método de la reivindicación 38, en donde el citado organismo microbiano comprende:

una vía de un éster de 3-hidroxiisobutirato que incluye:

(a) una 3-hidroxiisobutirato-CoA transferasa o una 3-hidroxiisobutirato-CoA sintetasa; y una alcohol transferasa; o

(b) una enzima formadora de un éster de 3-hidroxiisobutirato; o

una vía de un éster de 2-hidroxiisobutirato que incluye:

(a) una 2-hidroxiisobutirato-CoA transferasa o una 2-hidroxiisobutirato-CoA sintetasa; y una alcohol transferasa; o

(b) una enzima formadora de un éster de 2-hidroxiisobutirato.

40. El método de cualquiera de las reivindicaciones 38-39, en donde el citado organismo microbiano que comprende (i) incluye además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, una acetato cinasa, una fosfotransacetilasa, una acetil-CoA sintetasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, ferredoxina, y combinaciones de las anteriores.

41. El método de cualquiera de las reivindicaciones 38-39, en donde el citado organismo microbiano que comprende (ii) incluye además un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarasa, una malato deshidrogenasa, y combinaciones de las anteriores.

42. El método de cualquiera de las reivindicaciones 38-39, en donde el citado organismo microbiano que comprende (i) incluye tres ácidos nucleicos exógenos

que codifican una ATP-citrato liasa o citrato liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-ketoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa;

en donde el citado organismo microbiano que comprende (ii) incluye cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican una piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa o una fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una CO deshidrogenasa, y una H_2 hidrogenasa; o

en donde el citado organismo microbiano que comprende (iii) incluye dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una CO deshidrogenasa y una H_2 hidrogenasa.

43. Un método para producir ácido metacrílico, que comprende cultivar el organismo microbiano no existente por naturaleza de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 12-14 o 30-35, bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico.

44. Un método para producir un éster de metacrilato, que comprende cultivar el organismo microbiano no existente por naturaleza de cualquiera de las reivindicaciones 7-11, 22-29 o 30-35 bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir un éster de metacrilato.

45. Un método para producir ácido 2-hidroxiisobutírico, ácido 3-hidroxiisobutírico, o 3-hidroxiisobutiril-CoA, que comprende cultivar el organismo microbiano no existente por naturaleza de cualquiera de las reivindicaciones 15-21 o 30-35 bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido 2-hidroxiisobutírico, ácido 3-hidroxiisobutírico, o 3-hidroxiisobutiril-CoA.

46. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 36-45, en donde por lo menos uno de los citados ácidos nucleicos exógenos es un ácido nucleico heterólogo; o en donde el citado organismo microbiano no existente por naturaleza está en un medio de cultivo sustancialmente anaerobio.

EXTRACTO

La invención proporciona un organismo microbiano no existente por naturaleza que una vía de ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. El organismo microbiano contiene por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima en una vía de ácido metacrílico. La invención provee adicionalmente un método para producir ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato. El método puede incluir cultivar un organismo microbiano que produce ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, en donde el organismo microbiano expresa por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido metacrílico en una cantidad suficiente para producir ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato, bajo condiciones y durante un período suficiente de tiempo para producir ácido metacrílico, éster de metacrilato, 3-hidroxiisobutirato y/o 2-hidroxiisobutirato.

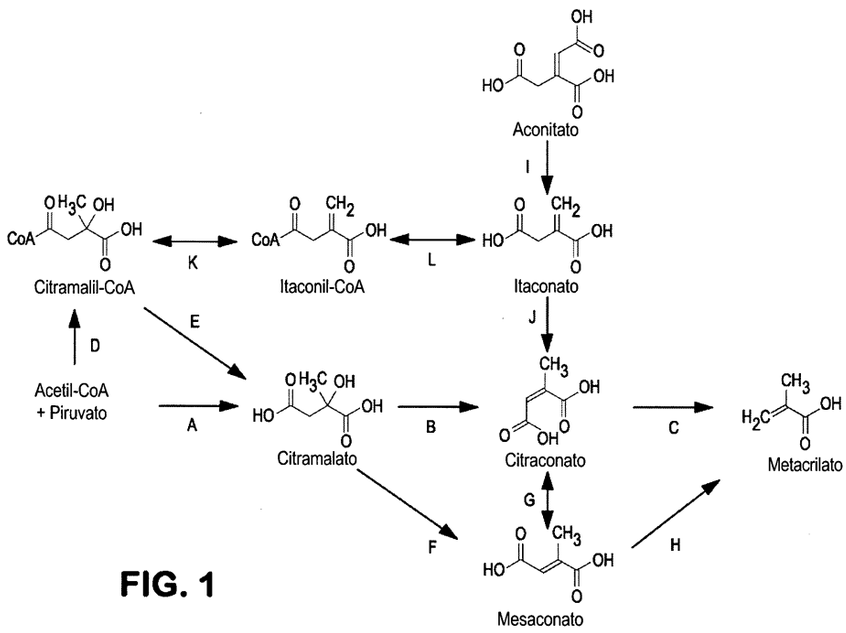

Aconitato
I
Citramalil-CoA
K
Itaconil-CoA
L
Itaconato
J
D
E
Acetil-CoA
+ Piruvato
A
Citramalato
B
Citraconato
C
Metacrilato
G
F
H
Mesaconato

FIG. 1

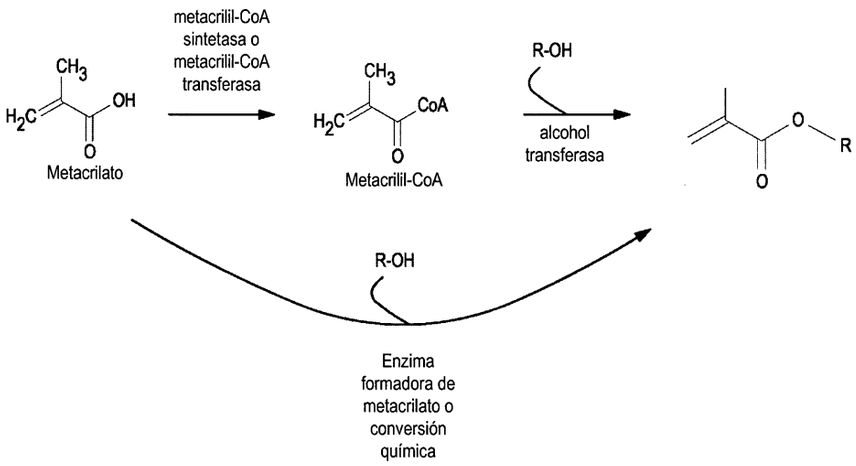

metacrilil-CoA
sintetasa o
metacrilil-CoA
transferasa
CH3
H2C
OH
O
Metacrilato
CH3
H2C
CoA
O
Metacrilil-CoA
R-OH
alcohol
transferasa
O
O
R
R-OH
Enzima
formadora de
metacrilato o
conversión
química

FIG. 2

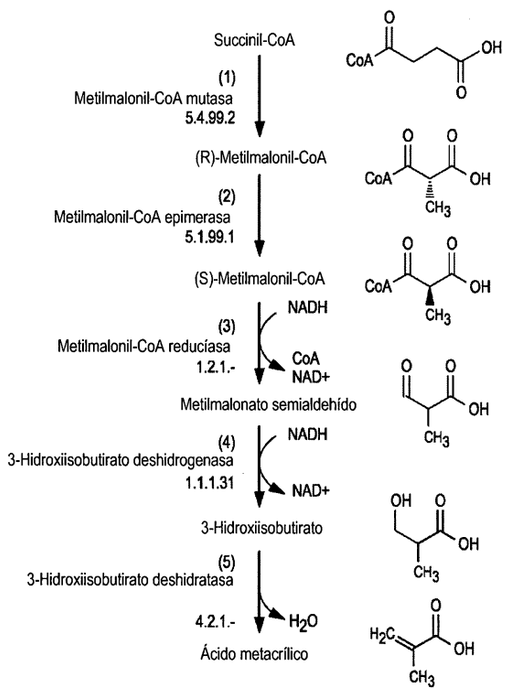

Succinil-CoA
(1)
Metilmalonil-CoA mutasa
5.4.99.2
(R)-Metilmalonil-CoA
(2)
Metilmalonil-CoA epimerasa
5.1.99.1
(S)-Metilmalonil-CoA
NADH
(3)
Metilmalonil-CoA reducíasa
1.2.1.-
CoA
NAD+
Metilmalonato semialdehído
NADH
(4)
3-Hidroxiisobutirato deshidrogenasa
1.1.1.31
NAD+
3-Hidroxiisobutirato
(5)
3-Hidroxiisobutirato deshidratasa
4.2.1.-
H2O
Ácido metacrílico

FIG. 3

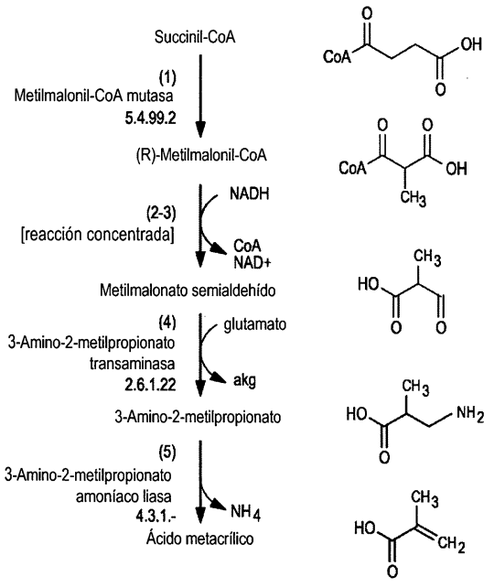

Succinil-CoA
(1)
Metilmalonil-CoA mutasa
5.4.99.2
(R)-Metilmalonil-CoA
NADH
(2-3)
[reacción concentrada]
CoA
NAD+
Metilmalonato semialdehído
(4)
3-Amino-2-metilpropionato
transaminasa
2.6.1.22
glutamato
akg
3-Amino-2-metilpropionato
(5)
3-Amino-2-metilpropionato
amoníaco liasa
4.3.1.-
NH4
Ácido metacrílico
CoA
OH
O
CH3
HO
NH2
CH2

FIG. 4

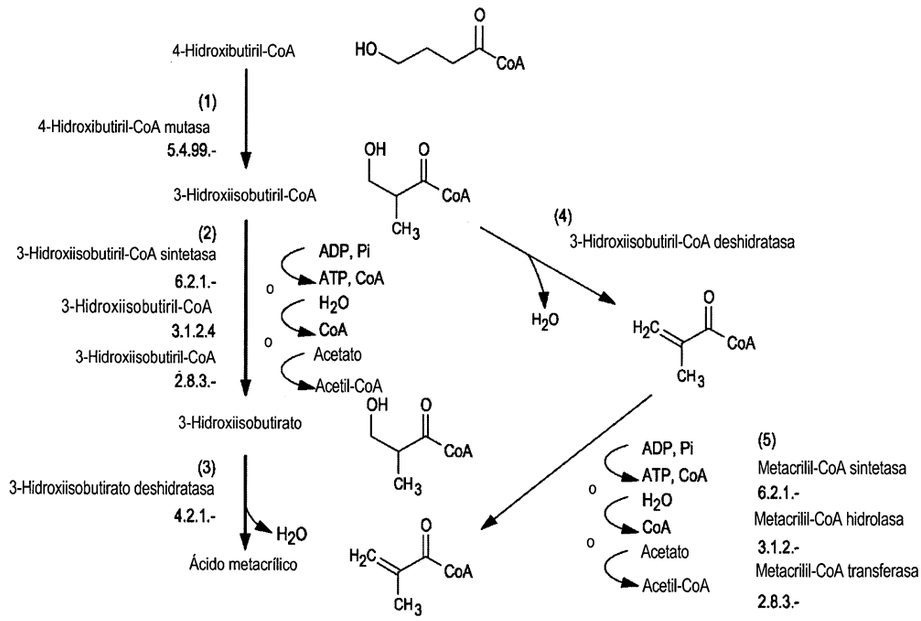

4-Hidroxibutiril-CoA
HO
O
CoA
(1)
4-Hidroxibutiril-CoA mutasa
5.4.99.-
3-Hidroxiisobutiril-CoA
OH
O
CoA
CH3
(2)
3-Hidroxiisobutiril-CoA sintetasa
6.2.1.-
3-Hidroxiisobutiril-CoA
3.1.2.4
3-Hidroxiisobutiril-CoA
2.8.3.-
ADP, Pi
ATP, CoA
H2O
CoA
Acetato
Acetil-CoA
(4)
3-Hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa
H2O
H2C
O
CoA
CH3
3-Hidroxiisobutirato
OH
O
CoA
CH3
(3)
3-Hidroxiisobutirato deshidratasa
4.2.1.-
H2O
Ácido metacrílico
H2C
O
CoA
CH3
ADP, Pi
ATP, CoA
H2O
CoA
Acetato
Acetil-CoA
(5)
Metacrilil-CoA sintetasa
6.2.1.-
Metacrilil-CoA hidrolasa
3.1.2.-
Metacrilil-CoA transferasa
2.8.3.-

FIG. 5

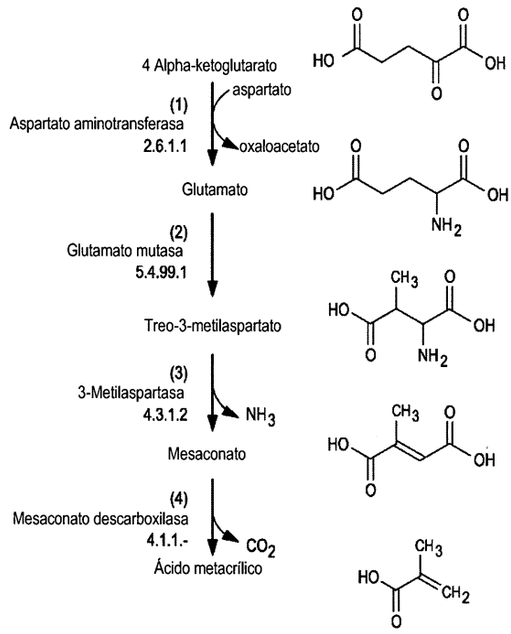

4 Alpha-ketoglutarato
aspartato
(1)
Aspartato aminotransferasa
2.6.1.1
oxaloacetato
Glutamato
(2)
Glutamato mutasa
5.4.99.1
Treo-3-metilaspartato
(3)
3-Metilaspartasa
4.3.1.2
NH3
Mesaconato
(4)
Mesaconato descarboxilasa
4.1.1.-
CO2
Ácido metacrílico

FIG. 6

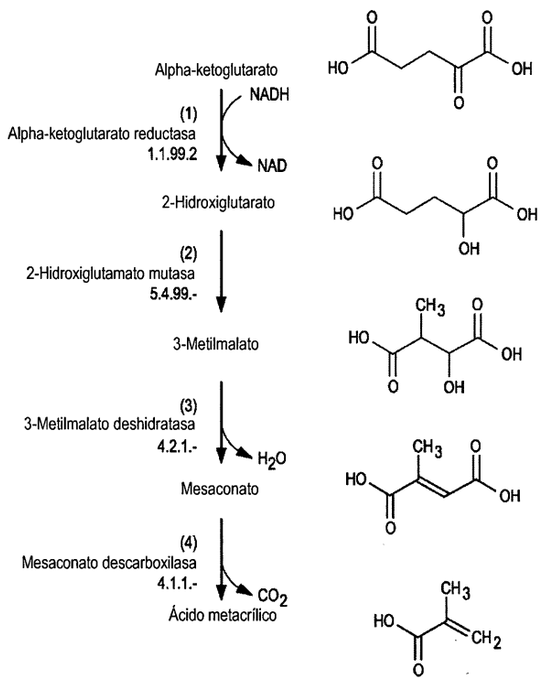

Alpha-ketoglutarato
NADH
(1)
Alpha-ketoglutarato reductasa
1.1.99.2
NAD
2-Hidroxiglutarato
(2)
2-Hidroxiglutamato mutasa
5.4.99.-
3-Metilmalato
(3)
3-Metilmalato deshidratasa
4.2.1.-
H2O
Mesaconato
(4)
Mesaconato descarboxilasa
4.1.1.-
CO2
Ácido metacrílico

FIG. 7

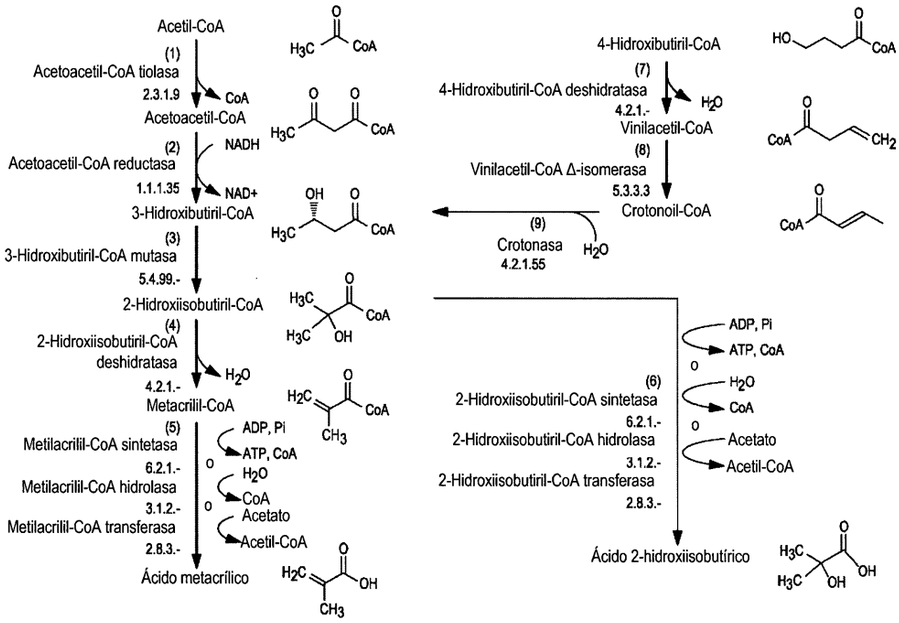

Acetil-CoA
(1)
Acetoacetil-CoA tiolasa
2.3.1.9
CoA
Acetoacetil-CoA
(2)
Acetoacetil-CoA reductasa
1.1.1.35
NADH
NAD+
3-Hidroxibutiril-CoA
(3)
3-Hidroxibutiril-CoA mutasa
5.4.99.-
2-Hidroxiisobutiril-CoA
(4)
2-Hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa
4.2.1.-
H2O
Metacrilil-CoA
(5)
Metilacrilil-CoA sintetasa
6.2.1.-
Metilacrilil-CoA hidrolasa
3.1.2.-
Metilacrilil-CoA transferasa
2.8.3.-
ADP, Pi
ATP, CoA
H2O
CoA
Acetato
Acetil-CoA
Ácido metacrílico
4-Hidroxibutiril-CoA
(7)
4-Hidroxibutiril-CoA deshidratasa
4.2.1.-
H2O
Vinilacetil-CoA
(8)
Vinilacetil-CoA Δ-isomerasa
5.3.3.3
Crotonoil-CoA
(9)
Crotonasa
4.2.1.55
H2O
(6)
2-Hidroxiisobutiril-CoA sintetasa
6.2.1.-
2-Hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa
3.1.2.-
2-Hidroxiisobutiril-CoA transferasa
2.8.3.-
ADP, Pi
ATP, CoA
H2O
CoA
Acetato
Acetil-CoA
Ácido 2-hidroxiisobutírico

FIG. 8

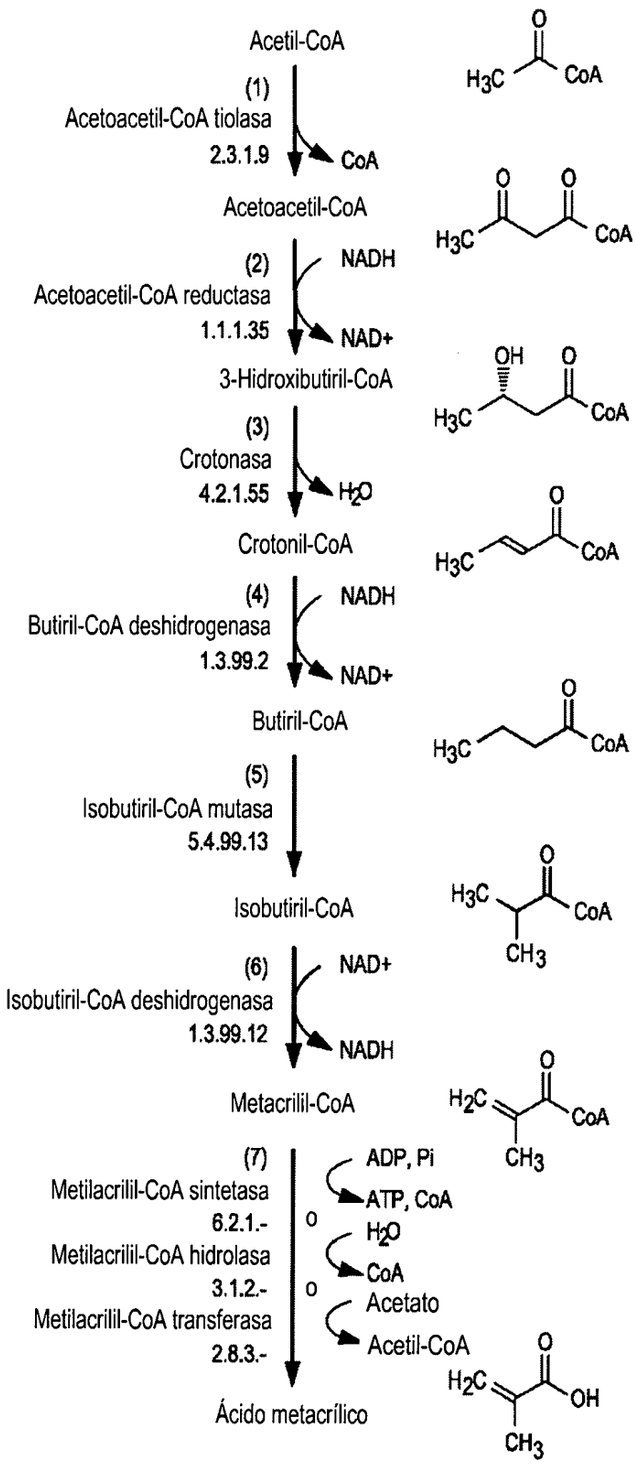

Acetil-CoA
(1)
Acetoacetil-CoA tiolasa
2.3.1.9
CoA
Acetoacetil-CoA
(2)
Acetoacetil-CoA reductasa
1.1.1.35
NADH
NAD+
3-Hidroxibutiril-CoA
(3)
Crotonasa
4.2.1.55
H2O
Crotonil-CoA
(4)
Butiril-CoA deshidrogenasa
1.3.99.2
NADH
NAD+
Butiril-CoA
(5)
Isobutiril-CoA mutasa
5.4.99.13
Isobutiril-CoA
(6)
Isobutiril-CoA deshidrogenasa
1.3.99.12
NAD+
NADH
Metacrilil-CoA
(7)
Metilacrilil-CoA sintetasa
6.2.1.-
ADP, Pi
ATP, CoA
o
Metilacrilil-CoA hidrolasa
3.1.2.-
H2O
CoA
o
Metilacrilil-CoA transferasa
2.8.3.-
Acetato
Acetil-CoA
Ácido metacrílico

FIG. 9

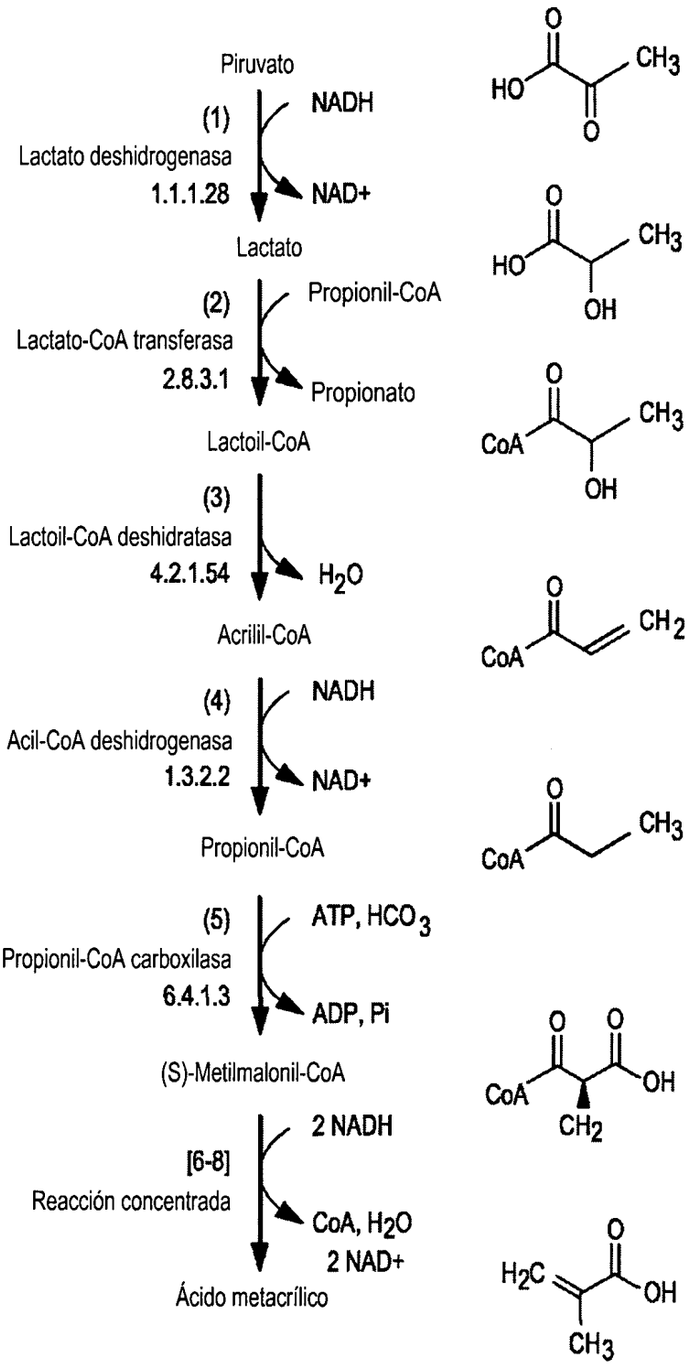

Piruvato
(1)
Lactato deshidrogenasa
1.1.1.28
NADH
NAD+
Lactato
(2)
Lactato-CoA transferasa
2.8.3.1
Propionil-CoA
Propionato
Lactoil-CoA
(3)
Lactoil-CoA deshidratasa
4.2.1.54
H2O
Acrilil-CoA
(4)
Acil-CoA deshidrogenasa
1.3.2.2
NADH
NAD+
Propionil-CoA
(5)
Propionil-CoA carboxilasa
6.4.1.3
ATP, HCO3
ADP, Pi
(S)-Metilmalonil-CoA
[6-8]
Reacción concentrada
2 NADH
CoA, H2O
2 NAD+
Ácido metacrílico

FIG. 10

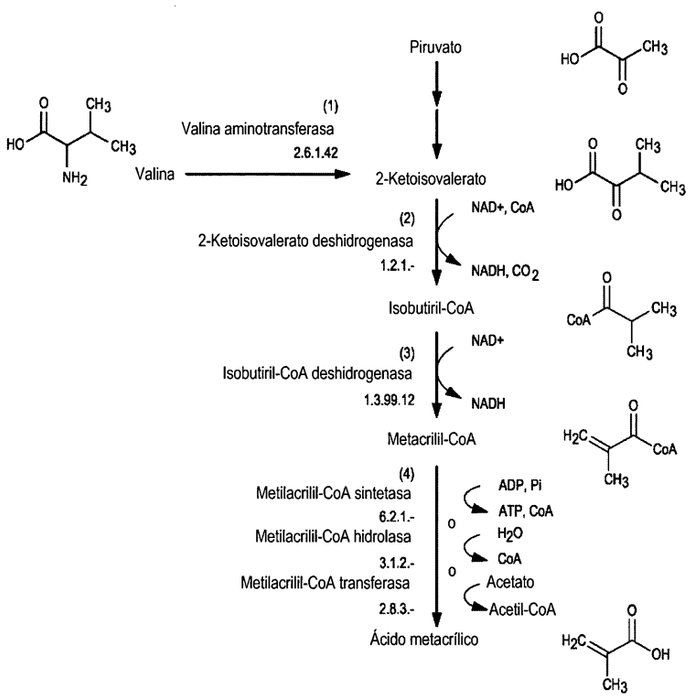

Piruvato
Valina
(1)
Valina aminotransferasa
2.6.1.42
2-Ketoisovalerato
(2)
2-Ketoisovalerato deshidrogenasa
1.2.1.-
NAD+, CoA
NADH, CO2
Isobutiril-CoA
(3)
Isobutiril-CoA deshidrogenasa
1.3.99.12
NAD+
NADH
Metacrilil-CoA
(4)
Metilacrilil-CoA sintetasa
6.2.1.-
Metilacrilil-CoA hidrolasa
3.1.2.-
Metilacrilil-CoA transferasa
2.8.3.-
ADP, Pi
ATP, CoA
H2O
CoA
Acetato
Acetil-CoA
Ácido metacrílico

FIG. 11

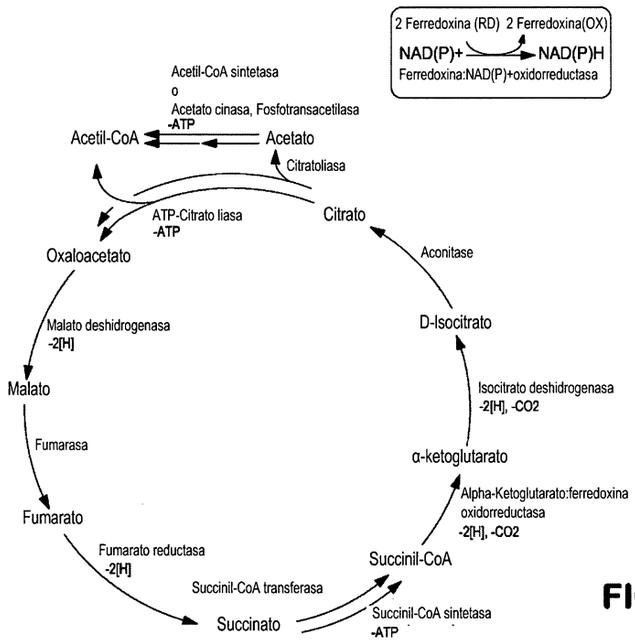

2 Ferredoxina (RD) 2 Ferredoxina(OX)
NAD(P)+ NAD(P)H
Ferredoxina:NAD(P)+oxidorreductasa
Acetil-CoA sintetasa
o
Acetato cinasa, Fosfotransacetilasa
-ATP
Acetil-CoA
Acetato
Citratoliasa
ATP-Citrato liasa
-ATP
Citrato
Oxaloacetato
Aconitase
Malato deshidrogenasa
-2[H]
D-Isocitrato
Malato
Isocitrato deshidrogenasa
-2[H], -CO2
Fumarasa
α-ketoglutarato
Alpha-Ketoglutarato:ferredoxina
oxidorreductasa
-2[H], -CO2
Fumarato
Fumarato reductasa
-2[H]
Succinil-CoA
Succinil-CoA transferasa
Succinato
Succinil-CoA sintetasa
-ATP

FIG. 12

290

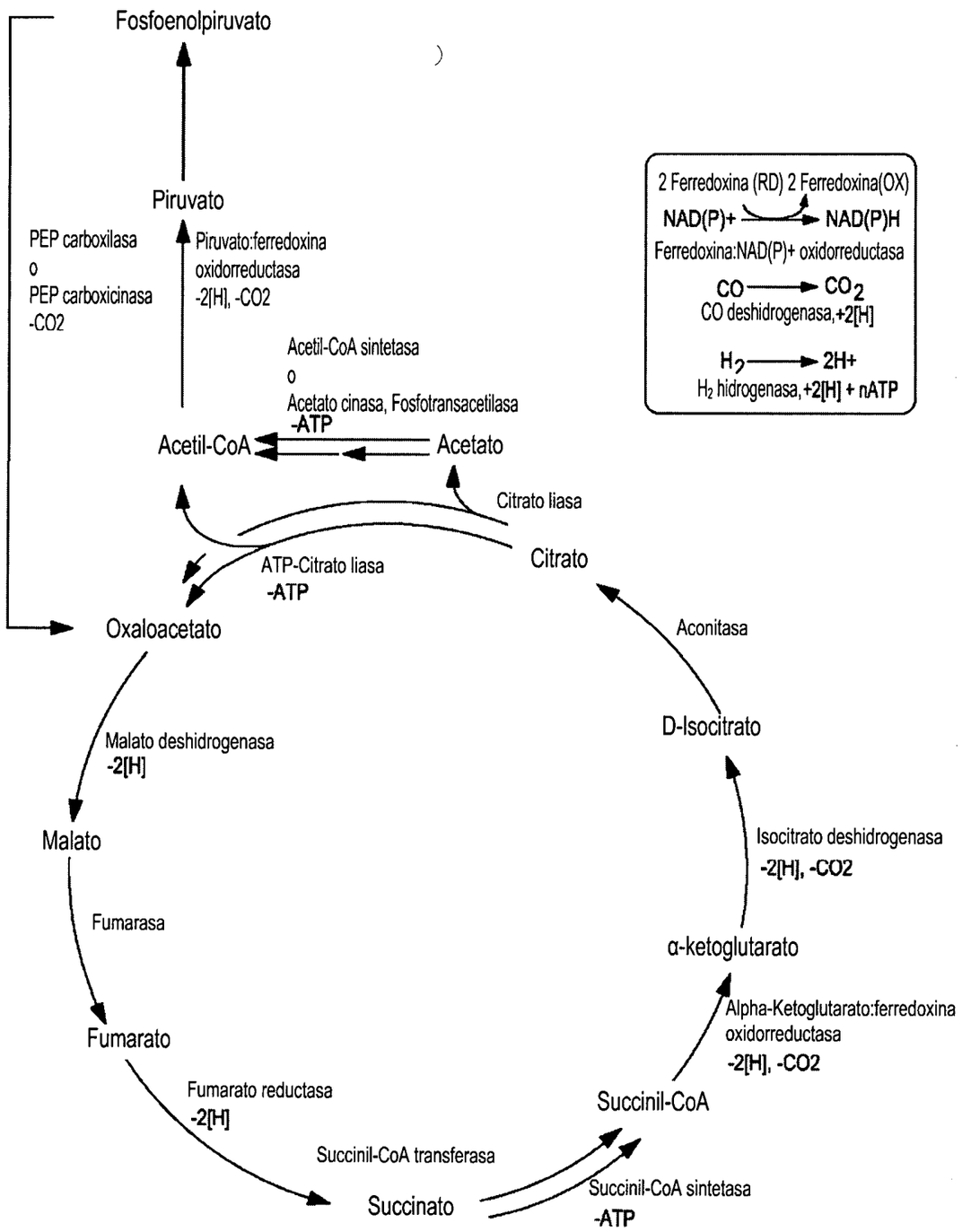

Fosfoenolpiruvato
Piruvato
PEP carboxilasa
o
PEP carboxicinasa
-CO2
Piruvato:ferredoxina
oxidorreductasa
-2[H], -CO2
Acetil-CoA sintetasa
o
Acetato cinasa, Fosfotransacetilasa
-ATP
Acetil-CoA
Acetato
Citrato liasa
ATP-Citrato liasa
-ATP
Citrato
Oxaloacetato
Aconitasa
D-Isocitrato
Malato deshidrogenasa
-2[H]
Malato
Isocitrato deshidrogenasa
-2[H], -CO2
Fumarasa
α-ketoglutarato
Alpha-Ketoglutarato:ferredoxina
oxidorreductasa
-2[H], -CO2
Fumarato
Fumarato reductasa
-2[H]
Succinil-CoA
Succinil-CoA transferasa
Succinato
Succinil-CoA sintetasa
-ATP
2 Ferredoxina (RD) 2 Ferredoxina(OX)
NAD(P)+ NAD(P)H
Ferredoxina:NAD(P)+ oxidorreductasa
CO CO2
CO deshidrogenasa,+2[H]
H2 2H+
H2 hidrogenasa,+2[H] + nATP

FIG. 13

FIG. 14

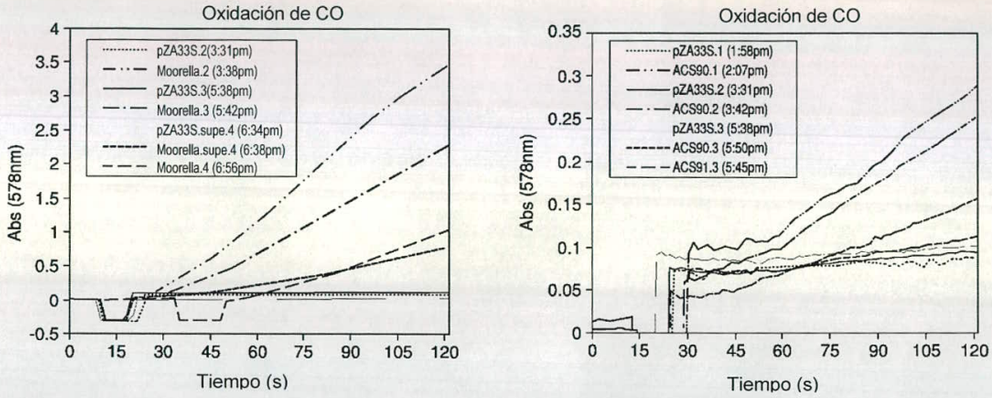

Oxidación de CO
Abs (578nm)
Tiempo (s)
pZA33S.2(3:31pm)
Moorella.2 (3:38pm)
pZA33S.3(5:38pm)
Moorella.3 (5:42pm)
pZA33S.supe.4 (6:34pm)
Moorella.supe.4 (6:38pm)
Moorella.4 (6:56pm)
Oxidación de CO
Abs (578nm)
Tiempo (s)
pZA33S.1 (1:58pm)
ACS90.1 (2:07pm)
pZA33S.2 (3:31pm)
ACS90.2 (3:42pm)
pZA33S.3 (5:38pm)
ACS90.3 (5:50pm)
ACS91.3 (5:45pm)

FIG. 15

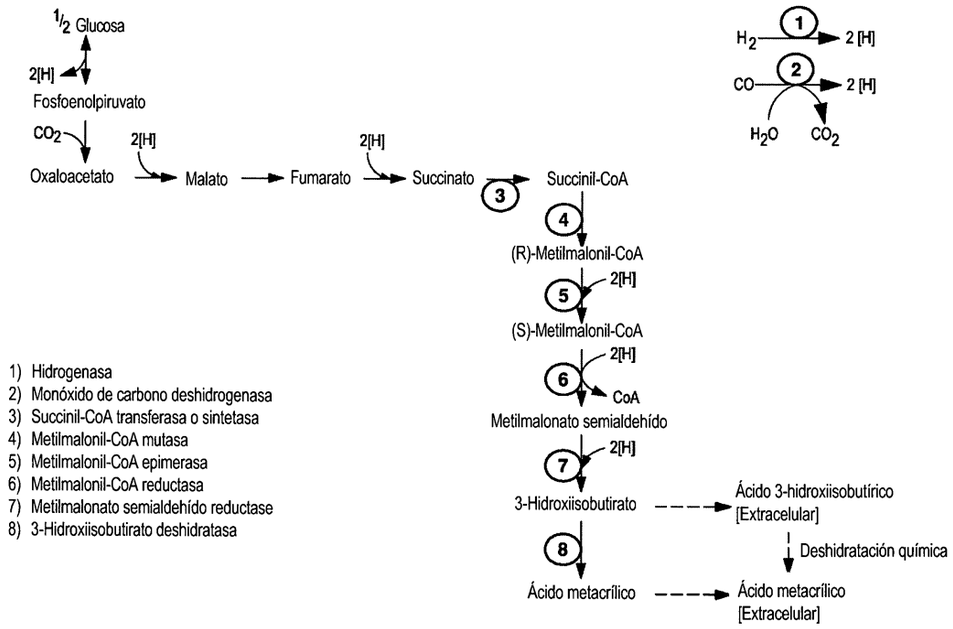
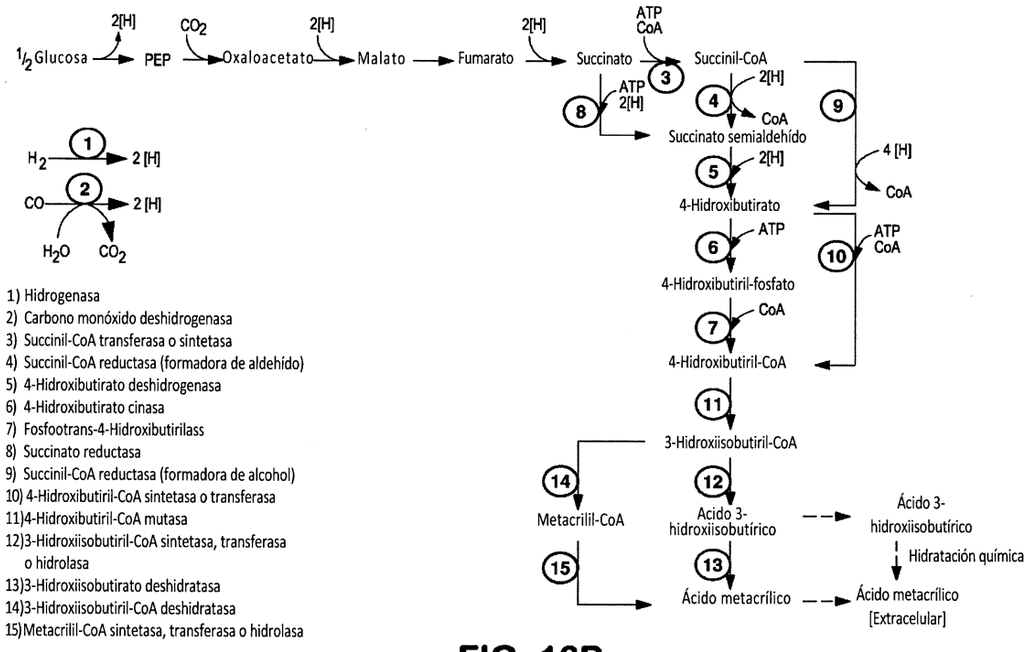

1/2 Glucosa
2[H]
Fosfoenolpiruvato
CO2
2[H]
2[H]
Oxaloacetato
Malato
Fumarato
Succinato
Succinil-CoA
(R)-Metilmalonil-CoA
2[H]
(S)-Metilmalonil-CoA
2[H]
CoA
Metilmalonato semialdehído
2[H]
3-Hidroxiisobutirato
Ácido 3-hidroxiisobutírico
[Extracelular]
Deshidratación química
Ácido metacrílico
Ácido metacrílico
[Extracelular]
H2
2 [H]
CO
2 [H]
H2O
CO2
1) Hidrogenasa
2) Monóxido de carbono deshidrogenasa
3) Succinil-CoA transferasa o sintetasa
4) Metilmalonil-CoA mutasa
5) Metilmalonil-CoA epimerasa
6) Metilmalonil-CoA reductasa
7) Metilmalonato semialdehído reductase
8) 3-Hidroxiisobutirato deshidratasa

FIG. 16A



1) Hidrogenasa
2) Carbono monóxido deshidrogenasa
3) Succinil-CoA transferasa o sintetasa
4) Succinil-CoA reductasa (formadora de aldehído)
5) 4-Hidroxibutirato deshidrogenasa
6) 4-Hidroxibutirato cinasa
7) Fosfootrans-4-Hidroxibutirilass
8) Succinato reductasa
9) Succinil-CoA reductasa (formadora de alcohol)
10) 4-Hidroxibutiril-CoA sintetasa o transferasa
11)4-Hidroxibutiril-CoA mutasa
12)3-Hidroxiisobutiril-CoA sintetasa, transferasa o hidrolasa
13)3-Hidroxiisobutirato deshidratasa
14)3-Hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa
15)Metacrilil-CoA sintetasa, transferasa o hidrolasa

FIG. 16B

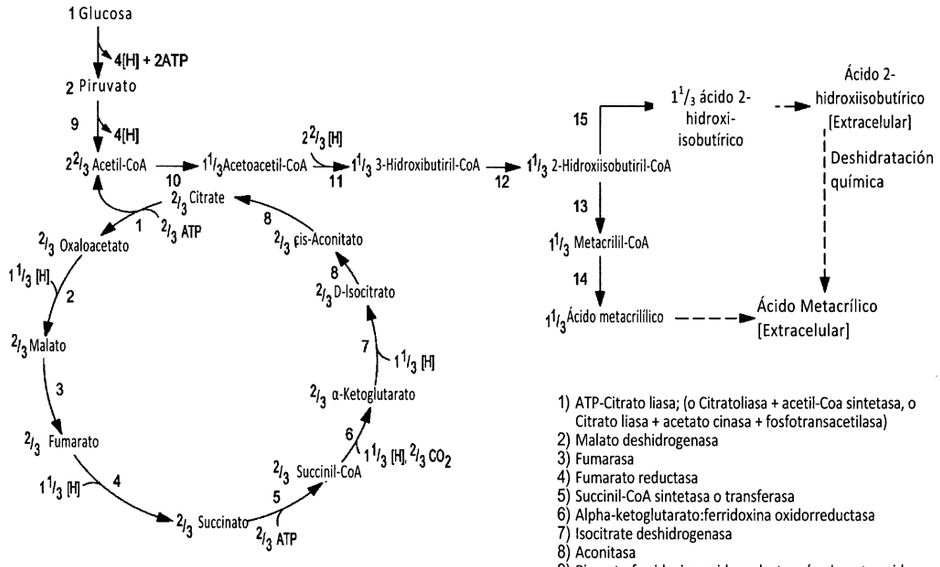


FIG. 16C

1) ATP-Citrato liasa; (o Citratoliasa + acetil-Coa sintetasa, o Citrato liasa + acetato cinasa + fosfotransacetilasa)
2) Malato deshidrogenasa
3) Fumarasa
4) Fumarato reductasa
5) Succinil-CoA sintetasa o transferasa
6) Alpha-ketoglutarato:ferridoxina oxidorreductasa
7) Isocitrate deshidrogenasa
8) Aconitasa
9) Piruvato:ferridoxina oxidorreductasa (o piruvato oxidasa + acetil-CoA sintetasa, o piruvato oxidasa + acetato cinasa + fosfotransacetilasa)
10) Acetoacetil-CoA tiolasa
11) Acetoacetil-CoA reductasa
12) 3-Hidroxibutiril-CoA mutasa
13) 2-Hidroxibutiril-CoA deshidratasa
14) Metacrilil-CoA sintetasa, transferasa o hidrolasa
15) 2-Hidroxiisobutiril-CoA sintetasa, transferasa o hidrolasa

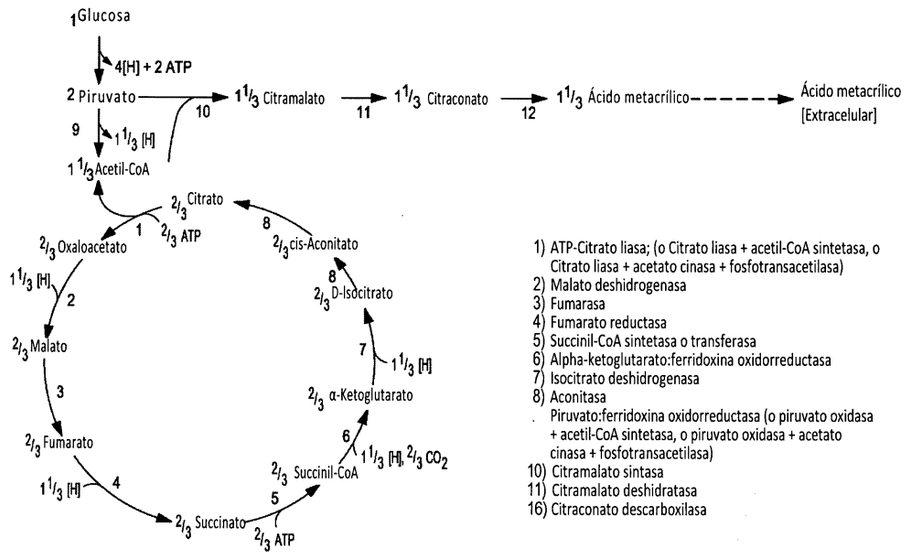
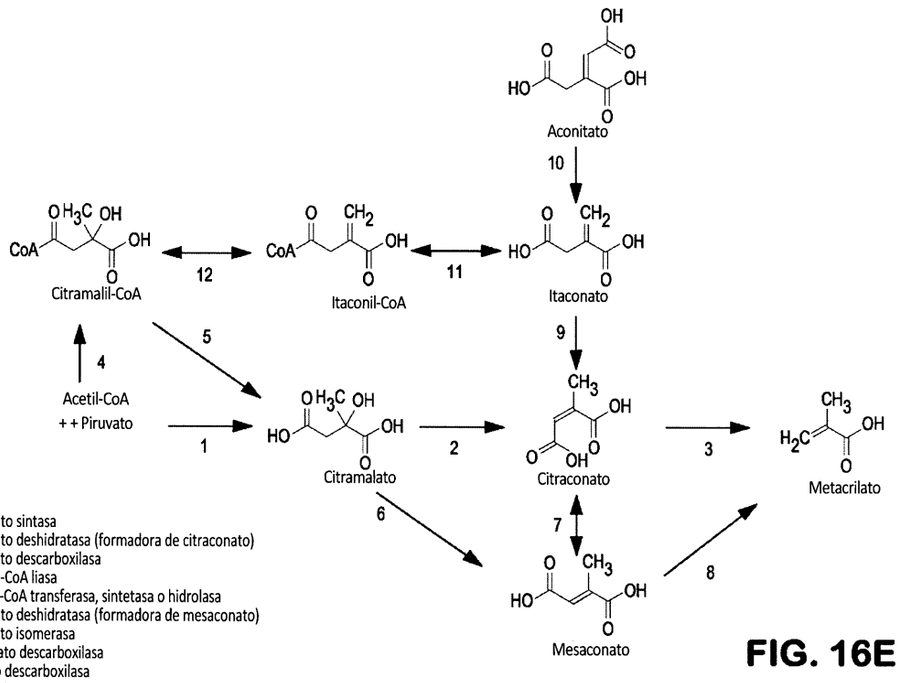

1Glucosa
4[H] + 2 ATP
2 Piruvato
10
1 1/3 Citramalato
11
1 1/3 Citraconato
12
1 1/3 Ácido metacrílico
Ácido metacrílico
[Extracelular]
9
1 1/3 [H]
1 1/3 Acetil-CoA
2/3 Citrato
1
2/3 ATP
8
2/3 cis-Aconitato
2/3 Oxaloacetato
8
2/3 D-Isocitrato
1 1/3 [H]
2
7
1 1/3 [H]
2/3 Malato
3
2/3 α-Ketoglutarato
6
1 1/3 [H], 2/3 CO2
2/3 Fumarato
2/3 Succinil-CoA
1 1/3 [H]
4
5
2/3 Succinato
2/3 ATP
1) ATP-Citrato liasa; (o Citrato liasa + acetil-CoA sintetasa, o Citrato liasa + acetato cinasa + fosfotransacetilasa)
2) Malato deshidrogenasa
3) Fumarasa
4) Fumarato reductasa
5) Succinil-CoA sintetasa o transferasa
6) Alpha-ketoglutarato:ferridoxina oxidorreductasa
7) Isocitrato deshidrogenasa
8) Aconitasa
. Piruvato:ferridoxina oxidorreductasa (o piruvato oxidasa + acetil-CoA sintetasa, o piruvato oxidasa + acetato cinasa + fosfotransacetilasa)
10) Citramalato sintasa
11) Citramalato deshidratasa
16) Citraconato descarboxilasa

FIG. 16D



1) Citramalato sintasa
2) Citramalato deshidratasa (formadora de citraconato)
3) Citraconato descarboxilasa
4) Citramalil-CoA liasa
5) Citramalil-CoA transferasa, sintetasa o hidrolasa
6) Citramalato deshidratasa (formadora de mesaconato)
7) Citraconato isomerasa
8) Mesaconato descarboxilasa
9) Aconitato descarboxilasa
10) Itaconato isomerasa
11) Itaconil-CoA transferasa o sintetasa
17) Itaconil-CoA hidratasa

FIG. 16E

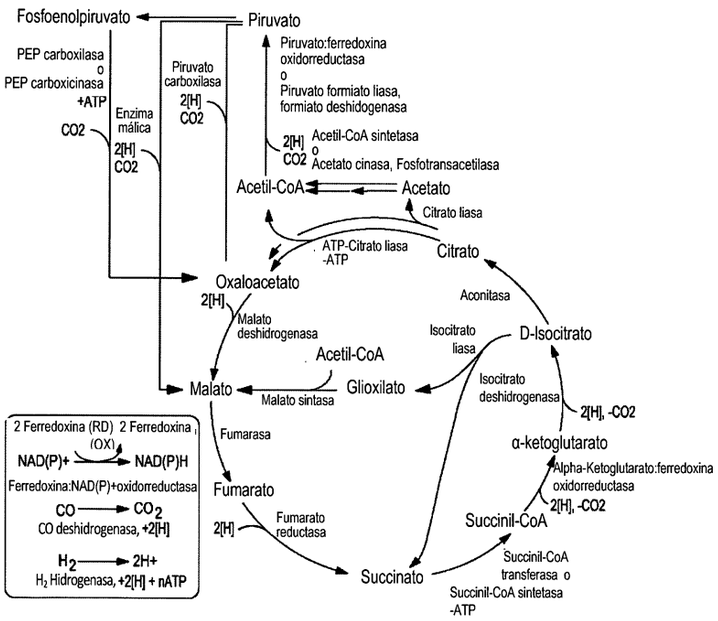


FIG. 17A

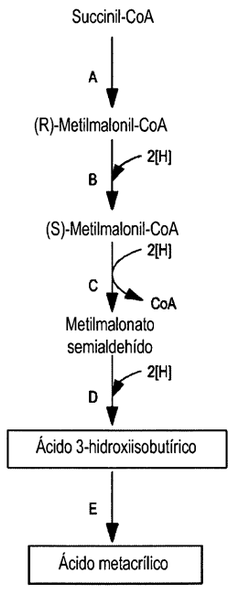


FIG. 17B

294

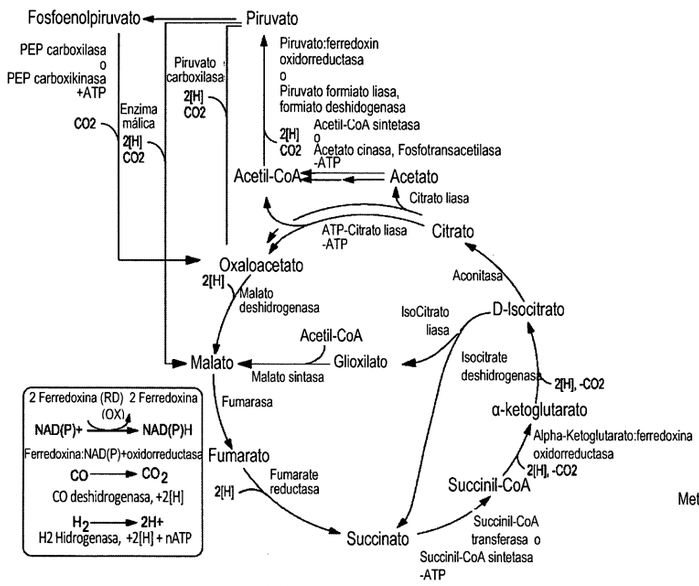


FIG. 18A

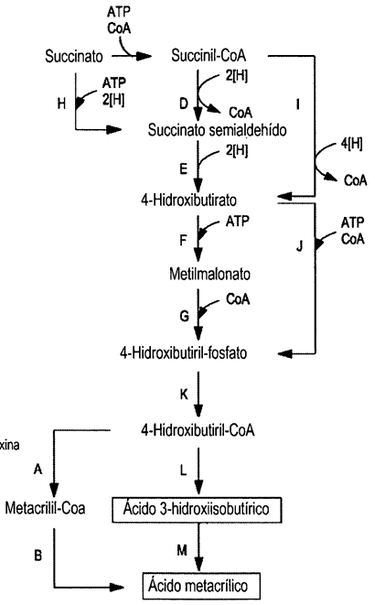


FIG. 18B

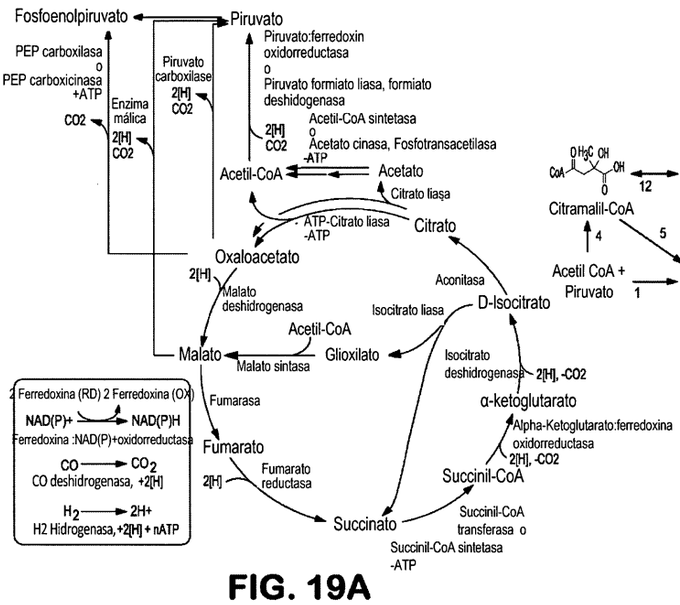


FIG. 19A

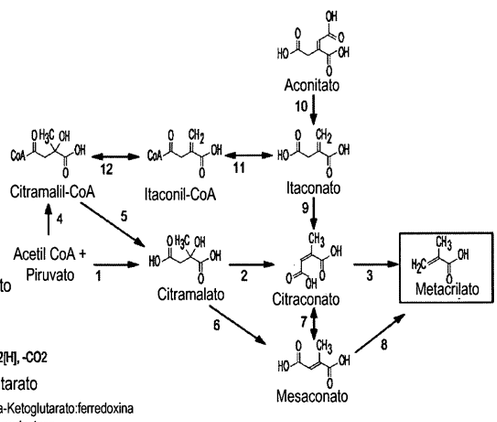


FIG. 19B

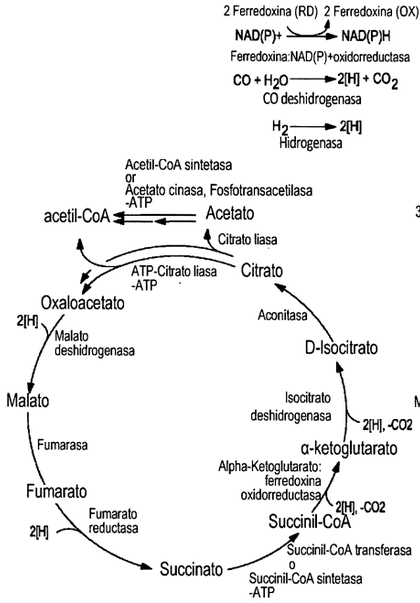


FIG. 20A

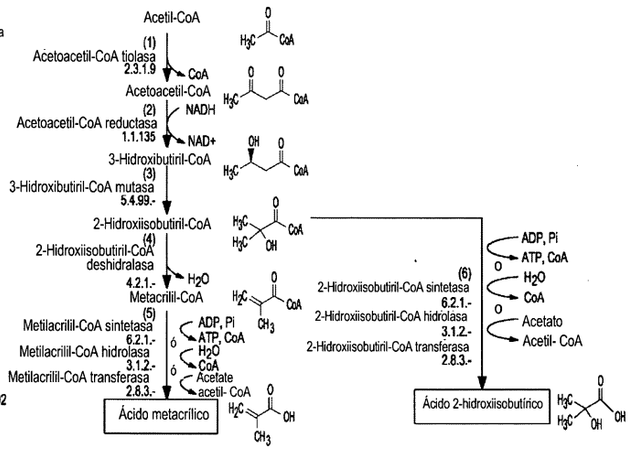


FIG. 20B

302

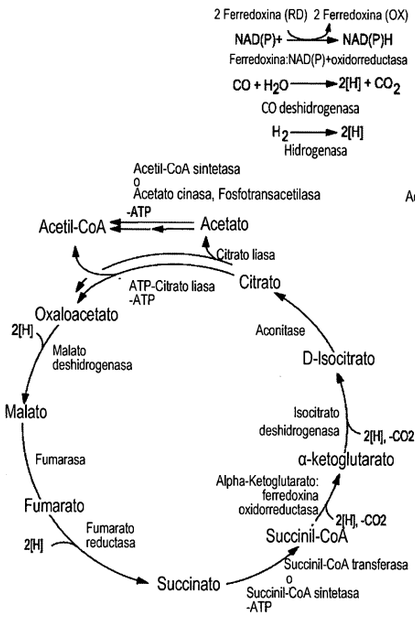


FIG. 21A

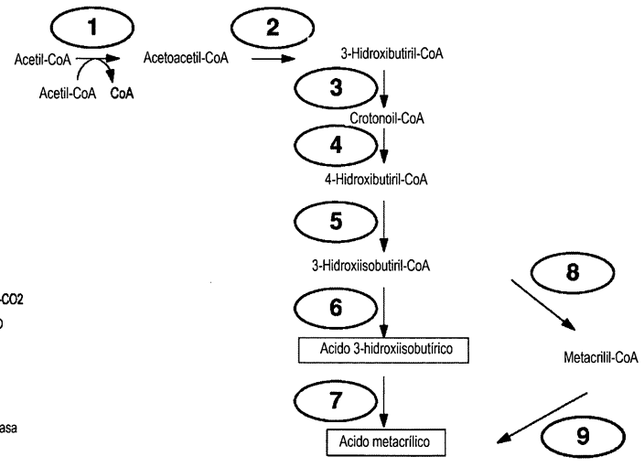


FIG. 21B

ATGGCAGTGGATTCACCGGATGAGCGGCTACAGCGCCGCATTGCACAGTTGTTTGCAGAAGATG
AGCAGGTCAAGGCCGCACGTCCGCTCGAAGCGGTGAGCGCGGCGGTGAGCGCGCCCGGTATGCG
GCTGGCGCAGATCGCCGCCACTGTTATGGCGGGTTACGCCGACCGCCCGGCCGCCGGGCAGCGT
GCGTTCGAACTGAACACCGACGACGCGACGGGCCGCACCTCGCTGCGGTTACTTCCCCGATTCG
AGACCATCACCTATCGCGAACTGTGGCAGCGAGTCGGCGAGGTTGCCGCGGCCTGGCATCATGA
TCCCGAGAACCCCTTGCGCGCAGGTGATTTCGTCGCCCTGCTCGGCTTCACCAGCATCGACTAC
GCCACCCTCGACCTGGCCGATATCCACCTCGGCGCGGTTACCGTGCCGTTGCAGGCCAGCGCGG
CGGTGTCCCAGCTGATCGCTATCCTCACCGAGACTTCGCCGCGGCTGCTCGCCTCGACCCCGGA
GCACCTCGATGCGGCGGTCGAGTGCCTACTCGCGGGCACCACACCGGAACGACTGGTGGTCTTC
GACTACCACCCCGAGGACGACGACCAGCGTGCGGCCTTCGAATCCGCCCGCCGCCGCCTTGCCG
ACGCGGGCAGCTTGGTGATCGTCGAAACGCTCGATGCCGTGCGTGCCCGGGGCCGCGACTTACC
GGCCGCGCCACTGTTCGTTCCCGACACCGACGACGACCCGCTGGCCCTGCTGATCTACACCTCC
GGCAGCACCGGAACGCCGAAGGGCGCGATGTACACCAATCGGTTGGCCGCCACGATGTGGCAGG
GGAACTCGATGCTGCAGGGGAACTCGCAACGGGTCGGGATCAATCTCAACTACATGCCGATGAG
CCACATCGCCGGTCGCATATCGCTGTTCGGCGTGCTCGCTCGCGGTGGCACCGCATACTTCGCG
GCCAAGAGCGACATGTCGACACTGTTCGAAGACATCGGCTTGGTACGTCCCACCGAGATCTTCT
TCGTCCCGCGCGTGTGCGACATGGTCTTCCAGCGCTATCAGAGCGAGCTGGACCGGCGCTCGGT
GGCGGGCGCCGACCTGGACACGCTCGATCGGGAAGTGAAAGCCGACCTCCGGCAGAACTACCTC
GGTGGGCGCTTCCTGGTGGCGGTCGTCGGCAGCGCGCCGCTGGCCGCGGAGATGAAGACGTTCA
TGGAGTCCGTCCTCGATCTGCCACTGCACGACGGGTACGGGTCGACCGAGGCGGGCGCAAGCGT
GCTGCTCGACAACCAGATCCAGCGGCCGCCGGTGCTCGATTACAAGCTCGTCGACGTGCCCGAA
CTGGGTTACTTCCGCACCGACCGGCCGCATCCGCGCGGTGAGCTGTTGTTGAAGGCGGAGACCA
CGATTCCGGGCTACTACAAGCGGCCCGAGGTCACCGCGGAGATCTTCGACGAGGACGGCTTCTA
CAAGACCGGCGATATCGTGGCCGAGCTCGAGCACGATCGGCTGGTCTATGTCGACCGTCGCAAC
AATGTGCTCAAACTGTCGCAGGGCGAGTTCGTGACCGTCGCCCATCTCGAGGCCGTGTTCGCCA
GCAGCCCGCTGATCCGGCAGATCTTCATCTACGGCAGCAGCGAACGTTCCTATCTGCTCGCGGT
GATCGTCCCCACCGACGACGCGCTGCGCGGCCGCGACACCGCCACCTTGAAATCGGCACTGGCC
GAATCGATTCAGCGCATCGCCAAGGACGCGAACCTGCAGCCCTACGAGATTCCGCGCGATTTCC
TGATCGAGACCGAGCCGTTCACCATCGCCAACGGACTGCTCTCCGGCATCGCGAAGCTGCTGCG
CCCCAATCTGAAGGAACGCTACGGCGCTCAGCTGGAGCAGATGTACACCGATCTCGCGACAGGC
CAGGCCGATGAGCTGCTCGCCCTGCGCCGCGAAGCCGCCGACCTGCCGGTGCTCGAAACCGTCA
GCCGGGCAGCGAAAGCGATGCTCGGCGTCGCCTCCGCCGATATGCGTCCCGACGCGCACTTCAC
CGACCTGGGCGGCGATTCCCTTTCCGCGCTGTCGTTCTCGAACCTGCTGCACGAGATCTTCGGG
GTCGAGGTGCCGGTGGGTGTCGTCGTCAGCCCGGCGAACGAGCTGCGCGATCTGGCGAATTACA
TTGAGGCGGAACGCAACTCGGGCGCGAAGCGTCCCACCTTCACCTCGGTGCACGGCGGCGGTTC
CGAGATCCGCGCCGCCGATCTGACCCTCGACAAGTTCATCGATGCCCGCACCCTGGCCGCCGCC
GACAGCATTCCGCACGCGCCGGTGCCAGCGCAGACGGTGCTGCTGACCGGCGCGAACGGCTACC
TCGGCCGGTTCCTGTGCCTGGAATGGCTGGAGCGGCTGGACAAGACGGGTGGCACGCTGATCTG
CGTCGTGCGCGGTAGTGACGCGGCCGCGGCCCGTAAACGGCTGGACTCGGCGTTCGACAGCGGC
GATCCCGGCCTGCTCGAGCACTACCAGCAACTGGCCGCACGGACCCTGGAAGTCCTCGCCGGTG
ATATCGGCGACCCGAATCTCGGTCTGGACGACGCGACTTGGCAGCGGTTGGCCGAAACCGTCGA
CCTGATCGTCCATCCCGCCGCGTTGGTCAACCACGTCCTTCCCTACACCCAGCTGTTCGGCCCC

FIG. 22A

AATGTCGTCGGCACCGCCGAAATCGTCCGGTTGGCGATCACGGCGCGGCGCAAGCCGGTCACCT
ACCTGTCGACCGTCGGAGTGGCCGACCAGGTCGACCCGGCGGAGTATCAGGAGGACAGCGACGT
CCGCGAGATGAGCGCGGTGCGCGTCGTGCGCGAGAGTTACGCCAACGGCTACGGCAACAGCAAG
TGGGCGGGGGAGGTCCTGCTGCGCGAAGCACACGATCTGTGTGGCTTGCCGGTCGCGGTGTTCC
GTTCGGACATGATCCTGGCGCACAGCCGGTACGCGGGTCAGCTCAACGTCCAGGACGTGTTCAC
CCGGCTGATCCTCAGCCTGGTCGCCACCGGCATCGCGCCGTACTCGTTCTACCGAACCGACGCG
GACGGCAACCGGCAGCGGGCCCACTATGACGGCTTGCCGGCGGACTTCACGGCGGCGGCGATCA
CCGCGCTCGGCATCCAAGCCACCGAAGGCTTCCGGACCTACGACGTGCTCAATCCGTACGACGA
TGGCATCTCCCTCGATGAATTCGTCGACTGGCTCGTCGAATCCGGCCACCCGATCCAGCGCATC
ACCGACTACAGCGACTGGTTCCACCGTTTCGAGACGGCGATCCGCGCGCTGCCGGAAAAGCAAC
GCCAGGCCTCGGTGCTGCCGTTGCTGGACGCCTACCGCAACCCCTGCCCGGCGGTCCGCGGCGC
GATACTCCCGGCCAAGGAGTTCCAAGCGGCGGTGCAAACAGCCAAAATCGGTCCGGAACAGGAC
ATCCCGCATTTGTCCGCGCCACTGATCGATAAGTACGTCAGCGATCTGGAACTGCTTCAGCTGC
TCTAA

FIG. 22A (Cont)

mavdspderlqrriaqlfaedeqvkaarpleavsaavsapgmrlaqiaatvmagyadrpaagqr
afelntddatgrtslrllprfetityrelwqrvgevaaawhhdpenplragdfvallgftsidy
atldladihlgavtvplqasaavsqliailtetsprllastpehldaavecllagttperlvvf
dyhpedddqraafesarrrladagslvivetldavrargrdlpaaplfvpdtdddplalliyts
gstgtpkgamytnrlaatmwqgnsmlqgnsqrvginlnympmshiagrislfgvlarggtayfa
aksdmstlfediglvrpteiffvprvcdmvfqryqseldrrsvagadldtldrevkadlrqnyl
ggrflvavvgsaplaaemktfmesvldlplhdgygsteagasvlldnqiqrppvldyklvdvpe
lgyfrtdrphprgelllkaettipgyykrpevtaeifdedgfyktgdivaelehdrlvyvdrrn
nvlklsqgefvtvahleavfassplirqifiygssersyllavivptddalrgrdtatlksala
esiqriakdanlqpyeiprdflietepftiangllsgiakllrpnlkerygaqleqmytdlatg
qadellalrreaadlpvletvsraakamlgvasadmrpdahftdlggdslsalsfsnllheifg
vevpvgvvvspanelrdlanyieaernsgakrptftsvhgggseiraadltldkfidartlaaa
dsiphapvpaqtvlltgangylgrflclewlerldktggtlicvvrgsdaaaarkrldsafdsg
dpgllehyqqlaartlevlagdigdpnlglddatwqrlaetvdlivhpaalvnhvlpytqlfgp
nvvgtaeivrlaitarrkpvtylstvgvadqvdpaeyqedsdvremsavrvvresyangygnsk
wagevllreahdlcglpvavfrsdmilahsryagqlnvqdvftrlilslvatgiapysfyrtda
dgnrqrahydglpadftaaaitalgiqategfrtydvlnpyddgisldefvdwlvesghpiqri
tdysdwfhrfetairalpekqrqasvlplldayrnpcpavrgailpakefqaavqtakigpeqd
iphlsaplidkyvsdlellqll*

FIG. 22B

ATGATTGAAACCATTCTGCCTGCAGGCGTTGAAAGCGCAGAACTGCTGGAATATCCGGAAGATC
TGAAAGCACATCCGGCAGAAGAACATCTGATTGCCAAAAGCGTTGAAAAACGTCGTCGTGATTT
TATTGGTGCACGTCATTGTGCACGTCTGGCACTGGCAGAACTGGGTGAACCTCCGGTTGCAATT
GGTAAAGGTGAACGTGGTGCACCGATTTGGCCTCGTGGTGTTGTTGGTAGCCTGACCCATTGTG
ATGGTTATCGTGCAGCAGCAGTTGCACATAAAATGCGCTTTCGCAGCATTGGTATTGATGCAGA
ACCGCATGCAACCCTGCCGGAAGGTGTTCTGGATAGCGTTAGCCTGCCGCCGGAACGTGAATGG
CTGAAAACCACCGATAGCGCACTGCATCTGGATCGTCTGCTGTTTTGTGCAAAAGAAGCCACCT
ATAAAGCCTGGTGGCCGCTGACAGCACGTTGGCTGGGTTTTGAAGAAGCCCATATTACCTTTGA
AATTGAAGATGGTAGCGCAGATAGCGGTAATGGCACCTTTCATAGCGAACTGCTGGTTCCGGGT
CAGACCAATGATGGTGGTACACCGCTGCTGAGCTTTGATGGTCGTTGGCTGATTGCAGATGGTT
TTATTCTGACCGCAATTGCCTATGCCTAA

FIG. 23A

mietilpagvesaelleypedlkahpaeehliaksvekrrrdfigarhcarlalaelgeppvai
gkgergapiwprgvvgslthcdgyraaavahkmrfrsigidaephatlpegvldsvslpperew
lkttdsalhldrllfcakeatykawwpltarwlgfeeahitfeiedgsadsgngtfhsellvpg
qtndggtpllsfdgrwliadgfiltaiaya*

FIG. 23B

atgaccagcgatgttcacgacgccacagacggcgtcaccgaaaccgcactcgacgacgagcagtcgacccgccgcat
cgccgagctgtacgccaccgatcccgagttcgccgccgccgcaccgttgcccgccgtggtcgacgcggcgcacaaac
ccgggctgcggctggcagagatcctgcagaccctgttcaccggctacggtgaccgcccggcgctgggataccgcgcc
cgtgaactggccaccgacgagggcgggcgcaccgtgacgcgtctgctgccgcggttcgacaccctcacctacgccca
ggtgtggtcgcgcgtgcaagcggtcgccgcggccctgcgccacaacttcgcgcagccgatctaccccggcgacgccg
tcgcgacgatcggtttcgcgagtcccgattacctgacgctggatctcgtatgcgcctacctgggcctcgtgagtgtt
ccgctgcagcacaacgcaccggtcagccggctcgccccgatcctggccgaggtcgaaccgcggatcctcaccgtgag
cgccgaatacctcgacctcgcagtcgaatccgtgcgggacgtcaactcggtgtcgcagctcgtggtgttcgaccatc
accccgaggtcgacgaccaccgcgacgcactggcccgcgcgcgtgaacaactcgccggcaagggcatcgccgtcacc
accctggacgcgatcgccgacgagggcgccgggctgccggccgaaccgatctacaccgccgaccatgatcagcgcct
cgcgatgatcctgtacacctcgggttccaccggcgcacccaagggtgcgatgtacaccgaggcgatggtggcgcggc
tgtggaccatgtcgttcatcacgggtgaccccacgccggtcatcaacgtcaacttcatgccgctcaaccacctgggc
gggcgcatccccatttccaccgccgtgcagaacggtggaaccagttacttcgtaccggaatccgacatgtccacgct
gttcgaggatctcgcgctggtgcgcccgaccgaactcggcctggttccgcgcgtcgccgacatgctctaccagcacc
acctcgccaccgtcgaccgcctggtcacgcagggcgccgacgaactgaccgccgagaagcaggccggtgccgaactg
cgtgagcaggtgctcggcggacgcgtgatcaccggattcgtcagcaccgcaccgctggccgcggagatgagggcgtt
cctcgacatcaccctgggcgcacacatcgtcgacggctacgggctcaccgagaccggcgccgtgacacgcgacggtg
tgatcgtgcggccaccggtgatcgactacaagctgatcgacgttcccgaactcggctacttcagcaccgacaagccc
tacccgcgtggcgaactgctggtcaggtcgcaaacgctgactcccgggtactacaagcgccccgaggtcaccgcgag
cgtcttcgaccgggacggctactaccacaccggcgacgtcatggccgagaccgcacccgaccacctggtgtacgtgg
accgtcgcaacaacgtcctcaaactcgcgcagggcgagttcgtggcggtcgccaacctggaggcggtgttctccggc
gcggcgctggtgcgccagatcttcgtgtacggcaacagcgagcgcagtttccttctggccgtggtggtcccgacgcc
ggaggcgctcgagcagtacgatccggccgcgctcaaggccgcgctggccgactcgctgcagcgcaccgcacgcgacg
ccgaactgcaatcctacgaggtgccggccgatttcatcgtcgagaccgagccgttcagcgccgccaacgggctgctg
tcgggtgtcggaaaactgctgcggcccaacctcaaagaccgctacgggcagcgcctggagcagatgtacgccgatat
cgcggccacgcaggccaaccagttgcgcgaactgcggcgcgcggccgccacacaaccggtgatcgacaccctcaccc
aggccgctgccacgatcctcggcaccgggagcgaggtggcatccgacgcccacttcaccgacctgggcggggattcc
ctgtcggcgctgacactttcgaacctgctgagcgatttcttcggtttcgaagttcccgtcggcaccatcgtgaaccc
ggccaccaacctcgcccaactcgcccagcacatcgaggcgcagcgcaccgcgggtgaccgcaggccgagtttcacca
ccgtgcacggcgcggacgccaccgagatccgggcgagtgagctgaccctggacaagttcatcgacgccgaaacgctc
cgggccgcaccgggtctgcccaaggtcaccaccgagccacggacggtgttgctctcgggcgccaacggctggctggg
ccggttcctcacgttgcagtggctggaacgcctggcacctgtcggcggcaccctcatcacgatcgtgcggggccgcg
acgacgccgcggcccgcgcacggctgacccaggcctacgacaccgatcccgagttgtcccgccgcttcgccgagctg
gccgaccgccacctgcgggtggtcgccggtgacatcggcgacccgaatctgggcctcacacccgagatctggcaccg
gctcgccgccgaggtcgacctggtggtgcatccggcagcgctggtcaaccacgtgctcccctaccggcagctgttcg
gccccaacgtcgtgggcacggccgaggtgatcaagctggccctcaccgaacggatcaagcccgtcacgtacctgtcc
accgtgtcggtggccatggggatccccgacttcgaggaggacggcgacatccggaccgtgagcccggtgcgcccgct
cgacggcggatacgccaacggctacggcaacagcaagtgggccggcgaggtgctgctgcgggaggcccacgatctgt
gcgggctgcccgtggcgacgttccgctcggacatgatcctggcgcatccgcgctaccgcggtcaggtcaacgtgcca
gacatgttcacgcgactcctgttgagcctcttgatcaccggcgtcgcgccgcggtcgttctacatcggagacggtga
gcgcccgcgggcgcactaccccggcctgacggtcgatttcgtggccgaggcggtcacgacgctcggcgcgcagcagc
gcgagggatacgtgtcctacgacgtgatgaacccgcacgacgacgggatctccctggatgtgttcgtggactggctg
atccgggcgggccatccgatcgaccgggtcgacgactacgacgactgggtgcgtcggttcgagaccgcgttgaccgc
gcttcccgagaagcgccgcgcacagaccgtactgccgctgctgcacgcgttccgcgctccgcaggcaccgttgcgcg
gcgcacccgaacccacggaggtgttccacgccgcggtgcgcaccgcgaaggtgggcccgggagacatcccgcacctc
gacgaggcgctgatcgacaagtacatacgcgatctgcgtgagttcggtctgatctaa

FIG. 24A

MTSDVHDATDGVTETALDDEQSTRRIAELYATDPEFAAAAPLPAVVDAAHKPGLRLAEILQTLFTGYGDRPALGYRA
RELATDEGGRTVTRLLPRFDTLTYAQVWSRVQAVAAALRHNFAQPIYPGDAVATIGFASPDYLTLDLVCAYLGLVSV
PLQHNAPVSRLAPILAEVEPRILTVSAEYLDLAVESVRDVNSVSQLVVFDHHPEVDDHRDALARAREQLAGKGIAVT
TLDAIADEGAGLPAEPIYTADHDQRLAMILYTSGSTGAPKGAMYTEAMVARLWTMSFITGDPTPVINVNFMPLNHLG
GRIPISTAVQNGGTSYFVPESDMSTLFEDLALVRPTELGLVPRVADMLYQHHLATVDRLVTQGADELTAEKQAGAEL
REQVLGGRVITGFVSTAPLAAEMRAFLDITLGAHIVDGYGLTETGAVTRDGVIVRPPVIDYKLIDVPELGYFSTDKP
YPRGELLVRSQTLTPGYYKRPEVTASVFDRDGYYHTGDVMAETAPDHLVYVDRRNNVLKLAQGEFVAVANLEAVFSG
AALVRQIFVYGNSERSFLLAVVVPTPEALEQYDPAALKAALADSLQRTARDAELQSYEVPADFIVETEPFSAANGLL
SGVGKLLRPNLKDRYGQRLEQMYADIAATQANQLRELRRAAATQPVIDTLTQAAATILGTGSEVASDAHFTDLGGDS
LSALTLSNLLSDFFGFEVPVGTIVNPATNLAQLAQHIEAQRTAGDRRPSFTTVHGADATEIRASELTLDKFIDAETL
RAAPGLPKVTTEPRTVLLSGANGWLGRFLTLQWLERLAPVGGTLITIVRGRDDAAARARLTQAYDTDPELSRRFAEL
ADRHLRVVAGDIGDPNLGLTPEIWHRLAAEVDLVVHPAALVNHVLPYRQLFGPNVVGTAEVIKLALTERIKPVTYLS
TVSVAMGIPDFEEDGDIRTVSPVRPLDGGYANGYGNSKWAGEVLLREAHDLCGLPVATFRSDMILAHPRYRGQVNVP
DMFTRLLLSLLITGVAPRSFYIGDGERPRAHYPGLTVDFVAEAVTTLGAQQREGYVSYDVMNPHDDGISLDVFVDWL
IRAGHPIDRVDDYDDWVRRFETALTALPEKRRAQTVLPLLHAFRAPQAPLRGAPEPTEVFHAAVRTAKVGPGDIPHL
DEALIDKYIRDLREFGLI

FIG. 24B

atgtcgactgccacccatgacgaacgactcgaccgtcgcgtccacgaactcatcgccaccgacccgcaattcgccgc
cgcccaacccgacccggcgatcaccgccgccctcgaacagcccgggctgcggctgccgcagatcatccgcaccgtgc
tcgacggctacgccgaccggccggcgctgggacagcgcgtggtggagttcgtcacggacgccaagaccgggcgcacg
tcggcgcagctgctcccccgcttcgagaccatcacgtacagcgaagtagcgcagcgtgtttcggcgctgggccgcgc
cctgtccgacgacgcggtgcaccccggcgaccgggtgtgcgtgctgggcttcaacagcgtcgactacgccaccatcg
acatggcgctgggcgccatcggcgccgtctcggtgccgctgcagaccagcgcggcaatcagctcgctgcagccgatc
gtggccgagaccgagcccaccctgatcgcgtccagcgtgaaccagctgtccgacgcggtgcagctgatcaccggcgc
cgagcaggcgcccacccggctggtggtgttcgactaccacccgcaggtcgacgaccagcgcgaggccgtccaggacg
ccgcggcgcggctgtccagcaccggcgtggccgtccagacgctggccgagctgctggagcgcggcaaggacctgccc
gccgtcgcggagccgcccgccgacgaggactcgctggccctgctgatctacacctccgggtccaccggcgcccccaa
gggcgcgatgtacccacagagcaacgtcggcaagatgtggcgccgcggcagcaagaactggttcggcgagagcgccg
cgtcgatcaccctgaacttcatgccgatgagccacgtgatgggccgaagcatcctctacggcacgctgggcaacggc
ggcaccgcctacttcgccgcccgcagcgacctgtccaccctgcttgaggacctcgagctggtgcggcccaccgagct
caacttcgtcccgcggatctgggagacgctgtacggcgaattccagcgtcaggtcgagcggcggctctccgaggccg
gggacgccggcgaacgtcgcgccgtcgaggccgaggtgctggccgagcagcgccagtacctgctgggcgggcggttc
accttcgcgatgacgggctcggcgcccatctcgccggagctgcgcaactgggtcgagtcgctgctcgaaatgcacct
gatggacggctacggctccaccgaggccggaatggtgttgttcgacggggagattcagcgcccgccggtgatcgact
acaagctggtcgacgtgccggacctgggctacttcagcaccgaccggccgcatccgcgcggcgagctgctgctgcgc
accgagaacatgttcccgggctactacaagcgggccgaaaccaccgcgggcgtcttcgacgaggacggctactaccg
caccggcgacgtgttcgccgagatcgccccggaccggctggtctacgtcgaccgccgcaacaacgtgctcaagctgg
cgcagggcgaattcgtcacgctggccaagctggaggcggtgttcggcaacagcccgctgatccgccagatctacgtc
tacggcaacagcgcccagccctacctgctggcggtcgtggtgcccaccgaggaggcgctggcctcgggtgaccccga
gacgctcaagcccaagatcgccgactcgctgcagcaggtcgccaaggaggccggcctgcagtcctacgaggtgccgc
gcgacttcatcatcgagaccaccccgttcagcctggaaaacggtctgctgaccgggatccggaagctggcgtggccg
aaactgaagcagcactacggggaacggctggagcagatgtacgccgacctggccgccggacaggccaacgagctggc
cgagctgcgccgcaacggtgcccaggcgccggtgttgcagaccgtgagccgcgccgcgggcgccatgctgggttcgg
ccgcctccgacctgtcccccgacgcccacttcaccgatctgggcggagactcgttgtcggcgttgacattcggcaac
ctgctgcgcgagatcttcgacgtcgacgtgccggtaggcgtgatcgtcagcccggccaacgacctggcggccatcgc
gagctacatcgaggccgagcggcagggcagcaagcgcccgacgttcgcctcggtgcacggccgggacgcgaccgtgg
tgcgcgccgccgacctgacgctggacaagttcctcgacgccgagacgctggccgccgcgccgaacctgcccaagccg
gccaccgaggtgcgcaccgtgctgctgaccggcgccaccggcttcctgggccgctacctggccctggaatggctgga
gcggatggacatggtggacggcaaggtcatcgccctggtccgggcccgctccgacgaggaggcacgcgcccggctgg
acaagaccttcgacagcggcgacccgaaactgctcgcgcactaccagcagctggccgccgatcacctggaggtcatc
gccggcgacaagggcgaggccaatctgggcctgggccaagacgtttggcaacgactggccgacacggtcgacgtgat
cgtcgaccccgccgcgctggtcaaccacgtgttgccgtacagcgagctgttcgggcccaacgccctgggcaccgcgg
agctgatccggctggcgctgacgtccaagcagaagccgtacacctacgtgtccaccatcggcgtgggcgaccagatc
gagccgggcaagttcgtcgagaacgccgacatccggcagatgagcgccacccgggcgatcaacgacagctacgccaa
cggctatggcaacagcaagtgggccggcgaggtgctgctgcgcgaggcgcacgacctgtgcgggctgcccgtcgcgg
tgttccgctgcgacatgatcctggccgacaccacgtatgccgggcagctcaacctgccggacatgttcacccggctg
atgctgagcctggtggccaccgggatcgcgcccggctcgttctacgagctcgacgccgacggcaaccggcagcgggc
gcactacgacggcctgccggtcgagttcatcgccgcggcgatctcgacgctgggttcgcagatcaccgacagcgaca
ccggcttccagacctaccacgtgatgaaccccctacgatgacggcgtcggtctggacgagtacgtcgattggctggtg
gacgccggctattcgatcgagcggatcgccgactactccgaatggctgcggcggttcgagacctcgctgcgggccct
gccggaccggcagcgccagtactcgctgctgccgctgctgcacaactaccgcacgccggagaagccgatcaacgggt
cgatagctcccaccgacgtgttccgggcagcggtgcaggaggcgaaaatcggccccgacaaagacattccgcacgtg
tcgccgccggtcatcgtcaagtacatcaccgacctgcagctgctcgggctgctctaa

FIG. 25A

MSTATHDERLDRRVHELIATDPQFAAAQPDPAITAALEQPGLRLPQIIRTVLDGYADRPALGQRVVEFVTDAKTGRT
SAQLLPRFETITYSEVAQRVSALGRALSDDAVHPGDRVCVLGFNSVDYATIDMALGAIGAVSVPLQTSAAISSLQPI
VAETEPTLIASSVNQLSDAVQLITGAEQAPTRLVVFDYHPQVDDQREAVQDAAARLSSTGVAVQTLAELLERGKDLP
AVAEPPADEDSLALLIYTSGSTGAPKGAMYPQSNVGKMWRRGSKNWFGESAASITLNFMPMSHVMGRSILYGTLGNG
GTAYFAARSDLSTLLEDLELVRPTELNFVPRIWETLYGEFQRQVERRLSEAGDAGERRAVEAEVLAEQRQYLLGGRF
TFAMTGSAPISPELRNWVESLLEMHLMDGYGSTEAGMVLFDGEIQRPPVIDYKLVDVPDLGYFSTDRPHPRGELLLR
TENMFPGYYKRAETTAGVFDEDGYYRTGDVFAEIAPDRLVYVDRRNNVLKLAQGEFVTLAKLEAVFGNSPLIRQIYV
YGNSAQPYLLAVVVPTEEALASGDPETLKPKIADSLQQVAKEAGLQSYEVPRDFIIETTPFSLENGLLTGIRKLAWP
KLKQHYGERLEQMYADLAAGQANELAELRRNGAQAPVLQTVSRAAGAMLGSAASDLSPDAHFTDLGGDSLSALTFGN
LLREIFDVDVPVGVIVSPANDLAAIASYIEAERQGSKRPTFASVHGRDATVVRAADLTLDKFLDAETLAAAPNLPKP
ATEVRTVLLTGATGFLGRYLALEWLERMDMVDGKVIALVRARSDEEARARLDKTFDSGDPKLLAHYQQLAADHLEVI
AGDKGEANLGLGQDVWQRLADTVDVIVDPAALVNHVLPYSELFGPNALGTAELIRLALTSKQKPYTYVSTIGVGDQI
EPGKFVENADIRQMSATRAINDSYANGYGNSKWAGEVLLREAHDLCGLPVAVFRCDMILADTTYAGQLNLPDMFTRL
MLSLVATGIAPGSFYELDADGNRQRAHYDGLPVEFIAAAISTLGSQITDSDTGFQTYHVMNPYDDGVGLDEYVDWLV
DAGYSIERIADYSEWLRRFETSLRALPDRQRQYSLLPLLHNYRTPEKPINGSIAPTDVFRAAVQEAKIGPDKDIPHV
SPPVIVKYITDLQLLGLL

FIG. 25B

atgtcgccaatcacgcgtgaagagcggctcgagcgccgcatccaggacctctacgccaacgacccgcagttcgccgc
cgccaaacccgccacggcgatcaccgcagcaatcgagcggccgggtctaccgctaccccagatcatcgagaccgtca
tgaccggatacgccgatcggccggctctcgctcagcgctcggtcgaattcgtgaccgacgccggcaccggccacacc
acgctgcgactgctcccccacttcgaaaccatcagctacggcgagctttgggaccgcatcagcgcactggccgacgt
gctcagcaccgaacagacggtgaaaccgggcgaccgggtctgcttgttgggcttcaacagcgtcgactacgccacga
tcgacatgactttggcgcggctgggcgcggtggccgtaccactgcagaccagcgcggcgataacccagctgcagccg
atcgtcgccgagacccagcccaccatgatcgcggccagcgtcgacgcactcgctgacgccaccgaattggctctgtc
cggtcagaccgctacccgagtcctggtgttcgaccaccaccggcaggttgacgcacaccgcgcagcggtcgaatccg
cccgggagcgcctggccggctcggcggtcgtcgaaaccctggccgaggccatcgcgcgcggcgacgtgccccgcggt
gcgtccgccggctcggcgcccggcaccgatgtgtccgacgactcgctcgcgctactgatctacacctcgggcagcac
gggtgcgcccaagggcgcgatgtacccccgacgcaacgttgcgaccttctggcgcaagcgcacctggttcgaaggcg
gctacgagccgtcgatcacgctgaacttcatgccaatgagccacgtcatgggccgccaaatcctgtacggcacgctg
tgcaatggcggcaccgcctacttcgtggcgaaaagcgatctctccaccttgttcgaagacctggcgctggtgcggcc
caccgagctgaccttcgtgccgcgcgtgtgggacatggtgttcgacgagtttcagagtgaggtcgaccgccgcctgg
tcgacggcgccgaccgggtcgcgctcgaagcccaggtcaaggccgagatacgcaacgacgtgctcggtggacggtat
accagcgcactgaccggctccgcccctatctccgacgagatgaaggcgtgggtcgaggagctgctcgacatgcatct
ggtcgagggctacggctccaccgaggccgggatgatcctgatcgacggagccattcggcgcccggcggtactcgact
acaagctggtcgatgttcccgacctgggttacttcctgaccgaccggccacatccgcggggcgagttgctggtcaag
accgatagtttgttcccgggctactaccagcgagccgaagtcaccgccgacgtgttcgatgctgacggcttctaccg
gaccggcgacatcatggccgaggtcggccccgaacagttcgtgtacctcgaccgccgcaacaacgtgttgaagctgt
cgcagggcgagttcgtcaccgtctccaaactcgaagcggtgtttggcgacagcccactggtacggcagatctacatc
tacggcaacagcgcccgtgcctacctgttggcggtgatcgtccccacccaggaggcgctggacgccgtgcctgtcga
ggagctcaaggcgcggctgggcgactcgctgcaagaggtcgcaaaggccgccggcctgcagtcctacgagatcccgc
gcgacttcatcatcgaaacaacaccatggacgctggagaacggcctgctcaccggcatccgcaagttggccaggccg
cagctgaaaaagcattacggcgagcttctcgagcagatctacacggacctggcacacggccaggccgacgaactgcg
ctcgctgcgccaaagcggtgccgatgcgccggtgctggtgacggtgtgccgtgcggcggccgcgctgttgggcggca
gcgcctctgacgtccagcccgatgcgcacttcaccgatttgggcggcgactcgctgtcggcgctgtcgttcaccaac
ctgctgcacgagatcttcgacatcgaagtgccggtgggcgtcatcgtcagccccgccaacgacttgcaggccctggc
cgactacgtcgaggcggctcgcaaacccggctcgtcacggccgaccttcgcctcggtccacggcgcctcgaatgggc
aggtcaccgaggtgcatgccggtgacctgtccctggacaaattcatcgatgccgcaaccctggccgaagctccccgg
ctgcccgccgcaaacacccaagtgcgcaccgtgctgctgaccggcgccaccggcttcctcgggcgctacctggccct
ggaatggctggagcggatggacctggtcgacggcaaactgatctgcctggtccgggccaagtccgacaccgaagcac
gggcgcggctggacaagacgttcgacagcggcgaccccgaactgctggcccactaccgcgcactggccggcgaccac
ctcgaggtgctcgccggtgacaagggcgaagccgacctcggactggaccggcagacctggcaacgcctggccgacac
ggtcgacctgatcgtcgaccccgcggccctggtcaaccacgtactgccatacagccagctgttcgggcccaacgcgc
tgggcaccgccgagctgctgcggctggcgctcacctccaagatcaagccctacagctacacctcgacaatcggtgtc
gccgaccagatcccgccgtcggcgttcaccgaggacgccgacatccgggtcatcagcgccacccgcgcggtcgacga
cagctacgccaatggctactcgaacagcaagtgggccggcgaggtgctgttgcgcgaggcgcatgacctgtgtggcc
tgccggttgcggtgttccgctgcgacatgatcctggccgacaccacatgggcgggacagctcaatgtgccggacatg
ttcacccggatgatcctgagcctggcggccaccggtatcgcgccgggttcgttctatgagcttgcggccgacggcgc
ccggcaacgcgcccactatgacggtctgcccgtcgagttcatcgccgaggcgatttcgactttgggtgcgcagagcc
aggatggtttccacacgtatcacgtgatgaacccctacgacgacggcatcggactcgacgagttcgtcgactggctc
aacgagtccggttgccccatccagcgcatcgctgactatggcgactggctgcagcgcttcgaaaccgcactgcgcgc
actgcccgatcggcagcggcacagctcactgctgccgctgttgcacaactatcggcagccggagcggcccgtccgcg
ggtcgatcgcccctaccgatcgcttccgggcagcggtgcaagaggccaagatcggccccgacaaagacattccgcac
gtcggcgcgccgatcatcgtgaagtacgtcagcgacctgcgcctactcggcctgctctaa

FIG. 26A

MSPITREERLERRIQDLYANDPQFAAAKPATAITAAIERPGLPLPQIIETVMTGYADRPALAQRSVEFVTDAGTGHT
TLRLLPHFETISYGELWDRISALADVLSTEQTVKPGDRVCLLGFNSVDYATIDMTLARLGAVAVPLQTSAAITQLQP
IVAETQPTMIAASVDALADATELALSGQTATRVLVFDHHRQVDAHRAAVESARERLAGSAVVETLAEAIARGDVPRG
ASAGSAPGTDVSDDSLALLIYTSGSTGAPKGAMYPRRNVATFWRKRTWFEGGYEPSITLNFMPMSHVMGRQILYGTL
CNGGTAYFVAKSDLSTLFEDLALVRPTELTFVPRVWDMVFDEFQSEVDRRLVDGADRVALEAQVKAEIRNDVLGGRY
TSALTGSAPISDEMKAWVEELLDMHLVEGYGSTEAGMILIDGAIRRPAVLDYKLVDVPDLGYFLTDRPHPRGELLVK
TDSLFPGYYQRAEVTADVFDADGFYRTGDIMAEVGPEQFVYLDRRNNVLKLSQGEFVTVSKLEAVFGDSPLVRQIYI
YGNSARAYLLAVIVPTQEALDAVPVEELKARLGDSLQEVAKAAGLQSYEIPRDFIIETTPWTLENGLLTGIRKLARP
QLKKHYGELLEQIYTDLAHGQADELRSLRQSGADAPVLVTVCRAAAALLGGSASDVQPDAHFTDLGGDSLSALSFTN
LLHEIFDIEVPVGVIVSPANDLQALADYVEAARKPGSSRPTFASVHGASNGQVTEVHAGDLSLDKFIDAATLAEAPR
LPAANTQVRTVLLTGATGFLGRYLALEWLERMDLVDGKLICLVRAKSDTEARARLDKTFDSGDPELLAHYRALAGDH
LEVLAGDKGEADLGLDRQTWQRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYSQLFGPNALGTAELLRLALTSKIKPYSYTSTIGV
ADQIPPSAFTEDADIRVISATRAVDDSYANGYSNSKWAGEVLLREAHDLCGLPVAVFRCDMILADTTWAGQLNVPDM
FTRMILSLAATGIAPGSFYELAADGARQRAHYDGLPVEFIAEAISTLGAQSQDGFHTYHVMNPYDDGIGLDEFVDWL
NESGCPIQRIADYGDWLQRFETALRALPDRQRHSSLLPLLHNYRQPERPVRGSIAPTDRFRAAVQEAKIGPDKDIPH
VGAPIIVKYVSDLRLLGLL

FIG. 26B

atgagcaccgcaacccatgatgaacgtctggatcgtcgtgttcatgaactgattgcaaccgatc
cgcagtttgcagcagcacagccggatcctgcaattaccgcagcactggaacagcctggtctgcg
tctgccgcagattattcgtaccgttctggatggttatgcagatcgtccggcactgggtcagcgt
gttgttgaatttgttaccgatgcaaaaaccggtcgtaccagcgcacagctgctgcctcgttttg
aaaccattacctatagcgaagttgcacagcgtgttagcgcactgggtcgtgcactgagtgatga
tgcagttcatccgggtgatcgtgtttgtgttctgggttttaatagcgttgattatgccaccatt
gatatggcactgggtgcaattggtgcagttagcgttccgctgcagaccagcgcagcaattagca
gcctgcagccgattgttgcagaaaccgaaccgaccctgattgcaagcagcgttaatcagctgtc
agatgcagttcagctgattaccggtgcagaacaggcaccgacccgtctggttgtttttgattat
catccgcaggttgatgatcagcgtgaagcagttcaggatgcagcagcacgtctgagcagcaccg
gtgttgcagttcagaccctggcagaactgctggaacgtggtaaagatctgcctgcagttgcaga
accgcctgcagatgaagatagcctggcactgctgatttataccagcggtagcacaggtgcaccg
aaaggtgcaatgtatccgcagagcaatgttggtaaaatgtggcgtcgtggtagcaaaaattggt
ttggtgaaagcgcagcaagcattaccctgaatttcatgccgatgagccatgttatgggtcgtag
cattctgtatggcaccctgggtaatggtggcaccgcatattttgcagcacgtagcgatctgagc
accctgctggaagatctggaactggttcgtccgaccgaactgaattttgttccgcgtatttggg
aaaccctgtatggtgaatttcagcgtcaggttgaacgtcgtctgagcgaagctggcgatgccgg
tgaacgtcgtgcagttgaagcagaagttctggcagaacagcgtcagtatctgctgggtggtcgt
tttacctttgcaatgaccggtagcgcaccgattagtccggaactgcgtaattgggttgaaagcc
tgctggaaatgcatctgatggatggctatggtagcaccgaagcaggtatggttctgtttgatgg
cgaaattcagcgtccgcctgtgattgattataaactggttgatgttccggatctgggttatttt
agcaccgatcgtccgcatccgcgtggtgaactgctgctgcgtaccgaaaatatgtttccgggtt
attataaacgtgcagaaaccaccgcaggcgtttttgatgaagatggttattatcgtaccggtga
tgtgtttgcagaaattgcaccggatcgtctggtttatgttgatcgtcgtaataatgttctgaaa
ctggcacagggtgaatttgtgaccctggccaaactggaagcagtttttggtaatagtccgctga
ttcgtcagatttatgtgtatggtaatagcgcacagccgtatctgctggcagttgttgttccgac
cgaagaggcactggcaagcggtgatccggaaaccctgaaaccgaaaattgcagatagcctgcag
caggttgcaaaagaagcaggtctgcagagctatgaagttccgcgtgattttattattgaaacca
ccccgtttagcctggaaaatggtctgctgaccggtattcgtaaactggcatggccgaaactgaa
acagcattatggtgaacgcctggaacaaatgtatgcagatctggcagcaggtcaggcaaatgaa
ctggccgaactgcgtcgtaatggtgcacaggcaccggttctgcagaccgttagccgtgcagccg
gtgcaatgctgggtagcgcagccagcgatctgagtccggatgcacattttaccgatctgggtgg
tgatagcctgagcgcactgacctttggtaatctgctgcgtgaaatttttgatgttgatgtgccg
gttggtgttattgttagtccggctaatgatctggcagccattgcaagctatattgaagcagaac
gtcagggtagcaaacgtccgacctttgcaagcgttcatggtcgtgatgcaaccgttgttcgtgc
agcagatctgaccctggataaatttctggatgcagaaaccctggcagcagcaccgaatctgccg
aaaccggcaaccgaagttcgtaccgtgctgctgacaggtgcaaccggttttctgggtcgttatc
tggcactggaatggctggaacgtatggatatggttgatggtaaagttattgcactggttcgtgc
ccgtagtgatgaagaagcacgcgcacgtctggataaaaccctttgatagtggtgatccgaaactg
ctggcacattatcagcagctggctgcagatcatctggaagttattgccggtgataaaggtgaag
caaatctgggtctgggtcaggatgtttggcagcgtctggcagataccgttgatgttattgtgga
tccggcagcactggttaatcatgttctgccgtatagcgaactgtttggtccgaatgcactgggc

FIG. 27A

accgcagaactgattcgtctggcactgaccagcaaacagaaaccgtatacctatgttagcacca
ttggtgttggcgatcagattgaaccgggtaaatttgttgaaaatgccgatattcgtcagatgag
cgcaacccgtgcaattaatgatagctatgcaaatggctacggcaatagcaaatgggcaggcgaa
gttctgctgcgcgaagcacatgatctgtgtggtctgccggttgcagtttttcgttgtgatatga
ttctggccgataccacctatgcaggtcagctgaatctgccggatatgtttacccgtctgatgct
gagcctggttgcaaccggtattgcaccgggtagcttttatgaactggatgcagatggtaatcgt
cagcgtgcacattatgatggcctgccggttgaatttattgcagcagccattagcaccctgggtt
cacagattaccgatagcgataccggttttcagacctatcatgttatgaacccgtatgatgatgg
tgttggtctggatgaatatgttgattggctggttgatgccggttatagcattgaacgtattgca
gattatagcgaatggctgcgtcgctttgaaacctcactgcgtgcactgccggatcgtcagcgcc
agtatagcctgctgccgctgctgcacaattatcgtacaccggaaaaaccgattaatggtagcat
tgcaccgaccgatgtttttcgtgcagccgttcaagaagccaaaattggtccggataaagatatt
ccgcatgttagccctccggtgattgttaaatatattaccgatctgcagctgctgggtctgctgt
aa

FIG. 27A(Cont)

MSTATHDERLDRRVHELIATDPQFAAAQPDPAITAALEQPGLRLPQIIRTVLDGYADRPALGQR
VVEFVTDAKTGRTSAQLLPRFETITYSEVAQRVSALGRALSDDAVHPGDRVCVLGFNSVDYATI
DMALGAIGAVSVPLQTSAAISSLQPIVAETEPTLIASSVNQLSDAVQLITGAEQAPTRLVVFDY
HPQVDDQREAVQDAAARLSSTGVAVQTLAELLERGKDLPAVAEPPADEDSLALLIYTSGSTGAP
KGAMYPQSNVGKMWRRGSKNWFGESAASITLNFMPMSHVMGRSILYGTLGNGGTAYFAARSDLS
TLLEDLELVRPTELNFVPRIWETLYGEFQRQVERRLSEAGDAGERRAVEAEVLAEQRQYLLGGR
FTFAMTGSAPISPELRNWVESLLEMHLMDGYGSTEAGMVLFDGEIQRPPVIDYKLVDVPDLGYF
STDRPHPRGELLLRTENMFPGYYKRAETTAGVFDEDGYYRTGDVFAEIAPDRLVYVDRRNNVLK
LAQGEFVTLAKLEAVFGNSPLIRQIYVYGNSAQPYLLAVVVPTEEALASGDPETLKPKIADSLQ
QVAKEAGLQSYEVPRDFIIETTPFSLENGLLTGIRKLAWPKLKQHYGERLEQMYADLAAGQANE
LAELRRNGAQAPVLQTVSRAAGAMLGSAASDLSPDAHFTDLGGDSLSALTFGNLLREIFDVDVP
VGVIVSPANDLAAIASYIEAERQGSKRPTFASVHGRDATVVRAADLTLDKFLDAETLAAAPNLP
KPATEVRTVLLTGATGFLGRYLALEWLERMDMVDGKVIALVRARSDEEARARLDKTFDSGDPKL
LAHYQQLAADHLEVIAGDKGEANLGLGQDVWQRLADTVDVIVDPAALVNHVLPYSELFGPNALG
TAELIRLALTSKQKPYTYVSTIGVGDQIEPGKFVENADIRQMSATRAINDSYANGYGNSKWAGE
VLLREAHDLCGLPVAVFRCDMILADTTYAGQLNLPDMFTRLMLSLVATGIAPGSFYELDADGNR
QRAHYDGLPVEFIAAAISTLGSQITDSDTGFQTYHVMNPYDDGVGLDEYVDWLVDAGYSIERIA
DYSEWLRRFETSLRALPDRQRQYSLLPLLHNYRTPEKPINGSIAPTDVFRAAVQEAKIGPDKDI
PHVSPPVIVKYITDLQLLGLL

FIG. 27B

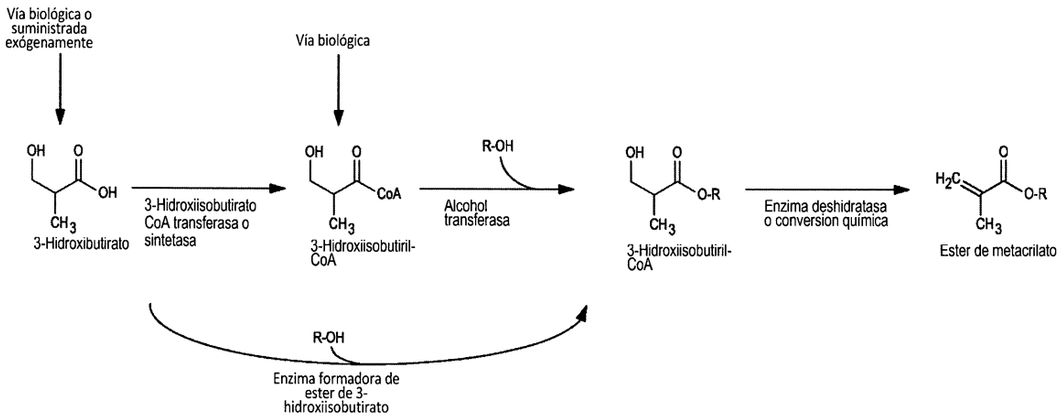

Vía biológica o suministrada exógenamente
Vía biológica
OH
O
OH
CH3
3-Hidroxibutirato
3-Hidroxiisobutirato CoA transferasa o sintetasa
CoA
3-Hidroxiisobutiril-CoA
R-OH
Alcohol transferasa
O-R
3-Hidroxiisobutiril-CoA
Enzima deshidratasa o conversion quimica
H2C
Ester de metacrilato
R-OH
Enzima formadora de ester de 3-hidroxiisobutirato

FIG. 28

315

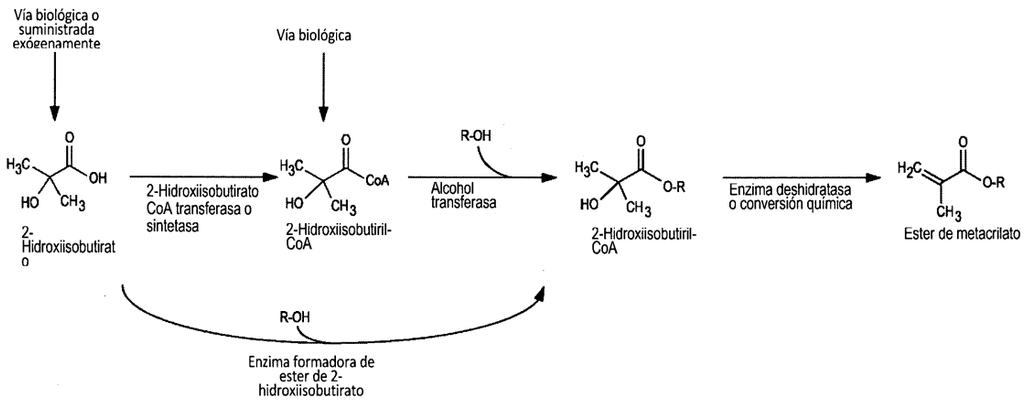

Vía biológica o suministrada exógenamente
Vía biológica
R-OH
2-Hidroxiisobutirato CoA transferasa o sintetasa
Alcohol transferasa
Enzima deshidratasa o conversión química
2-Hidroxiisobutirat o
2-Hidroxiisobutiril-CoA
2-Hidroxiisobutiril-CoA
Ester de metacrilato
R-OH
Enzima formadora de ester de 2-hidroxiisobutirato

FIG. 29

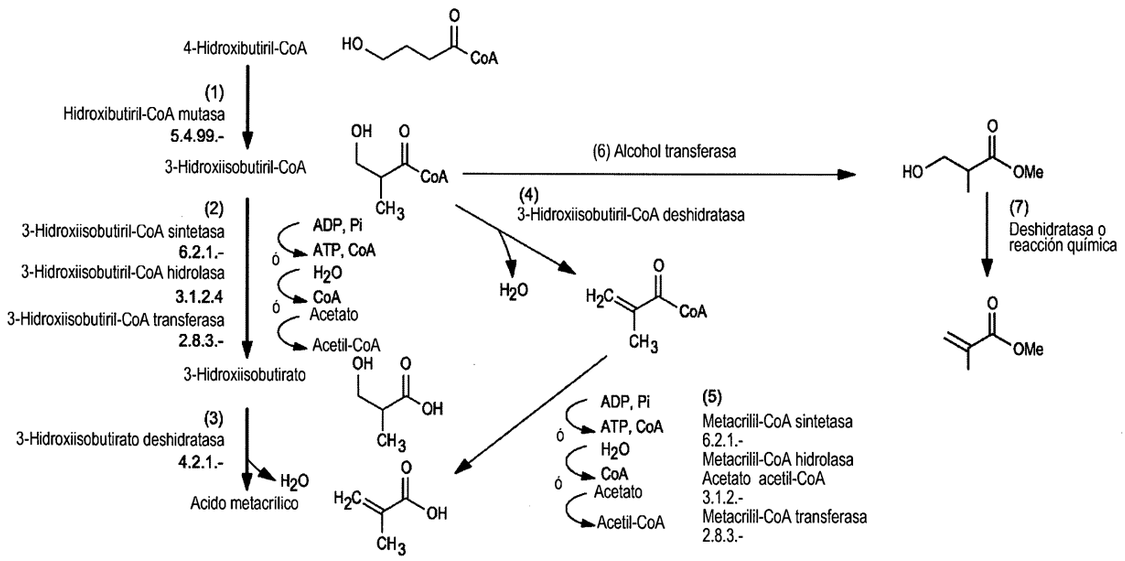

4-Hidroxibutiril-CoA
(1)
Hidroxibutiril-CoA mutasa
5.4.99.-
3-Hidroxiisobutiril-CoA
(2)
3-Hidroxiisobutiril-CoA sintetasa
6.2.1.-
3-Hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa
3.1.2.4
3-Hidroxiisobutiril-CoA transferasa
2.8.3.-
ADP, Pi
ATP, CoA
H2O
CoA
Acetato
Acetil-CoA
3-Hidroxiisobutirato
(3)
3-Hidroxiisobutirato deshidratasa
4.2.1.-
H2O
Acido metacrilico
(4)
3-Hidroxiisobutiril-CoA deshidratasa
H2O
(6) Alcohol transferasa
(7)
Deshidratasa o
reacción química
(5)
Metacrilil-CoA sintetasa
6.2.1.-
Metacrilil-CoA hidrolasa
Acetato acetil-CoA
3.1.2.-
Metacrilil-CoA transferasa
2.8.3.-

FIG. 30

319

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENOMATICA, INC.

<120> MICROORGANISMOS PARA PRODUCIR ÁCIDO METACRÍLICO Y ÉSTERES DE METACRILATO Y MÉTODOS RELACIONADOS

<130> 12956-122-228

<140> Sin assignar
<141> Adjunto

<150> 61/471,078
<151> 2011-04-01

<150> 61/571,232
<151> 2011-06-22

<150> 61/509,560
<151> 2011-07-19

<150> 61/510,054
<151> 2011-07-20

<150> 61/512,348
<151> 2011-07-27

<160> 12

<170>

<210> 1
<211> 3525
<212> DNA
<213> Nocardia iowensis

<400> 1
atggcagtgg attcaccgga tgagcggcta cagcgccgca ttgcacagtt gtttgcagaa 60

gatgagcagg tcaaggccgc acgtccgctc gaagcggtga gcgcggcggt gagcgcgccc 120

ggtatgcggc tggcgcagat cgccgccact gttatggcgg gttacgccga ccgcccggcc 180

gccgggcagc gtgcgttcga actgaacacc gacgacgcga cgggccgcac ctcgctgcgg 240

ttacttcccc gattcgagac catcacctat cgcgaactgt ggcagcgagt cggcgaggtt 300

gccgcggcct ggcatcatga tcccgagaac cccttgcgcg caggtgattt cgtcgccctg 360

ctcggcttca ccagcatcga ctacgccacc ctcgacctgg ccgatatcca cctcggcgcg 420

gttaccgtgc cgttgcaggc cagcgcggcg gtgtcccagc tgatcgctat cctcaccgag 480

acttcgccgc ggctgctcgc ctcgaccccg gagcacctcg atgcggcggt cgagtgccta 540

ctcgcgggca ccacaccgga acgactggtg gtcttcgact accaccccga ggacgacgac 600

cagcgtgcgg ccttcgaatc cgcccgccgc cgccttgccg acgcgggcag cttggtgatc 660

gtcgaaacgc tcgatgccgt gcgtgcccgg ggccgcgact taccggccgc gccactgttc 720

gttcccgaca ccgacgacga cccgctggcc ctgctgatct acacctccgg cagcaccgga

780

acgccgaagg gcgcgatgta caccaatcgg ttggccgcca cgatgtggca ggggaactcg
840

atgctgcagg ggaactcgca acgggtcggg atcaatctca actacatgcc gatgagccac
900

atcgccggtc gcatatcgct gttcggcgtg ctcgctcgcg gtggcaccgc atacttcgcg
960

gccaagagcg acatgtcgac actgttcgaa gacatcggct tggtacgtcc caccgagatc
1020

ttcttcgtcc cgcgcgtgtg cgacatggtc ttccagcgct atcagagcga gctggaccgg
1080

cgctcggtgg cgggcgccga cctggacacg ctcgatcggg aagtgaaagc cgacctccgg
1140

cagaactacc tcggtgggcg cttcctggtg gcggtcgtcg gcagcgcgcc gctggccgcg
1200

gagatgaaga cgttcatgga gtccgtcctc gatctgccac tgcacgacgg gtacgggtcg
1260

accgaggcgg gcgcaagcgt gctgctcgac aaccagatcc agcggccgcc ggtgctcgat
1320

tacaagctcg tcgacgtgcc cgaactgggt tacttccgca ccgaccggcc gcatccgcgc
1380

ggtgagctgt tgttgaaggc ggagaccacg attccgggct actacaagcg gcccgaggtc
1440

accgcggaga tcttcgacga ggacggcttc tacaagaccg gcgatatcgt ggccgagctc
1500

gagcacgatc ggctggtcta tgtcgaccgt cgcaacaatg tgctcaaact gtcgcagggc
1560

gagttcgtga ccgtcgccca tctcgaggcc gtgttcgcca gcagcccgct gatccggcag
1620

atcttcatct acggcagcag cgaacgttcc tatctgctcg cggtgatcgt ccccaccgac
1680

gacgcgctgc gcggccgcga caccgccacc ttgaaatcgg cactggccga atcgattcag
1740

cgcatcgcca aggacgcgaa cctgcagccc tacgagattc cgcgcgattt cctgatcgag
1800

accgagccgt tcaccatcgc caacggactg ctctccggca tcgcgaagct gctgcgcccc
1860

aatctgaagg aacgctacgg cgctcagctg gagcagatgt acaccgatct cgcgacaggc
1920

caggccgatg agctgctcgc cctgcgccgc gaagccgccg acctgccggt gctcgaaacc
1980

gtcagccggg cagcgaaagc gatgctcggc gtcgcctccg ccgatatgcg tcccgacgcg
2040

cacttcaccg acctgggcgg cgattccctt tccgcgctgt cgttctcgaa cctgctgcac
2100

gagatcttcg gggtcgaggt gccggtgggt gtcgtcgtca gcccggcgaa cgagctgcgc
2160

gatctggcga attacattga ggcggaacgc aactcgggcg cgaagcgtcc caccttcacc
2220

tcggtgcacg gcggcggttc cgagatccgc gccgccgatc tgaccctcga caagttcatc

2280

gatgcccgca ccctggccgc cgccgacagc attccgcacg cgccggtgcc agcgcagacg
2340

gtgctgctga ccggcgcgaa cggctacctc ggccggttcc tgtgcctgga atggctggag
2400

cggctggaca agacgggtgg cacgctgatc tgcgtcgtgc gcggtagtga cgcggccgcg
2460

gcccgtaaac ggctggactc ggcgttcgac agcggcgatc ccggcctgct cgagcactac
2520

cagcaactgg ccgcacggac cctggaagtc ctcgccggtg atatcggcga cccgaatctc
2580

ggtctggacg acgcgacttg gcagcggttg gccgaaaccg tcgacctgat cgtccatccc
2640

gccgcgttgg tcaaccacgt ccttccctac acccagctgt tcggccccaa tgtcgtcggc
2700

accgccgaaa tcgtccggtt ggcgatcacg gcgcggcgca agccggtcac ctacctgtcg
2760

accgtcggag tggccgacca ggtcgacccg gcggagtatc aggaggacag cgacgtccgc
2820

gagatgagcg cggtgcgcgt cgtgcgcgag agttacgcca acggctacgg caacagcaag
2880

tgggcggggg aggtcctgct gcgcgaagca cacgatctgt gtggcttgcc ggtcgcggtg
2940

ttccgttcgg acatgatcct ggcgcacagc cggtacgcgg gtcagctcaa cgtccaggac
3000

gtgttcaccc ggctgatcct cagcctggtc gccaccggca tcgcgccgta ctcgttctac
3060

cgaaccgacg cggacggcaa ccggcagcgg gcccactatg acggcttgcc ggcggacttc
3120

acggcggcgg cgatcaccgc gctcggcatc caagccaccg aaggcttccg gacctacgac
3180

gtgctcaatc cgtacgacga tggcatctcc ctcgatgaat tcgtcgactg gctcgtcgaa
3240

tccggccacc cgatccagcg catcaccgac tacagcgact ggttccaccg tttcgagacg
3300

gcgatccgcg cgctgccgga aaagcaacgc caggcctcgg tgctgccgtt gctggacgcc
3360

taccgcaacc cctgcccggc ggtccgcggc gcgatactcc cggccaagga gttccaagcg
3420

gcggtgcaaa cagccaaaat cggtccggaa caggacatcc cgcatttgtc cgcgccactg
3480

atcgataagt acgtcagcga tctggaactg cttcagctgc tctaa
3525

<210> 2
<211> 1174
<212> PRT
<213> Nocardia iowensis

<400> 2
Met Ala Val Asp Ser Pro Asp Glu Arg Leu Gln Arg Arg Ile Ala Gln
1 5 10 15

```
Leu Phe Ala Glu Asp Glu Gln Val Lys Ala Ala Arg Pro Leu Glu Ala
            20                  25                  30

Val Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro Gly Met Arg Leu Ala Gln Ile Ala
        35                  40                  45

Ala Thr Val Met Ala Gly Tyr Ala Asp Arg Pro Ala Ala Gly Gln Arg
    50                  55                  60

Ala Phe Glu Leu Asn Thr Asp Asp Ala Thr Gly Arg Thr Ser Leu Arg
65                  70                  75                  80

Leu Leu Pro Arg Phe Glu Thr Ile Thr Tyr Arg Glu Leu Trp Gln Arg
                85                  90                  95

Val Gly Glu Val Ala Ala Ala Trp His His Asp Pro Glu Asn Pro Leu
            100                 105                 110

Arg Ala Gly Asp Phe Val Ala Leu Leu Gly Phe Thr Ser Ile Asp Tyr
        115                 120                 125

Ala Thr Leu Asp Leu Ala Asp Ile His Leu Gly Ala Val Thr Val Pro
    130                 135                 140

Leu Gln Ala Ser Ala Ala Val Ser Gln Leu Ile Ala Ile Leu Thr Glu
145                 150                 155                 160

Thr Ser Pro Arg Leu Leu Ala Ser Thr Pro Glu His Leu Asp Ala Ala
                165                 170                 175

Val Glu Cys Leu Leu Ala Gly Thr Thr Pro Glu Arg Leu Val Val Phe
            180                 185                 190

Asp Tyr His Pro Glu Asp Asp Asp Gln Arg Ala Ala Phe Glu Ser Ala
        195                 200                 205

Arg Arg Arg Leu Ala Asp Ala Gly Ser Leu Val Ile Val Glu Thr Leu
    210                 215                 220

Asp Ala Val Arg Ala Arg Gly Arg Asp Leu Pro Ala Ala Pro Leu Phe
225                 230                 235                 240

Val Pro Asp Thr Asp Asp Asp Pro Leu Ala Leu Leu Ile Tyr Thr Ser
                245                 250                 255

Gly Ser Thr Gly Thr Pro Lys Gly Ala Met Tyr Thr Asn Arg Leu Ala
            260                 265                 270

Ala Thr Met Trp Gln Gly Asn Ser Met Leu Gln Gly Asn Ser Gln Arg
        275                 280                 285

Val Gly Ile Asn Leu Asn Tyr Met Pro Met Ser His Ile Ala Gly Arg
    290                 295                 300

Ile Ser Leu Phe Gly Val Leu Ala Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Phe Ala
305                 310                 315                 320
```

```
Ala Lys Ser Asp Met Ser Thr Leu Phe Glu Asp Ile Gly Leu Val Arg
                325                 330                 335

Pro Thr Glu Ile Phe Phe Val Pro Arg Val Cys Asp Met Val Phe Gln
            340                 345                 350

Arg Tyr Gln Ser Glu Leu Asp Arg Arg Ser Val Ala Gly Ala Asp Leu
        355                 360                 365

Asp Thr Leu Asp Arg Glu Val Lys Ala Asp Leu Arg Gln Asn Tyr Leu
    370                 375                 380

Gly Gly Arg Phe Leu Val Ala Val Val Gly Ser Ala Pro Leu Ala Ala
385                 390                 395                 400

Glu Met Lys Thr Phe Met Glu Ser Val Leu Asp Leu Pro Leu His Asp
                405                 410                 415

Gly Tyr Gly Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ser Val Leu Leu Asp Asn Gln
            420                 425                 430

Ile Gln Arg Pro Pro Val Leu Asp Tyr Lys Leu Val Asp Val Pro Glu
        435                 440                 445

Leu Gly Tyr Phe Arg Thr Asp Arg Pro His Pro Arg Gly Glu Leu Leu
    450                 455                 460

Leu Lys Ala Glu Thr Thr Ile Pro Gly Tyr Tyr Lys Arg Pro Glu Val
465                 470                 475                 480

Thr Ala Glu Ile Phe Asp Glu Asp Gly Phe Tyr Lys Thr Gly Asp Ile
                485                 490                 495

Val Ala Glu Leu Glu His Asp Arg Leu Val Tyr Val Asp Arg Arg Asn
            500                 505                 510

Asn Val Leu Lys Leu Ser Gln Gly Glu Phe Val Thr Val Ala His Leu
        515                 520                 525

Glu Ala Val Phe Ala Ser Ser Pro Leu Ile Arg Gln Ile Phe Ile Tyr
    530                 535                 540

Gly Ser Ser Glu Arg Ser Tyr Leu Leu Ala Val Ile Val Pro Thr Asp
545                 550                 555                 560

Asp Ala Leu Arg Gly Arg Asp Thr Ala Thr Leu Lys Ser Ala Leu Ala
                565                 570                 575

Glu Ser Ile Gln Arg Ile Ala Lys Asp Ala Asn Leu Gln Pro Tyr Glu
            580                 585                 590

Ile Pro Arg Asp Phe Leu Ile Glu Thr Glu Pro Phe Thr Ile Ala Asn
        595                 600                 605

Gly Leu Leu Ser Gly Ile Ala Lys Leu Leu Arg Pro Asn Leu Lys Glu
```

610 615 620

Arg Tyr Gly Ala Gln Leu Glu Gln Met Tyr Thr Asp Leu Ala Thr Gly
625 630 635 640

Gln Ala Asp Glu Leu Leu Ala Leu Arg Arg Glu Ala Ala Asp Leu Pro
645 650 655

Val Leu Glu Thr Val Ser Arg Ala Ala Lys Ala Met Leu Gly Val Ala
660 665 670

Ser Ala Asp Met Arg Pro Asp Ala His Phe Thr Asp Leu Gly Gly Asp
675 680 685

Ser Leu Ser Ala Leu Ser Phe Ser Asn Leu Leu His Glu Ile Phe Gly
690 695 700

Val Glu Val Pro Val Gly Val Val Val Ser Pro Ala Asn Glu Leu Arg
705 710 715 720

Asp Leu Ala Asn Tyr Ile Glu Ala Glu Arg Asn Ser Gly Ala Lys Arg
725 730 735

Pro Thr Phe Thr Ser Val His Gly Gly Gly Ser Glu Ile Arg Ala Ala
740 745 750

Asp Leu Thr Leu Asp Lys Phe Ile Asp Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala
755 760 765

Asp Ser Ile Pro His Ala Pro Val Pro Ala Gln Thr Val Leu Leu Thr
770 775 780

Gly Ala Asn Gly Tyr Leu Gly Arg Phe Leu Cys Leu Glu Trp Leu Glu
785 790 795 800

Arg Leu Asp Lys Thr Gly Gly Thr Leu Ile Cys Val Val Arg Gly Ser
805 810 815

Asp Ala Ala Ala Ala Arg Lys Arg Leu Asp Ser Ala Phe Asp Ser Gly
820 825 830

Asp Pro Gly Leu Leu Glu His Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Arg Thr Leu
835 840 845

Glu Val Leu Ala Gly Asp Ile Gly Asp Pro Asn Leu Gly Leu Asp Asp
850 855 860

Ala Thr Trp Gln Arg Leu Ala Glu Thr Val Asp Leu Ile Val His Pro
865 870 875 880

Ala Ala Leu Val Asn His Val Leu Pro Tyr Thr Gln Leu Phe Gly Pro
885 890 895

Asn Val Val Gly Thr Ala Glu Ile Val Arg Leu Ala Ile Thr Ala Arg
900 905 910

```
Arg Lys Pro Val Thr Tyr Leu Ser Thr Val Gly Val Ala Asp Gln Val
        915                 920                 925

Asp Pro Ala Glu Tyr Gln Glu Asp Ser Asp Val Arg Glu Met Ser Ala
    930                 935                 940

Val Arg Val Val Arg Glu Ser Tyr Ala Asn Gly Tyr Gly Asn Ser Lys
945                 950                 955                 960

Trp Ala Gly Glu Val Leu Leu Arg Glu Ala His Asp Leu Cys Gly Leu
                965                 970                 975

Pro Val Ala Val Phe Arg Ser Asp Met Ile Leu Ala His Ser Arg Tyr
            980                 985                 990

Ala Gly Gln Leu Asn Val Gln Asp  Val Phe Thr Arg Leu  Ile Leu Ser
        995                 1000                1005

Leu Val  Ala Thr Gly Ile Ala  Pro Tyr Ser Phe Tyr  Arg Thr Asp
    1010                1015                1020

Ala Asp  Gly Asn Arg Gln Arg  Ala His Tyr Asp Gly  Leu Pro Ala
    1025                1030                1035

Asp Phe  Thr Ala Ala Ala Ile  Thr Ala Leu Gly Ile  Gln Ala Thr
    1040                1045                1050

Glu Gly  Phe Arg Thr Tyr Asp  Val Leu Asn Pro Tyr  Asp Asp Gly
    1055                1060                1065

Ile Ser  Leu Asp Glu Phe Val  Asp Trp Leu Val Glu  Ser Gly His
    1070                1075                1080

Pro Ile  Gln Arg Ile Thr Asp  Tyr Ser Asp Trp Phe  His Arg Phe
    1085                1090                1095

Glu Thr  Ala Ile Arg Ala Leu  Pro Glu Lys Gln Arg  Gln Ala Ser
    1100                1105                1110

Val Leu  Pro Leu Leu Asp Ala  Tyr Arg Asn Pro Cys  Pro Ala Val
    1115                1120                1125

Arg Gly  Ala Ile Leu Pro Ala  Lys Glu Phe Gln Ala  Ala Val Gln
    1130                1135                1140

Thr Ala  Lys Ile Gly Pro Glu  Gln Asp Ile Pro His  Leu Ser Ala
    1145                1150                1155

Pro Leu  Ile Asp Lys Tyr Val  Ser Asp Leu Glu Leu  Leu Gln Leu
    1160                1165                1170

Leu
```

<210> 3
<211> 669
<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: polinucleótido
Sintético

<400> 3
atgattgaaa ccattctgcc tgcaggcgtt gaaagcgcag aactgctgga atatccggaa
60

gatctgaaag cacatccggc agaagaacat ctgattgcca aaagcgttga aaaacgtcgt
120

cgtgatttta ttggtgcacg tcattgtgca cgtctggcac tggcagaact gggtgaacct
180

ccggttgcaa ttggtaaagg tgaacgtggt gcaccgattt ggcctcgtgg tgttgttggt
240

agcctgaccc attgtgatgg ttatcgtgca gcagcagttg cacataaaat gcgctttcgc
300

agcattggta ttgatgcaga accgcatgca accctgccgg aaggtgttct ggatagcgtt
360

agcctgccgc cggaacgtga atggctgaaa accaccgata gcgcactgca tctggatcgt
420

ctgctgtttt gtgcaaaaga agccacctat aaagcctggt ggccgctgac agcacgttgg
480

ctgggttttg aagaagccca tattaccttt gaaattgaag atggtagcgc agatagcggt
540

aatggcacct ttcatagcga actgctggtt ccgggtcaga ccaatgatgg tggtacaccg
600

ctgctgagct ttgatggtcg ttggctgatt gcagatggtt ttattctgac cgcaattgcc
660

tatgcctaa
669

<210> 4
<211> 222
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: polinucleótido
Sintético

<400> 4
Met Ile Glu Thr Ile Leu Pro Ala Gly Val Glu Ser Ala Glu Leu Leu
1 5 10 15

Glu Tyr Pro Glu Asp Leu Lys Ala His Pro Ala Glu Glu His Leu Ile
20 25 30

Ala Lys Ser Val Glu Lys Arg Arg Arg Asp Phe Ile Gly Ala Arg His
35 40 45

Cys Ala Arg Leu Ala Leu Ala Glu Leu Gly Glu Pro Pro Val Ala Ile
50 55 60

Gly Lys Gly Glu Arg Gly Ala Pro Ile Trp Pro Arg Gly Val Val Gly
65 70 75 80

Ser Leu Thr His Cys Asp Gly Tyr Arg Ala Ala Ala Val Ala His Lys
85 90 95

Met Arg Phe Arg Ser Ile Gly Ile Asp Ala Glu Pro His Ala Thr Leu
100 105 110

Pro Glu Gly Val Leu Asp Ser Val Ser Leu Pro Pro Glu Arg Glu Trp
115 120 125

Leu Lys Thr Thr Asp Ser Ala Leu His Leu Asp Arg Leu Leu Phe Cys
130 135 140

Ala Lys Glu Ala Thr Tyr Lys Ala Trp Trp Pro Leu Thr Ala Arg Trp
145 150 155 160

Leu Gly Phe Glu Glu Ala His Ile Thr Phe Glu Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175

Ala Asp Ser Gly Asn Gly Thr Phe His Ser Glu Leu Leu Val Pro Gly
180 185 190

Gln Thr Asn Asp Gly Gly Thr Pro Leu Leu Ser Phe Asp Gly Arg Trp
195 200 205

Leu Ile Ala Asp Gly Phe Ile Leu Thr Ala Ile Ala Tyr Ala
210 215 220

<210> 5
<211> 3522
<212> DNA
<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 5
atgaccagcg atgttcacga cgccacagac ggcgtcaccg aaaccgcact cgacgacgag
60

cagtcgaccc gccgcatcgc cgagctgtac gccaccgatc ccgagttcgc cgccgccgca
120

ccgttgcccg ccgtggtcga cgcggcgcac aaacccgggc tgcggctggc agagatcctg
180

cagaccctgt tcaccggcta cggtgaccgc ccggcgctgg gataccgcgc ccgtgaactg
240

gccaccgacg agggcgggcg caccgtgacg cgtctgctgc cgcggttcga caccctcacc
300

tacgcccagg tgtggtcgcg cgtgcaagcg gtcgccgcgg ccctgcgcca caacttcgcg
360

cagccgatct accccggcga cgccgtcgcg acgatcggtt tcgcgagtcc cgattacctg
420

acgctggatc tcgtatgcgc ctacctgggc ctcgtgagtg ttccgctgca gcacaacgca
480

ccggtcagcc ggctcgcccc gatcctggcc gaggtcgaac cgcggatcct caccgtgagc
540

gccgaatacc tcgacctcgc agtcgaatcc gtgcgggacg tcaactcggt gtcgcagctc
600

gtggtgttcg accatcaccc cgaggtcgac gaccaccgcg acgcactggc ccgcgcgcgt
660

gaacaactcg ccggcaaggg catcgccgtc accaccctgg acgcgatcgc cgacgagggc
720

gccgggctgc cggccgaacc gatctacacc gccgaccatg atcagcgcct cgcgatgatc
780

ctgtacacct cgggttccac cggcgcaccc aagggtgcga tgtacaccga ggcgatggtg
840

gcgcggctgt ggaccatgtc gttcatcacg ggtgacccca cgccggtcat caacgtcaac
900

ttcatgccgc tcaaccacct gggcgggcgc atccccattt ccaccgccgt gcagaacggt
960

ggaaccagtt acttcgtacc ggaatccgac atgtccacgc tgttcgagga tctcgcgctg
1020

gtgcgcccga ccgaactcgg cctggttccg cgcgtcgccg acatgctcta ccagcaccac
1080

ctcgccaccg tcgaccgcct ggtcacgcag ggcgccgacg aactgaccgc cgagaagcag
1140

gccggtgccg aactgcgtga gcaggtgctc ggcggacgcg tgatcaccgg attcgtcagc
1200

accgcaccgc tggccgcgga gatgagggcg ttcctcgaca tcaccctggg cgcacacatc
1260

gtcgacggct acgggctcac cgagaccggc gccgtgacac gcgacggtgt gatcgtgcgg
1320

ccaccggtga tcgactacaa gctgatcgac gttcccgaac tcggctactt cagcaccgac
1380

aagccctacc cgcgtggcga actgctggtc aggtcgcaaa cgctgactcc cgggtactac
1440

aagcgccccg aggtcaccgc gagcgtcttc gaccgggacg gctactacca caccggcgac
1500

gtcatggccg agaccgcacc cgaccacctg gtgtacgtgg accgtcgcaa caacgtcctc
1560

aaactcgcgc agggcgagtt cgtggcggtc gccaacctgg aggcggtgtt ctccggcgcg
1620

gcgctggtgc gccagatctt cgtgtacggc aacagcgagc gcagtttcct tctggccgtg
1680

gtggtcccga cgccggaggc gctcgagcag tacgatccgg ccgcgctcaa ggccgcgctg
1740

gccgactcgc tgcagcgcac cgcacgcgac gccgaactgc aatcctacga ggtgccggcc
1800

gatttcatcg tcgagaccga gccgttcagc gccgccaacg ggctgctgtc gggtgtcgga
1860

aaactgctgc ggcccaacct caaagaccgc tacgggcagc gcctggagca gatgtacgcc
1920

gatatcgcgg ccacgcaggc caaccagttg cgcgaactgc ggcgcgcggc cgccacacaa
1980

ccggtgatcg acaccctcac ccaggccgct gccacgatcc tcggcaccgg gagcgaggtg
2040

gcatccgacg cccacttcac cgacctgggc ggggattccc tgtcggcgct gacactttcg
2100

aacctgctga gcgatttctt cggtttcgaa gttcccgtcg gcaccatcgt gaacccggcc
2160

accaacctcg cccaactcgc ccagcacatc gaggcgcagc gcaccgcggg tgaccgcagg
2220

ccgagtttca ccaccgtgca cggcgcggac gccaccgaga tccgggcgag tgagctgacc
2280

ctggacaagt tcatcgacgc cgaaacgctc cgggccgcac cgggtctgcc caaggtcacc
2340

accgagccac ggacggtgtt gctctcgggc gccaacggct ggctgggccg gttcctcacg
2400

ttgcagtggc tggaacgcct ggcacctgtc ggcggcaccc tcatcacgat cgtgcggggc
2460

cgcgacgacg ccgcggcccg cgcacggctg acccaggcct acgacaccga tcccgagttg
2520

tcccgccgct tcgccgagct ggccgaccgc cacctgcggg tggtcgccgg tgacatcggc
2580

gacccgaatc tgggcctcac acccgagatc tggcaccggc tcgccgccga ggtcgacctg
2640

gtggtgcatc cggcagcgct ggtcaaccac gtgctcccct accggcagct gttcggcccc
2700

aacgtcgtgg gcacggccga ggtgatcaag ctggccctca ccgaacggat caagcccgtc
2760

acgtacctgt ccaccgtgtc ggtggccatg gggatccccg acttcgagga ggacggcgac
2820

atccggaccg tgagcccggt gcgcccgctc gacggcggat acgccaacgg ctacggcaac
2880

agcaagtggg ccggcgaggt gctgctgcgg gaggcccacg atctgtgcgg gctgcccgtg
2940

gcgacgttcc gctcggacat gatcctggcg catccgcgct accgcggtca ggtcaacgtg
3000

ccagacatgt tcacgcgact cctgttgagc ctcttgatca ccggcgtcgc gccgcggtcg
3060

ttctacatcg gagacggtga gcgcccgcgg gcgcactacc ccggcctgac ggtcgatttc
3120

gtggccgagg cggtcacgac gctcggcgcg cagcagcgcg agggatacgt gtcctacgac
3180

gtgatgaacc cgcacgacga cgggatctcc ctggatgtgt tcgtggactg gctgatccgg
3240

gcgggccatc cgatcgaccg ggtcgacgac tacgacgact gggtgcgtcg gttcgagacc
3300

gcgttgaccg cgcttcccga gaagcgccgc gcacagaccg tactgccgct gctgcacgcg
3360

ttccgcgctc cgcaggcacc gttgcgcggc gcacccgaac ccacggaggt gttccacgcc
3420

gcggtgcgca ccgcgaaggt gggcccggga gacatcccgc acctcgacga ggcgctgatc
3480

gacaagtaca tacgcgatct gcgtgagttc ggtctgatct aa
3522

<210> 6
<211> 1173
<212> PRT
<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 6
Met Thr Ser Asp Val His Asp Ala Thr Asp Gly Val Thr Glu Thr Ala
1 5 10 15

Leu Asp Asp Glu Gln Ser Thr Arg Arg Ile Ala Glu Leu Tyr Ala Thr
20 25 30

Asp Pro Glu Phe Ala Ala Ala Ala Pro Leu Pro Ala Val Val Asp Ala
35 40 45

Ala His Lys Pro Gly Leu Arg Leu Ala Glu Ile Leu Gln Thr Leu Phe
50 55 60

Thr Gly Tyr Gly Asp Arg Pro Ala Leu Gly Tyr Arg Ala Arg Glu Leu
65 70 75 80

Ala Thr Asp Glu Gly Gly Arg Thr Val Thr Arg Leu Leu Pro Arg Phe
85 90 95

Asp Thr Leu Thr Tyr Ala Gln Val Trp Ser Arg Val Gln Ala Val Ala
100 105 110

Ala Ala Leu Arg His Asn Phe Ala Gln Pro Ile Tyr Pro Gly Asp Ala
115 120 125

Val Ala Thr Ile Gly Phe Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Thr Leu Asp Leu
130 135 140

Val Cys Ala Tyr Leu Gly Leu Val Ser Val Pro Leu Gln His Asn Ala
145 150 155 160

Pro Val Ser Arg Leu Ala Pro Ile Leu Ala Glu Val Glu Pro Arg Ile
165 170 175

Leu Thr Val Ser Ala Glu Tyr Leu Asp Leu Ala Val Glu Ser Val Arg
180 185 190

Asp Val Asn Ser Val Ser Gln Leu Val Val Phe Asp His His Pro Glu
195 200 205

Val Asp Asp His Arg Asp Ala Leu Ala Arg Ala Arg Glu Gln Leu Ala
210 215 220

Gly Lys Gly Ile Ala Val Thr Thr Leu Asp Ala Ile Ala Asp Glu Gly
225 230 235 240

Ala Gly Leu Pro Ala Glu Pro Ile Tyr Thr Ala Asp His Asp Gln Arg
245 250 255

Leu Ala Met Ile Leu Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Gly Ala Pro Lys Gly
260 265 270

Ala Met Tyr Thr Glu Ala Met Val Ala Arg Leu Trp Thr Met Ser Phe
275 280 285

Ile Thr Gly Asp Pro Thr Pro Val Ile Asn Val Asn Phe Met Pro Leu

```
    290                 295                 300

Asn His Leu Gly Gly Arg Ile Pro Ile Ser Thr Ala Val Gln Asn Gly
305                 310                 315                 320

Gly Thr Ser Tyr Phe Val Pro Glu Ser Asp Met Ser Thr Leu Phe Glu
                325                 330                 335

Asp Leu Ala Leu Val Arg Pro Thr Glu Leu Gly Leu Val Pro Arg Val
            340                 345                 350

Ala Asp Met Leu Tyr Gln His His Leu Ala Thr Val Asp Arg Leu Val
        355                 360                 365

Thr Gln Gly Ala Asp Glu Leu Thr Ala Glu Lys Gln Ala Gly Ala Glu
    370                 375                 380

Leu Arg Glu Gln Val Leu Gly Gly Arg Val Ile Thr Gly Phe Val Ser
385                 390                 395                 400

Thr Ala Pro Leu Ala Ala Glu Met Arg Ala Phe Leu Asp Ile Thr Leu
                405                 410                 415

Gly Ala His Ile Val Asp Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Gly Ala Val
            420                 425                 430

Thr Arg Asp Gly Val Ile Val Arg Pro Pro Val Ile Asp Tyr Lys Leu
        435                 440                 445

Ile Asp Val Pro Glu Leu Gly Tyr Phe Ser Thr Asp Lys Pro Tyr Pro
    450                 455                 460

Arg Gly Glu Leu Leu Val Arg Ser Gln Thr Leu Thr Pro Gly Tyr Tyr
465                 470                 475                 480

Lys Arg Pro Glu Val Thr Ala Ser Val Phe Asp Arg Asp Gly Tyr Tyr
                485                 490                 495

His Thr Gly Asp Val Met Ala Glu Thr Ala Pro Asp His Leu Val Tyr
            500                 505                 510

Val Asp Arg Arg Asn Asn Val Leu Lys Leu Ala Gln Gly Glu Phe Val
        515                 520                 525

Ala Val Ala Asn Leu Glu Ala Val Phe Ser Gly Ala Ala Leu Val Arg
    530                 535                 540

Gln Ile Phe Val Tyr Gly Asn Ser Glu Arg Ser Phe Leu Leu Ala Val
545                 550                 555                 560

Val Val Pro Thr Pro Glu Ala Leu Glu Gln Tyr Asp Pro Ala Ala Leu
                565                 570                 575

Lys Ala Ala Leu Ala Asp Ser Leu Gln Arg Thr Ala Arg Asp Ala Glu
            580                 585                 590
```

```
Leu Gln Ser Tyr Glu Val Pro Ala Asp Phe Ile Val Glu Thr Glu Pro
        595                 600                 605

Phe Ser Ala Ala Asn Gly Leu Leu Ser Gly Val Gly Lys Leu Leu Arg
    610                 615                 620

Pro Asn Leu Lys Asp Arg Tyr Gly Gln Arg Leu Glu Gln Met Tyr Ala
625                 630                 635                 640

Asp Ile Ala Ala Thr Gln Ala Asn Gln Leu Arg Glu Leu Arg Arg Ala
                645                 650                 655

Ala Ala Thr Gln Pro Val Ile Asp Thr Leu Thr Gln Ala Ala Ala Thr
            660                 665                 670

Ile Leu Gly Thr Gly Ser Glu Val Ala Ser Asp Ala His Phe Thr Asp
        675                 680                 685

Leu Gly Gly Asp Ser Leu Ser Ala Leu Thr Leu Ser Asn Leu Leu Ser
    690                 695                 700

Asp Phe Phe Gly Phe Glu Val Pro Val Gly Thr Ile Val Asn Pro Ala
705                 710                 715                 720

Thr Asn Leu Ala Gln Leu Ala Gln His Ile Glu Ala Gln Arg Thr Ala
                725                 730                 735

Gly Asp Arg Arg Pro Ser Phe Thr Thr Val His Gly Ala Asp Ala Thr
            740                 745                 750

Glu Ile Arg Ala Ser Glu Leu Thr Leu Asp Lys Phe Ile Asp Ala Glu
        755                 760                 765

Thr Leu Arg Ala Ala Pro Gly Leu Pro Lys Val Thr Thr Glu Pro Arg
    770                 775                 780

Thr Val Leu Leu Ser Gly Ala Asn Gly Trp Leu Gly Arg Phe Leu Thr
785                 790                 795                 800

Leu Gln Trp Leu Glu Arg Leu Ala Pro Val Gly Gly Thr Leu Ile Thr
                805                 810                 815

Ile Val Arg Gly Arg Asp Asp Ala Ala Ala Arg Ala Arg Leu Thr Gln
            820                 825                 830

Ala Tyr Asp Thr Asp Pro Glu Leu Ser Arg Arg Phe Ala Glu Leu Ala
        835                 840                 845

Asp Arg His Leu Arg Val Val Ala Gly Asp Ile Gly Asp Pro Asn Leu
    850                 855                 860

Gly Leu Thr Pro Glu Ile Trp His Arg Leu Ala Ala Glu Val Asp Leu
865                 870                 875                 880

Val Val His Pro Ala Ala Leu Val Asn His Val Leu Pro Tyr Arg Gln
                885                 890                 895
```

```
Leu Phe Gly Pro Asn Val Val Gly Thr Ala Glu Val Ile Lys Leu Ala
            900                 905                 910

Leu Thr Glu Arg Ile Lys Pro Val Thr Tyr Leu Ser Thr Val Ser Val
        915                 920                 925

Ala Met Gly Ile Pro Asp Phe Glu Glu Asp Gly Asp Ile Arg Thr Val
    930                 935                 940

Ser Pro Val Arg Pro Leu Asp Gly Gly Tyr Ala Asn Gly Tyr Gly Asn
945                 950                 955                 960

Ser Lys Trp Ala Gly Glu Val Leu Leu Arg Glu Ala His Asp Leu Cys
                965                 970                 975

Gly Leu Pro Val Ala Thr Phe Arg Ser Asp Met Ile Leu Ala His Pro
            980                 985                 990

Arg Tyr Arg Gly Gln Val Asn Val  Pro Asp Met Phe Thr  Arg Leu Leu
        995                 1000                1005

Leu Ser  Leu Leu Ile Thr Gly  Val Ala Pro Arg Ser  Phe Tyr Ile
    1010                1015                1020

Gly Asp  Gly Glu Arg Pro Arg  Ala His Tyr Pro Gly  Leu Thr Val
    1025                1030                1035

Asp Phe  Val Ala Glu Ala Val  Thr Thr Leu Gly Ala  Gln Gln Arg
    1040                1045                1050

Glu Gly  Tyr Val Ser Tyr Asp  Val Met Asn Pro His  Asp Asp Gly
    1055                1060                1065

Ile Ser  Leu Asp Val Phe Val  Asp Trp Leu Ile Arg  Ala Gly His
    1070                1075                1080

Pro Ile  Asp Arg Val Asp Asp  Tyr Asp Asp Trp Val  Arg Arg Phe
    1085                1090                1095

Glu Thr  Ala Leu Thr Ala Leu  Pro Glu Lys Arg Arg  Ala Gln Thr
    1100                1105                1110

Val Leu  Pro Leu Leu His Ala  Phe Arg Ala Pro Gln  Ala Pro Leu
    1115                1120                1125

Arg Gly  Ala Pro Glu Pro Thr  Glu Val Phe His Ala  Ala Val Arg
    1130                1135                1140

Thr Ala  Lys Val Gly Pro Gly  Asp Ile Pro His Leu  Asp Glu Ala
    1145                1150                1155

Leu Ile  Asp Lys Tyr Ile Arg  Asp Leu Arg Glu Phe  Gly Leu Ile
    1160                1165                1170
```

<210> 7
<211> 3522

<212> DNA
<213> Mycobacterium avium

<400> 7
atgtcgactg ccacccatga cgaacgactc gaccgtcgcg tccacgaact catcgccacc
60

gacccgcaat tcgccgccgc ccaacccgac ccggcgatca ccgccgccct cgaacagccc
120

gggctgcggc tgccgcagat catccgcacc gtgctcgacg gctacgccga ccggccggcg
180

ctgggacagc gcgtggtgga gttcgtcacg gacgccaaga ccgggcgcac gtcggcgcag
240

ctgctccccc gcttcgagac catcacgtac agcgaagtag cgcagcgtgt ttcggcgctg
300

ggccgcgccc tgtccgacga cgcggtgcac cccggcgacc gggtgtgcgt gctgggcttc
360

aacagcgtcg actacgccac catcgacatg gcgctgggcg ccatcggcgc cgtctcggtg
420

ccgctgcaga ccagcgcggc aatcagctcg ctgcagccga tcgtggccga gaccgagccc
480

accctgatcg cgtccagcgt gaaccagctg tccgacgcgg tgcagctgat caccggcgcc
540

gagcaggcgc ccacccggct ggtggtgttc gactaccacc cgcaggtcga cgaccagcgc
600

gaggccgtcc aggacgccgc ggcgcggctg tccagcaccg gcgtggccgt ccagacgctg
660

gccgagctgc tggagcgcgg caaggacctg cccgccgtcg cggagccgcc cgccgacgag
720

gactcgctgg ccctgctgat ctacacctcc gggtccaccg gcgcccccaa gggcgcgatg
780

tacccacaga gcaacgtcgg caagatgtgg cgccgcggca gcaagaactg gttcggcgag
840

agcgccgcgt cgatcaccct gaacttcatg ccgatgagcc acgtgatggg ccgaagcatc
900

ctctacggca cgctgggcaa cggcggcacc gcctacttcg ccgcccgcag cgacctgtcc
960

accctgcttg aggacctcga gctggtgcgg cccaccgagc tcaacttcgt cccgcggatc
1020

tgggagacgc tgtacggcga attccagcgt caggtcgagc ggcggctctc cgaggccggg
1080

gacgccggcg aacgtcgcgc cgtcgaggcc gaggtgctgg ccgagcagcg ccagtacctg
1140

ctgggcgggc ggttcacctt cgcgatgacg ggctcggcgc ccatctcgcc ggagctgcgc
1200

aactgggtcg agtcgctgct cgaaatgcac ctgatggacg gctacggctc caccgaggcc
1260

ggaatggtgt tgttcgacgg ggagattcag cgcccgccgg tgatcgacta caagctggtc
1320

gacgtgccgg acctgggcta cttcagcacc gaccggccgc atccgcgcgg cgagctgctg
1380

ctgcgcaccg agaacatgtt cccgggctac tacaagcggg ccgaaaccac cgcgggcgtc
1440

ttcgacgagg acggctacta ccgcaccggc gacgtgttcg ccgagatcgc cccggaccgg
1500

ctggtctacg tcgaccgccg caacaacgtg ctcaagctgg cgcagggcga attcgtcacg
1560

ctggccaagc tggaggcggt gttcggcaac agcccgctga tccgccagat ctacgtctac
1620

ggcaacagcg cccagcccta cctgctggcg gtcgtggtgc ccaccgagga ggcgctggcc
1680

tcgggtgacc ccgagacgct caagcccaag atcgccgact cgctgcagca ggtcgccaag
1740

gaggccggcc tgcagtccta cgaggtgccg cgcgacttca tcatcgagac caccccgttc
1800

agcctggaaa acggtctgct gaccgggatc cggaagctgg cgtggccgaa actgaagcag
1860

cactacgggg aacggctgga gcagatgtac gccgacctgg ccgccggaca ggccaacgag
1920

ctggccgagc tgcgccgcaa cggtgcccag gcgccggtgt tgcagaccgt gagccgcgcc
1980

gcgggcgcca tgctgggttc ggccgcctcc gacctgtccc ccgacgccca cttcaccgat
2040

ctgggcggag actcgttgtc ggcgttgaca ttcggcaacc tgctgcgcga gatcttcgac
2100

gtcgacgtgc cggtaggcgt gatcgtcagc ccggccaacg acctggcggc catcgcgagc
2160

tacatcgagg ccgagcggca gggcagcaag cgcccgacgt tcgcctcggt gcacggccgg
2220

gacgcgaccg tggtgcgcgc cgccgacctg acgctggaca agttcctcga cgccgagacg
2280

ctggccgccg cgccgaacct gcccaagccg gccaccgagg tgcgcaccgt gctgctgacc
2340

ggcgccaccg gcttcctggg ccgctacctg gccctggaat ggctggagcg gatggacatg
2400

gtggacggca aggtcatcgc cctggtccgg gcccgctccg acgaggaggc acgcgcccgg
2460

ctggacaaga ccttcgacag cggcgacccg aaactgctcg cgcactacca gcagctggcc
2520

gccgatcacc tggaggtcat cgccggcgac aagggcgagg ccaatctggg cctgggccaa
2580

gacgtttggc aacgactggc cgacacggtc gacgtgatcg tcgaccccgc cgcgctggtc
2640

aaccacgtgt tgccgtacag cgagctgttc gggcccaacg ccctgggcac cgcggagctg
2700

atccggctgg cgctgacgtc caagcagaag ccgtacacct acgtgtccac catcggcgtg
2760

ggcgaccaga tcgagccggg caagttcgtc gagaacgccg acatccggca gatgagcgcc
2820

acccgggcga tcaacgacag ctacgccaac ggctatggca acagcaagtg ggccggcgag
2880

gtgctgctgc gcgaggcgca cgacctgtgc gggctgcccg tcgcggtgtt ccgctgcgac
2940

atgatcctgg ccgacaccac gtatgccggg cagctcaacc tgccggacat gttcacccgg
3000

ctgatgctga gcctggtggc caccgggatc gcgcccggct cgttctacga gctcgacgcc
3060

gacggcaacc ggcagcgggc gcactacgac ggcctgccgg tcgagttcat cgccgcggcg
3120

atctcgacgc tgggttcgca gatcaccgac agcgacaccg gcttccagac ctaccacgtg
3180

atgaacccct acgatgacgg cgtcggtctg gacgagtacg tcgattggct ggtggacgcc
3240

ggctattcga tcgagcggat cgccgactac tccgaatggc tgcggcggtt cgagacctcg
3300

ctgcgggccc tgccggaccg gcagcgccag tactcgctgc tgccgctgct gcacaactac
3360

cgcacgccgg agaagccgat caacgggtcg atagctccca ccgacgtgtt ccgggcagcg
3420

gtgcaggagg cgaaaatcgg ccccgacaaa gacattccgc acgtgtcgcc gccggtcatc
3480

gtcaagtaca tcaccgacct gcagctgctc gggctgctct aa
3522

<210> 8
<211> 1173
<212> PRT
<213> Mycobacterium avium

<400> 8
Met Ser Thr Ala Thr His Asp Glu Arg Leu Asp Arg Arg Val His Glu
1 5 10 15

Leu Ile Ala Thr Asp Pro Gln Phe Ala Ala Ala Gln Pro Asp Pro Ala
20 25 30

Ile Thr Ala Ala Leu Glu Gln Pro Gly Leu Arg Leu Pro Gln Ile Ile
35 40 45

Arg Thr Val Leu Asp Gly Tyr Ala Asp Arg Pro Ala Leu Gly Gln Arg
50 55 60

Val Val Glu Phe Val Thr Asp Ala Lys Thr Gly Arg Thr Ser Ala Gln
65 70 75 80

Leu Leu Pro Arg Phe Glu Thr Ile Thr Tyr Ser Glu Val Ala Gln Arg
85 90 95

Val Ser Ala Leu Gly Arg Ala Leu Ser Asp Asp Ala Val His Pro Gly
100 105 110

Asp Arg Val Cys Val Leu Gly Phe Asn Ser Val Asp Tyr Ala Thr Ile
115 120 125

Asp Met Ala Leu Gly Ala Ile Gly Ala Val Ser Val Pro Leu Gln Thr
130 135 140

Ser Ala Ala Ile Ser Ser Leu Gln Pro Ile Val Ala Glu Thr Glu Pro

```
145                 150                 155                 160

Thr Leu Ile Ala Ser Ser Val Asn Gln Leu Ser Asp Ala Val Gln Leu
                165                 170                 175

Ile Thr Gly Ala Glu Gln Ala Pro Thr Arg Leu Val Val Phe Asp Tyr
            180                 185                 190

His Pro Gln Val Asp Asp Gln Arg Glu Ala Val Gln Asp Ala Ala Ala
        195                 200                 205

Arg Leu Ser Ser Thr Gly Val Ala Val Gln Thr Leu Ala Glu Leu Leu
    210                 215                 220

Glu Arg Gly Lys Asp Leu Pro Ala Val Ala Glu Pro Pro Ala Asp Glu
225                 230                 235                 240

Asp Ser Leu Ala Leu Leu Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Gly Ala Pro
                245                 250                 255

Lys Gly Ala Met Tyr Pro Gln Ser Asn Val Gly Lys Met Trp Arg Arg
            260                 265                 270

Gly Ser Lys Asn Trp Phe Gly Glu Ser Ala Ala Ser Ile Thr Leu Asn
        275                 280                 285

Phe Met Pro Met Ser His Val Met Gly Arg Ser Ile Leu Tyr Gly Thr
    290                 295                 300

Leu Gly Asn Gly Gly Thr Ala Tyr Phe Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser
305                 310                 315                 320

Thr Leu Leu Glu Asp Leu Glu Leu Val Arg Pro Thr Glu Leu Asn Phe
                325                 330                 335

Val Pro Arg Ile Trp Glu Thr Leu Tyr Gly Glu Phe Gln Arg Gln Val
            340                 345                 350

Glu Arg Arg Leu Ser Glu Ala Gly Asp Ala Gly Glu Arg Arg Ala Val
        355                 360                 365

Glu Ala Glu Val Leu Ala Glu Gln Arg Gln Tyr Leu Leu Gly Gly Arg
    370                 375                 380

Phe Thr Phe Ala Met Thr Gly Ser Ala Pro Ile Ser Pro Glu Leu Arg
385                 390                 395                 400

Asn Trp Val Glu Ser Leu Leu Glu Met His Leu Met Asp Gly Tyr Gly
                405                 410                 415

Ser Thr Glu Ala Gly Met Val Leu Phe Asp Gly Glu Ile Gln Arg Pro
            420                 425                 430

Pro Val Ile Asp Tyr Lys Leu Val Asp Val Pro Asp Leu Gly Tyr Phe
        435                 440                 445
```

```
Ser Thr Asp Arg Pro His Pro Arg Gly Glu Leu Leu Leu Arg Thr Glu
    450                 455                 460

Asn Met Phe Pro Gly Tyr Tyr Lys Arg Ala Glu Thr Thr Ala Gly Val
465                 470                 475                 480

Phe Asp Glu Asp Gly Tyr Tyr Arg Thr Gly Asp Val Phe Ala Glu Ile
                485                 490                 495

Ala Pro Asp Arg Leu Val Tyr Val Asp Arg Arg Asn Asn Val Leu Lys
            500                 505                 510

Leu Ala Gln Gly Glu Phe Val Thr Leu Ala Lys Leu Glu Ala Val Phe
        515                 520                 525

Gly Asn Ser Pro Leu Ile Arg Gln Ile Tyr Val Tyr Gly Asn Ser Ala
    530                 535                 540

Gln Pro Tyr Leu Leu Ala Val Val Val Pro Thr Glu Glu Ala Leu Ala
545                 550                 555                 560

Ser Gly Asp Pro Glu Thr Leu Lys Pro Lys Ile Ala Asp Ser Leu Gln
                565                 570                 575

Gln Val Ala Lys Glu Ala Gly Leu Gln Ser Tyr Glu Val Pro Arg Asp
            580                 585                 590

Phe Ile Ile Glu Thr Thr Pro Phe Ser Leu Glu Asn Gly Leu Leu Thr
        595                 600                 605

Gly Ile Arg Lys Leu Ala Trp Pro Lys Leu Lys Gln His Tyr Gly Glu
    610                 615                 620

Arg Leu Glu Gln Met Tyr Ala Asp Leu Ala Ala Gly Gln Ala Asn Glu
625                 630                 635                 640

Leu Ala Glu Leu Arg Arg Asn Gly Ala Gln Ala Pro Val Leu Gln Thr
                645                 650                 655

Val Ser Arg Ala Ala Gly Ala Met Leu Gly Ser Ala Ala Ser Asp Leu
            660                 665                 670

Ser Pro Asp Ala His Phe Thr Asp Leu Gly Gly Asp Ser Leu Ser Ala
        675                 680                 685

Leu Thr Phe Gly Asn Leu Leu Arg Glu Ile Phe Asp Val Asp Val Pro
    690                 695                 700

Val Gly Val Ile Val Ser Pro Ala Asn Asp Leu Ala Ala Ile Ala Ser
705                 710                 715                 720

Tyr Ile Glu Ala Glu Arg Gln Gly Ser Lys Arg Pro Thr Phe Ala Ser
                725                 730                 735

Val His Gly Arg Asp Ala Thr Val Val Arg Ala Ala Asp Leu Thr Leu
            740                 745                 750
```

```
Asp Lys Phe Leu Asp Ala Glu Thr Leu Ala Ala Ala Pro Asn Leu Pro
        755                 760                 765

Lys Pro Ala Thr Glu Val Arg Thr Val Leu Leu Thr Gly Ala Thr Gly
    770                 775                 780

Phe Leu Gly Arg Tyr Leu Ala Leu Glu Trp Leu Glu Arg Met Asp Met
785                 790                 795                 800

Val Asp Gly Lys Val Ile Ala Leu Val Arg Ala Arg Ser Asp Glu Glu
                805                 810                 815

Ala Arg Ala Arg Leu Asp Lys Thr Phe Asp Ser Gly Asp Pro Lys Leu
            820                 825                 830

Leu Ala His Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Asp His Leu Glu Val Ile Ala
        835                 840                 845

Gly Asp Lys Gly Glu Ala Asn Leu Gly Leu Gly Gln Asp Val Trp Gln
    850                 855                 860

Arg Leu Ala Asp Thr Val Asp Val Ile Val Asp Pro Ala Ala Leu Val
865                 870                 875                 880

Asn His Val Leu Pro Tyr Ser Glu Leu Phe Gly Pro Asn Ala Leu Gly
                885                 890                 895

Thr Ala Glu Leu Ile Arg Leu Ala Leu Thr Ser Lys Gln Lys Pro Tyr
            900                 905                 910

Thr Tyr Val Ser Thr Ile Gly Val Gly Asp Gln Ile Glu Pro Gly Lys
        915                 920                 925

Phe Val Glu Asn Ala Asp Ile Arg Gln Met Ser Ala Thr Arg Ala Ile
    930                 935                 940

Asn Asp Ser Tyr Ala Asn Gly Tyr Gly Asn Ser Lys Trp Ala Gly Glu
945                 950                 955                 960

Val Leu Leu Arg Glu Ala His Asp Leu Cys Gly Leu Pro Val Ala Val
                965                 970                 975

Phe Arg Cys Asp Met Ile Leu Ala Asp Thr Thr Tyr Ala Gly Gln Leu
            980                 985                 990

Asn Leu Pro Asp Met Phe Thr Arg  Leu Met Leu Ser Leu  Val Ala Thr
        995                 1000                1005

Gly Ile  Ala Pro Gly Ser Phe  Tyr Glu Leu Asp Ala  Asp Gly Asn
    1010                1015                1020

Arg Gln  Arg Ala His Tyr Asp  Gly Leu Pro Val Glu  Phe Ile Ala
    1025                1030                1035

Ala Ala  Ile Ser Thr Leu Gly  Ser Gln Ile Thr Asp  Ser Asp Thr
    1040                1045                1050
```

Gly Phe Gln Thr Tyr His Val Met Asn Pro Tyr Asp Asp Gly Val
1055 1060 1065

Gly Leu Asp Glu Tyr Val Asp Trp Leu Val Asp Ala Gly Tyr Ser
1070 1075 1080

Ile Glu Arg Ile Ala Asp Tyr Ser Glu Trp Leu Arg Arg Phe Glu
1085 1090 1095

Thr Ser Leu Arg Ala Leu Pro Asp Arg Gln Arg Gln Tyr Ser Leu
1100 1105 1110

Leu Pro Leu Leu His Asn Tyr Arg Thr Pro Glu Lys Pro Ile Asn
1115 1120 1125

Gly Ser Ile Ala Pro Thr Asp Val Phe Arg Ala Ala Val Gln Glu
1130 1135 1140

Ala Lys Ile Gly Pro Asp Lys Asp Ile Pro His Val Ser Pro Pro
1145 1150 1155

Val Ile Val Lys Tyr Ile Thr Asp Leu Gln Leu Leu Gly Leu Leu
1160 1165 1170

<210> 9
<211> 3525
<212> DNA
<213> Mycobacterium marinum

<400> 9
atgtcgccaa tcacgcgtga agagcggctc gagcgccgca tccaggacct ctacgccaac
60

gacccgcagt tcgccgccgc caaacccgcc acggcgatca ccgcagcaat cgagcggccg
120

ggtctaccgc taccccagat catcgagacc gtcatgaccg gatacgccga tcggccggct
180

ctcgctcagc gctcggtcga attcgtgacc gacgccggca ccggccacac cacgctgcga
240

ctgctccccc acttcgaaac catcagctac ggcgagcttt gggaccgcat cagcgcactg
300

gccgacgtgc tcagcaccga acagacggtg aaaccgggcg accgggtctg cttgttgggc
360

ttcaacagcg tcgactacgc cacgatcgac atgactttgg cgcggctggg cgcggtggcc
420

gtaccactgc agaccagcgc ggcgataacc cagctgcagc cgatcgtcgc cgagacccag
480

cccaccatga tcgcggccag cgtcgacgca ctcgctgacg ccaccgaatt ggctctgtcc
540

ggtcagaccg ctacccgagt cctggtgttc gaccaccacc ggcaggttga cgcacaccgc
600

gcagcggtcg aatccgcccg ggagcgcctg gccggctcgg cggtcgtcga aaccctggcc
660

gaggccatcg cgcgcggcga cgtgccccgc ggtgcgtccg ccggctcggc gcccggcacc
720

gatgtgtccg acgactcgct cgcgctactg atctacacct cgggcagcac gggtgcgccc
780

aagggcgcga tgtacccccg acgcaacgtt gcgaccttct ggcgcaagcg cacctggttc
840

gaaggcggct acgagccgtc gatcacgctg aacttcatgc caatgagcca cgtcatgggc
900

cgccaaatcc tgtacggcac gctgtgcaat ggcggcaccg cctacttcgt ggcgaaaagc
960

gatctctcca ccttgttcga agacctggcg ctggtgcggc ccaccgagct gaccttcgtg
1020

ccgcgcgtgt gggacatggt gttcgacgag tttcagagtg aggtcgaccg ccgcctggtc
1080

gacggcgccg accgggtcgc gctcgaagcc caggtcaagg ccgagatacg caacgacgtg
1140

ctcggtggac ggtataccag cgcactgacc ggctccgccc ctatctccga cgagatgaag
1200

gcgtgggtcg aggagctgct cgacatgcat ctggtcgagg gctacggctc caccgaggcc
1260

gggatgatcc tgatcgacgg agccattcgg cgcccggcgg tactcgacta caagctggtc
1320

gatgttcccg acctgggtta cttcctgacc gaccggccac atccgcgggg cgagttgctg
1380

gtcaagaccg atagtttgtt cccgggctac taccagcgag ccgaagtcac cgccgacgtg
1440

ttcgatgctg acggcttcta ccggaccggc gacatcatgg ccgaggtcgg ccccgaacag
1500

ttcgtgtacc tcgaccgccg caacaacgtg ttgaagctgt cgcagggcga gttcgtcacc
1560

gtctccaaac tcgaagcggt gtttggcgac agcccactgg tacggcagat ctacatctac
1620

ggcaacagcg cccgtgccta cctgttggcg gtgatcgtcc ccacccagga ggcgctggac
1680

gccgtgcctg tcgaggagct caaggcgcgg ctgggcgact cgctgcaaga ggtcgcaaag
1740

gccgccggcc tgcagtccta cgagatcccg cgcgacttca tcatcgaaac aacaccatgg
1800

acgctggaga acggcctgct caccggcatc cgcaagttgg ccaggccgca gctgaaaaag
1860

cattacggcg agcttctcga gcagatctac acggacctgg cacacggcca ggccgacgaa
1920

ctgcgctcgc tgcgccaaag cggtgccgat gcgccggtgc tggtgacggt gtgccgtgcg
1980

gcggccgcgc tgttgggcgg cagcgcctct gacgtccagc ccgatgcgca cttcaccgat
2040

ttgggcggcg actcgctgtc ggcgctgtcg ttcaccaacc tgctgcacga gatcttcgac
2100

atcgaagtgc cggtgggcgt catcgtcagc cccgccaacg acttgcaggc cctggccgac
2160

tacgtcgagg cggctcgcaa acccggctcg tcacggccga ccttcgcctc ggtccacggc
2220

gcctcgaatg ggcaggtcac cgaggtgcat gccggtgacc tgtccctgga caaattcatc
2280

gatgccgcaa ccctggccga agctccccgg ctgcccgccg caaacaccca agtgcgcacc
2340

gtgctgctga ccggcgccac cggcttcctc gggcgctacc tggccctgga atggctggag
2400

cggatggacc tggtcgacgg caaactgatc tgcctggtcc gggccaagtc cgacaccgaa
2460

gcacgggcgc ggctggacaa gacgttcgac agcggcgacc ccgaactgct ggcccactac
2520

cgcgcactgg ccggcgacca cctcgaggtg ctcgccggtg acaagggcga agccgacctc
2580

ggactggacc ggcagacctg gcaacgcctg gccgacacgg tcgacctgat cgtcgacccc
2640

gcggccctgg tcaaccacgt actgccatac agccagctgt tcgggcccaa cgcgctgggc
2700

accgccgagc tgctgcggct ggcgctcacc tccaagatca agccctacag ctacacctcg
2760

acaatcggtg tcgccgacca gatcccgccg tcggcgttca ccgaggacgc cgacatccgg
2820

gtcatcagcg ccacccgcgc ggtcgacgac agctacgcca atggctactc gaacagcaag
2880

tgggccggcg aggtgctgtt gcgcgaggcg catgacctgt gtggcctgcc ggttgcggtg
2940

ttccgctgcg acatgatcct ggccgacacc acatgggcgg gacagctcaa tgtgccggac
3000

atgttcaccc ggatgatcct gagcctggcg gccaccggta tcgcgccggg ttcgttctat
3060

gagcttgcgg ccgacggcgc ccggcaacgc gcccactatg acggtctgcc cgtcgagttc
3120

atcgccgagg cgatttcgac tttgggtgcg cagagccagg atggtttcca cacgtatcac
3180

gtgatgaacc cctacgacga cggcatcgga ctcgacgagt tcgtcgactg gctcaacgag
3240

tccggttgcc ccatccagcg catcgctgac tatggcgact ggctgcagcg cttcgaaacc
3300

gcactgcgcg cactgcccga tcggcagcgg cacagctcac tgctgccgct gttgcacaac
3360

tatcggcagc cggagcggcc cgtccgcggg tcgatcgccc ctaccgatcg cttccgggca
3420

gcggtgcaag aggccaagat cggccccgac aaagacattc cgcacgtcgg cgcgccgatc
3480

atcgtgaagt acgtcagcga cctgcgccta ctcggcctgc tctaa
3525

<210> 10
<211> 1174
<212> PRT
<213> Mycobacterium marinum

<400> 10
Met Ser Pro Ile Thr Arg Glu Glu Arg Leu Glu Arg Arg Ile Gln Asp

```
1               5                   10                  15

Leu Tyr Ala Asn Asp Pro Gln Phe Ala Ala Ala Lys Pro Ala Thr Ala
            20                  25                  30

Ile Thr Ala Ala Ile Glu Arg Pro Gly Leu Pro Leu Pro Gln Ile Ile
        35                  40                  45

Glu Thr Val Met Thr Gly Tyr Ala Asp Arg Pro Ala Leu Ala Gln Arg
    50                  55                  60

Ser Val Glu Phe Val Thr Asp Ala Gly Thr Gly His Thr Thr Leu Arg
65                  70                  75                  80

Leu Leu Pro His Phe Glu Thr Ile Ser Tyr Gly Glu Leu Trp Asp Arg
                85                  90                  95

Ile Ser Ala Leu Ala Asp Val Leu Ser Thr Glu Gln Thr Val Lys Pro
            100                 105                 110

Gly Asp Arg Val Cys Leu Leu Gly Phe Asn Ser Val Asp Tyr Ala Thr
        115                 120                 125

Ile Asp Met Thr Leu Ala Arg Leu Gly Ala Val Ala Val Pro Leu Gln
    130                 135                 140

Thr Ser Ala Ala Ile Thr Gln Leu Gln Pro Ile Val Ala Glu Thr Gln
145                 150                 155                 160

Pro Thr Met Ile Ala Ala Ser Val Asp Ala Leu Ala Asp Ala Thr Glu
                165                 170                 175

Leu Ala Leu Ser Gly Gln Thr Ala Thr Arg Val Leu Val Phe Asp His
            180                 185                 190

His Arg Gln Val Asp Ala His Arg Ala Ala Val Glu Ser Ala Arg Glu
        195                 200                 205

Arg Leu Ala Gly Ser Ala Val Val Glu Thr Leu Ala Glu Ala Ile Ala
    210                 215                 220

Arg Gly Asp Val Pro Arg Gly Ala Ser Ala Gly Ser Ala Pro Gly Thr
225                 230                 235                 240

Asp Val Ser Asp Asp Ser Leu Ala Leu Leu Ile Tyr Thr Ser Gly Ser
                245                 250                 255

Thr Gly Ala Pro Lys Gly Ala Met Tyr Pro Arg Arg Asn Val Ala Thr
            260                 265                 270

Phe Trp Arg Lys Arg Thr Trp Phe Glu Gly Gly Tyr Glu Pro Ser Ile
        275                 280                 285

Thr Leu Asn Phe Met Pro Met Ser His Val Met Gly Arg Gln Ile Leu
    290                 295                 300
```

```
Tyr Gly Thr Leu Cys Asn Gly Gly Thr Ala Tyr Phe Val Ala Lys Ser
305                 310                 315                 320

Asp Leu Ser Thr Leu Phe Glu Asp Leu Ala Leu Val Arg Pro Thr Glu
                325                 330                 335

Leu Thr Phe Val Pro Arg Val Trp Asp Met Val Phe Asp Glu Phe Gln
            340                 345                 350

Ser Glu Val Asp Arg Arg Leu Val Asp Gly Ala Asp Arg Val Ala Leu
        355                 360                 365

Glu Ala Gln Val Lys Ala Glu Ile Arg Asn Asp Val Leu Gly Gly Arg
    370                 375                 380

Tyr Thr Ser Ala Leu Thr Gly Ser Ala Pro Ile Ser Asp Glu Met Lys
385                 390                 395                 400

Ala Trp Val Glu Glu Leu Leu Asp Met His Leu Val Glu Gly Tyr Gly
                405                 410                 415

Ser Thr Glu Ala Gly Met Ile Leu Ile Asp Gly Ala Ile Arg Arg Pro
            420                 425                 430

Ala Val Leu Asp Tyr Lys Leu Val Asp Val Pro Asp Leu Gly Tyr Phe
        435                 440                 445

Leu Thr Asp Arg Pro His Pro Arg Gly Glu Leu Leu Val Lys Thr Asp
    450                 455                 460

Ser Leu Phe Pro Gly Tyr Tyr Gln Arg Ala Glu Val Thr Ala Asp Val
465                 470                 475                 480

Phe Asp Ala Asp Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Asp Ile Met Ala Glu Val
                485                 490                 495

Gly Pro Glu Gln Phe Val Tyr Leu Asp Arg Arg Asn Asn Val Leu Lys
            500                 505                 510

Leu Ser Gln Gly Glu Phe Val Thr Val Ser Lys Leu Glu Ala Val Phe
        515                 520                 525

Gly Asp Ser Pro Leu Val Arg Gln Ile Tyr Ile Tyr Gly Asn Ser Ala
    530                 535                 540

Arg Ala Tyr Leu Leu Ala Val Ile Val Pro Thr Gln Glu Ala Leu Asp
545                 550                 555                 560

Ala Val Pro Val Glu Glu Leu Lys Ala Arg Leu Gly Asp Ser Leu Gln
                565                 570                 575

Glu Val Ala Lys Ala Ala Gly Leu Gln Ser Tyr Glu Ile Pro Arg Asp
            580                 585                 590

Phe Ile Ile Glu Thr Thr Pro Trp Thr Leu Glu Asn Gly Leu Leu Thr
        595                 600                 605
```

```
Gly Ile Arg Lys Leu Ala Arg Pro Gln Leu Lys Lys His Tyr Gly Glu
    610                 615                 620

Leu Leu Glu Gln Ile Tyr Thr Asp Leu Ala His Gly Gln Ala Asp Glu
625                 630                 635                 640

Leu Arg Ser Leu Arg Gln Ser Gly Ala Asp Ala Pro Val Leu Val Thr
                645                 650                 655

Val Cys Arg Ala Ala Ala Ala Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ser Asp Val
            660                 665                 670

Gln Pro Asp Ala His Phe Thr Asp Leu Gly Gly Asp Ser Leu Ser Ala
        675                 680                 685

Leu Ser Phe Thr Asn Leu Leu His Glu Ile Phe Asp Ile Glu Val Pro
    690                 695                 700

Val Gly Val Ile Val Ser Pro Ala Asn Asp Leu Gln Ala Leu Ala Asp
705                 710                 715                 720

Tyr Val Glu Ala Ala Arg Lys Pro Gly Ser Ser Arg Pro Thr Phe Ala
                725                 730                 735

Ser Val His Gly Ala Ser Asn Gly Gln Val Thr Glu Val His Ala Gly
            740                 745                 750

Asp Leu Ser Leu Asp Lys Phe Ile Asp Ala Ala Thr Leu Ala Glu Ala
        755                 760                 765

Pro Arg Leu Pro Ala Ala Asn Thr Gln Val Arg Thr Val Leu Leu Thr
    770                 775                 780

Gly Ala Thr Gly Phe Leu Gly Arg Tyr Leu Ala Leu Glu Trp Leu Glu
785                 790                 795                 800

Arg Met Asp Leu Val Asp Gly Lys Leu Ile Cys Leu Val Arg Ala Lys
                805                 810                 815

Ser Asp Thr Glu Ala Arg Ala Arg Leu Asp Lys Thr Phe Asp Ser Gly
            820                 825                 830

Asp Pro Glu Leu Leu Ala His Tyr Arg Ala Leu Ala Gly Asp His Leu
        835                 840                 845

Glu Val Leu Ala Gly Asp Lys Gly Glu Ala Asp Leu Gly Leu Asp Arg
    850                 855                 860

Gln Thr Trp Gln Arg Leu Ala Asp Thr Val Asp Leu Ile Val Asp Pro
865                 870                 875                 880

Ala Ala Leu Val Asn His Val Leu Pro Tyr Ser Gln Leu Phe Gly Pro
                885                 890                 895

Asn Ala Leu Gly Thr Ala Glu Leu Leu Arg Leu Ala Leu Thr Ser Lys
            900                 905                 910
```

Ile Lys Pro Tyr Ser Tyr Thr Ser Thr Ile Gly Val Ala Asp Gln Ile
915 920 925

Pro Pro Ser Ala Phe Thr Glu Asp Ala Asp Ile Arg Val Ile Ser Ala
930 935 940

Thr Arg Ala Val Asp Asp Ser Tyr Ala Asn Gly Tyr Ser Asn Ser Lys
945 950 955 960

Trp Ala Gly Glu Val Leu Leu Arg Glu Ala His Asp Leu Cys Gly Leu
965 970 975

Pro Val Ala Val Phe Arg Cys Asp Met Ile Leu Ala Asp Thr Thr Trp
980 985 990

Ala Gly Gln Leu Asn Val Pro Asp Met Phe Thr Arg Met Ile Leu Ser
995 1000 1005

Leu Ala Ala Thr Gly Ile Ala Pro Gly Ser Phe Tyr Glu Leu Ala
1010 1015 1020

Ala Asp Gly Ala Arg Gln Arg Ala His Tyr Asp Gly Leu Pro Val
1025 1030 1035

Glu Phe Ile Ala Glu Ala Ile Ser Thr Leu Gly Ala Gln Ser Gln
1040 1045 1050

Asp Gly Phe His Thr Tyr His Val Met Asn Pro Tyr Asp Asp Gly
1055 1060 1065

Ile Gly Leu Asp Glu Phe Val Asp Trp Leu Asn Glu Ser Gly Cys
1070 1075 1080

Pro Ile Gln Arg Ile Ala Asp Tyr Gly Asp Trp Leu Gln Arg Phe
1085 1090 1095

Glu Thr Ala Leu Arg Ala Leu Pro Asp Arg Gln Arg His Ser Ser
1100 1105 1110

Leu Leu Pro Leu Leu His Asn Tyr Arg Gln Pro Glu Arg Pro Val
1115 1120 1125

Arg Gly Ser Ile Ala Pro Thr Asp Arg Phe Arg Ala Ala Val Gln
1130 1135 1140

Glu Ala Lys Ile Gly Pro Asp Lys Asp Ile Pro His Val Gly Ala
1145 1150 1155

Pro Ile Ile Val Lys Tyr Val Ser Asp Leu Arg Leu Leu Gly Leu
1160 1165 1170

Leu

<210> 11
<211> 3525
<212> DNA

<213>

atgagcaccgcaacccatgatgaacgtctggatcgtcgtgttcatgaactgattgcaaccgat
ccgcagtttgcagcagcacagccggatcctgcaattaccgcagcactggaacagcctggtctg
cgtctgccgcagattattcgtaccgttctggatggttatgcagatcgtccggcactgggtcag
cgtgttgttgaatttgttaccgatgcaaaaaccggtcgtaccagcgcacagctgctgcctcgt
tttgaaaccattacctatagcgaagttgcacagcgtgttagcgcactgggtcgtgcactgagt
gatgatgcagttcatccgggtgatcgtgtttgtgttctgggttttaatagcgttgattatgcc
accattgatatggcactgggtgcaattggtgcagttagcgttccgctgcagaccagcgcagca
attagcagcctgcagccgattgttgcagaaaccgaaccgaccctgattgcaagcagcgttaat
cagctgtcagatgcagttcagctgattaccggtgcagaacaggcaccgacccgtctggttgtt
tttgattatcatccgcaggttgatgatcagcgtgaagcagttcaggatgcagcagcacgtctg
agcagcaccggtgttgcagttcagaccctggcagaactgctggaacgtggtaaagatctgcct
gcagttgcagaaccgcctgcagatgaagatagcctggcactgctgatttataccagcggtagc
acaggtgcaccgaaaggtgcaatgtatccgcagagcaatgttggtaaaatgtggcgtcgtggt
agcaaaaattggtttggtgaaagcgcagcaagcattaccctgaatttcatgccgatgagccat
gttatgggtcgtagcattctgtatggcaccctgggtaatggtggcaccgcatattttgcagca
cgtagcgatctgagcaccctgctggaagatctggaactggttcgtccgaccgaactgaatttt
gttccgcgtatttgggaaaccctgtatggtgaatttcagcgtcaggttgaacgtcgtctgagc
gaagctggcgatgccggtgaacgtcgtgcagttgaagcagaagttctggcagaacagcgtcag
tatctgctgggtggtcgttttacctttgcaatgaccggtagcgcaccgattagtccggaactg
cgtaattgggttgaaagcctgctggaaatgcatctgatggatggctatggtagcaccgaagca
ggtatggttctgtttgatggcgaaattcagcgtccgcctgtgattgattataaactggttgat
gttccggatctgggttattttagcaccgatcgtccgcatccgcgtggtgaactgctgctgcgt
accgaaaatatgtttccgggttattataaacgtgcagaaaccaccgcaggcgttttgatgaa
gatggttattatcgtaccggtgatgtgtttgcagaaattgcaccggatcgtctggtttatgtt
gatcgtcgtaataatgttctgaaactggcacagggtgaatttgtgaccctggccaaactggaa
gcagtttttggtaatagtccgctgattcgtcagatttatgtgtatggtaatagcgcacagccg
tatctgctggcagttgttgttccgaccgaagaggcactggcaagcggtgatccggaaaccctg
aaaccgaaaattgcagatagcctgcagcaggttgcaaaagaagcaggtctgcagagctatgaa
gttccgcgtgattttattattgaaaccaccccgtttagcctggaaaatggtctgctgaccggt
attcgtaaactggcatggccgaaactgaaacagcattatggtgaacgcctggaacaaatgtat
gcagatctggcagcaggtcaggcaaatgaactggccgaactgcgtcgtaatggtgcacaggca
ccggttctgcagaccgttagccgtgcagccggtgcaatgctgggtagcgcagccagcgatctg
agtccggatgcacattttaccgatctgggtggtgatagcctgagcgcactgacctttggtaat
ctgctgcgtgaaatttttgatgttgatgtgccggttggtgttattgttagtccggctaatgat
ctggcagccattgcaagctatattgaagcagaacgtcagggtagcaaacgtccgacctttgca
agcgttcatggtcgtgatgcaaccgttgttcgtgcagcagatctgaccctggataaatttctg
gatgcagaaaccctggcagcagcaccgaatctgccgaaaccggcaaccgaagttcgtaccgtg
ctgctgacaggtgcaaccggttttctgggtcgttatctggcactggaatggctggaacgtatg
gatatggttgatggtaaagttattgcactggttcgtgcccgtagtgatgaagaagcacgcgca
cgtctggataaaacctttgatagtggtgatccgaaactgctggcacattatcagcagctggct
gcagatcatctggaagttattgccggtgataaaggtgaagcaaatctgggtctgggtcaggat
gtttggcagcgtctggcagataccgttgatgttattgtggatccggcagcactggttaatcat
gttctgccgtatagcgaactgtttggtccgaatgcactgggcaccgcagaactgattcgtctg
gcactgaccagcaaacagaaaccgtatacctatgttagcaccattggtgttggcgatcagatt
gaaccgggtaaatttgttgaaaatgccgatattcgtcagatgagcgcaacccgtgcaattaat
gatagctatgcaaatggctacggcaatagcaaatgggcaggcgaagttctgctgcgcgaagca
catgatctgtgtggtctgccggttgcagtttttcgttgtgatatgattctggccgataccacc
tatgcaggtcagctgaatctgccggatatgtttacccgtctgatgctgagcctggttgcaacc
ggtattgcaccgggtagcttttatgaactggatgcagatggtaatcgtcagcgtgcacattat
gatggcctgccggttgaatttattgcagcagccattagcaccctgggttcacagattaccgat
agcgataccggttttcagacctatcatgttatgaacccgtatgatgatggtgttggtctggat
gaatatgttgattggctggttgatgccggttatagcattgaacgtattgcagattatagcgaa
tggctgcgtcgctttgaaacctcactgcgtgcactgccggatcgtcagcgccagtatagcctg
ctgccgctgctgcacaattatcgtacaccggaaaaaccgattaatggtagcattgcaccgacc
gatgtttttcgtgcagccgttcaagaagccaaaattggtccggataaagatattccgcatgtt
agccctccggtgattgttaaatatattaccgatctgcagctgctgggtctgctgtaa

<210> 12
<211> 1174
<212> PRT
<213>

MSTATHDERLDRRVHELIATDPQFAAAQPDPAITAALEQPGLRLPQIIRTVLDGYADRPALGQ
RVVEFVTDAKTGRTSAQLLPRFETITYSEVAQRVSALGRALSDDAVHPGDRVCVLGFNSVDYA
TIDMALGAIGAVSVPLQTSAAISSLQPIVAETEPTLIASSVNQLSDAVQLITGAEQAPTRLVV
FDYHPQVDDQREAVQDAAARLSSTGVAVQTLAELLERGKDLPAVAEPPADEDSLALLIYTSGS
TGAPKGAMYPQSNVGKMWRRGSKNWFGESAASITLNFMPMSHVMGRSILYGTLGNGGTAYFAA
RSDLSTLLEDLELVRPTELNFVPRIWETLYGEFQRQVERRLSEAGDAGERRAVEAEVLAEQRQ
YLLGGRFTFAMTGSAPISPELRNWVESLLEMHLMDGYGSTEAGMVLFDGEIQRPPVIDYKLVD
VPDLGYFSTDRPHPRGELLLRTENMFPGYYKRAETTAGVFDEDGYYRTGDVFAEIAPDRLVYV
DRRNNVLKLAQGEFVTLAKLEAVFGNSPLIRQIYVYGNSAQPYLLAVVVPTEEALASGDPETL
KPKIADSLQQVAKEAGLQSYEVPRDFIIETTPFSLENGLLTGIRKLAWPKLKQHYGERLEQMY

ADLAAGQANELAELRRNGAQAPVLQTVSRAAGAMLGSAASDLSPDAHFTDLGGDSLSALTFGN
LLREIFDVDVPVGVIVSPANDLAAIASYIEAERQGSKRPTFASVHGRDATVVRAADLTLDKFL
DAETLAAAPNLPKPATEVRTVLLTGATGFLGRYLALEWLERMDMVDGKVIALVRARSDEEARA
RLDKTFDSGDPKLLAHYQQLAADHLEVIAGDKGEANLGLGQDVWQRLADTVDVIVDPAALVNH
VLPYSELFGPNALGTAELIRLALTSKQKPYTYVSTIGVGDQIEPGKFVENADIRQMSATRAIN
DSYANGYGNSKWAGEVLLREAHDLCGLPVAVFRCDMILADTTYAGQLNLPDMFTRLMLSLVAT
GIAPGSFYELDADGNRQRAHYDGLPVEFIAAAISTLGSQITDSDTGFQTYHVMNPYDDGVGLD
EYVDWLVDAGYSIERIADYSEWLRRFETSLRALPDRQRQYSLLPLLHNYRTPEKPINGSIAPT
DVFRAAVQEAKIGPDKDIPHVSPPVIVKYITDLQLLGLL

BRIGARD & CASTRO
BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros), **GENOMATICA, INC.**

domiciliado(s) en, 10520 Wateridge Circle San Diego, CA 92121, United States of America

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales, lemas comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre, domicilio y/o dirección; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, domiciliado(s) en la Calle 70A No. 4 - 41, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

POWER OF ATTORNEY

I (We), **GENOMATICA, INC.**

domiciled in, 10520 Wateridge Circle San Diego, CA 92121, United States of America

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names, slogans and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name, domicile and/or address related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages: claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoint **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, domiciled in Calle 70A No. 4 - 41, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in San Diego, CA

this 5th day of July 2012

Signature

349

125881

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0077816

Bogotá D.C., Agosto 05 de 2013 - 16:48:39

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	599250551	05/08/2013	37.908.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	7 TTLOS-TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	500.000.00	500.000.00
				$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-258879- -00000-0000
Fecha: 2013-10-31 17:01:49 Dep 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 351

125881 350

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0090694

Bogotá D.C., Septiembre 10 de 2013 - 15:44:41

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	560909145	10/09/2013	40.080.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
20	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	600.000.00
				$600.000.00

SON: **SEISCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-258879- -00000-0000
Fecha: 2013-10-31 17:01:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASE.NACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 351

351

125881

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0086272

Bogotá D.C., Agosto 28 de 2013 - 16:55:19

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	599243536	28/08/2013	38.190.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
16	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	480.000.00
				$480.000.00

SON: **CUATROCIENTOS OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-258879- -00000-0000
Fecha: 2013-10-31 17:01:49 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 351

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

AD

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-258879- -00000-0000
Fecha: 2013-10-31 17:01:49 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 351

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILID

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐