SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-209645- -00000-0000

Fecha: 2014-09-22 16:14:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 14

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-077180- -00008-0000

Fecha: 2014-09-22 16:14:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 14

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTR

SIC

T=F=13.

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** _____

MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE 1,4-BUTANODIOL,

54. **TITULO** 4- HIDROXIBUTANAL, 4- HIDTROXIBUTIRIL-COA, PUTRESCINA Y COMPUESTOS RELACIONADOS CON LOS MISMOS

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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-077180- -00008-0000

Fecha: 2014-09-22 16:14:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 14

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7

No. 14-209645- -00000-0000

Fecha: 2014-09-22 16:14:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 14

vo de radicación

AS. 129.249

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Tramite

☐ **Conversión** ☒ **División** ☐ **Fusión**

☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

GENOMATICA, INC.
Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☒

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
US	10520 Wateridge Circle, CA 92121	San Diego

Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☒ **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico**

3. Datos del apoderado:

CADENA SARMIENTO JUAN PABLO | 80.410.337 | 57492
Apellidos y Nombre | **Documento de identificación** | **Tarjeta profesional**

Dirección y domicilio		Ciudad
Calle 70 A #4–41		Bogotá, D.C.
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**
notificaciones@bc.com.co	742-2200	744-2200

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

4. Datos del trámite

CONVERSIÓN	DIVISIÓN	FUSIÓN
Expediente:	Expediente: 12 077.180	Expediente:
De:	De:	De:
A:	A:	A:

5. Anexos

Comprobante de pago No. 14-10285, 14-24598 Fecha: 19-09-2014

6. Anexos

- [x] Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación.
- [x] Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación.
- [ ] Número de documento que ordena la comisión o fusión o división.
- [ ] Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud.
- [x] Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

7. Firma

Nombre y apellidos	Firma
JUAN PABLO CADENA SARMIENTO C.C 80.410.337	Tarjeta Profesional 57492

129249

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0010285

Bogotá D.C., Enero 29 de 2014 - 16:30:20

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	650529541	29/01/2014	27.663.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	464.000.00	464.000.00
				$464.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SESENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-077180- -00008-0000
Fecha: 2014-09-22 16:14:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 14

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7
No. 14-209645- -00000-0000
Fecha: 2014-09-22 16:14:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 14

129249

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0024598

Bogotá D.C., Marzo 04 de 2014 - 16:43:09

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	610751551	04/03/2014	23.484.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
7	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	217.000.00
				$217.000.00

SON: **DOSCIENTOS DIECISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-********-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-077180- -00008-0000
Fecha: 2014-09-22 16:14:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 14

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7
No. 14-209645- -00000-0000
Fecha: 2014-09-22 16:14:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 14

REIVINDICACIONES DIVISIONAL

1. Un organismo microbiano de ocurrencia no natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta putrescina que comprende por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta putrescina expresada en una cantidad suficiente para producir putrescina, dicha ruta putrescina comprende reductasa succinato; deshidrogenasa 4-aminobutirato o transaminasa 4-aminobutirato; reductasa 4-aminobutirato; y deshidrogenasa putrescina o transaminasa putrescina.

2. El organismo microbiano de ocurrencia no natural de la reivindicación 1, en donde dicho organismo microbiano comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican reductasa succinato; deshidrogenasa 4-aminobutirato o transaminasa 4-aminobutirato; reductasa 4-aminobutirato; y deshidrogenasa putrescina o transaminasa putrescina.

3. El organismo microbiano de ocurrencia no natural de la reivindicación 1, en donde dicho por lo menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

4. Un método para producir putrescina, que comprende cultivar el organismo microbiano de ocurrencia no natural de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 bajo condiciones y durante un periodo suficiente para producir putrescina.

5. El método de la reivindicación 4, en donde dicho organismo microbiano de ocurrencia no natural está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

6. Un organismo microbiano de ocurrencia no natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta putrescina que comprende por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta putrescina expresada en una cantidad suficiente para producir putrescina, dicha ruta putrescina comprende descarboxilasa alfa-cetoglutarato; deshidrogenasa 4-aminobutirato o transaminasa 4-aminobutirato; reductasa 4-aminobutirato; y deshidrogenasa putrescina o transaminasa putrescina.

7. El organismo microbiano de ocurrencia no natural de la reivindicación 6, en donde dicho organismo microbiano comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican descarboxilasa alfa-cetoglutarato; deshidrogenasa 4-aminobutirato o transaminasa 4-aminobutirato; reductasa 4-aminobutirato; y deshidrogenasa putrescina o transaminasa putrescina.

8. El organismo microbiano de ocurrencia no natural de la reivindicación 6, en donde dicho por lo menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

9. Un método para producir putrescina, que comprende cultivar el organismo microbiano de ocurrencia no natural de cualquiera de las reivindicaciones 6-8 bajo condiciones y durante un periodo suficiente para producir putrescina.

10. El método de la reivindicación 9, en donde dicho organismo microbiano de ocurrencia no natural está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

11. Un organismo microbiano de ocurrencia no natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta putrescina que comprende por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta putrescina expresada en una cantidad suficiente para producir putrescina, dicha ruta de putrescina comprende deshidrogenasa glutamato o transaminasa de glutamato; descarboxilasa glutamato; reductasa 4-aminobutirato; y deshidrogenasa putrescina o transaminasa putrescina.

12. El organismo microbiano de ocurrencia no natural de la reivindicación 11, en donde dicho organismo microbiano comprende cuatro ácidos nucleicos exógenos que codifican deshidrogenasa glutamato o transaminasa de glutamato; descarboxilasa de glutamato; reductasa 4-aminobutirato; y deshidrogenasa putrescina o transaminasa putrescina.

13. El organismo microbiano de ocurrencia no natural de la reivindicación 11, en donde dicho por lo menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

14. Un método para producir putrescina, que comprende cultivar el organismo microbiano de ocurrencia no natural de cualquiera de las reivindicaciones 11-13 bajo condiciones y durante un periodo suficiente para producir putrescina.

15. El método de la reivindicación 14, en donde dicho organismo microbiano de ocurrencia no natural está en un medio de cultivo sustancialmente anaeróbico.

16. Un organismo microbiano de ocurrencia no-natural, dicho organismo microbiano de ocurrencia no-natural seleccionado del grupo conformado por

(A) un organismo microbiano que tiene una ruta reductora TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima reductora vía TCA expresada en una cantidad suficiente para convertir CO, CO2 o H2 a acetil-CoA, en donde dicha enzima se selecciona del grupo conformado por una ATP citrato-liasa, una citrato-liasa, una alfa-cetoglutarato: oxidorreductasa ferredoxina y un fumarato reductasa,

en donde dicho organismo microbiano comprende además una vía de 1,4-butanodiol que comprende al menos cinco enzimas seleccionadas de: una 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa; una 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (alcohol de conformación); una 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (aldehído formación); una de 1,4-butanodiol deshidrogenasa; una 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, una 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa o una 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa; una fosfotrans-4-hidroxibutirilasa; una 4-hidroxibutirato quinasa y una 4-hidroxibutirato reductasa;

(B) un organismo microbiano que tiene actividad deshidrogenasa o hidrogenasa de monóxido de carbono y una vía reductora TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima reductora vía TCA expresada en una cantidad suficiente para convertir el CO, CO2 o H2 a acetil-CoA, en donde dicha enzima se selecciona del grupo que consiste de una ATP citrato-liasa, una citrato-liasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una alfa-cetoglutarato: oxidorreductasa ferredoxina, una succinil-CoA transferasa, una de succinil-CoA transferasa, una fumarato reductasa, una fumarasa y una malato deshidrogenasa,

en donde dicho organismo microbiano comprende además una vía de 1,4-butanodiol que comprende: una 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa; una 4-hidroxibutiril-CoA

reductasa (alcohol de conformación); una 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (aldehído formando); una 1, 4-butanodiol deshidrogenasa, y una 4-hidroxibutirato reductasa;

(C) un organismo microbiano que tiene una ruta reductora TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima reductora vía TCA expresada en una cantidad suficiente para convertir el CO, CO2 o H2 a acetil-CoA, en donde dicha enzima se selecciona del grupo conformado por un ATP citrato-liasa, una citrato-liasa, una alfa-cetoglutarato: oxidorreductasa ferredoxina y un fumarato reductasa,

en donde dicho organismo microbiano comprende además una vía de 4-hidroxibutirato, y

en donde dicho organismo microbiano comprende cinco enzimas seleccionadas de: una 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, una 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, una 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa o una 4- hidroxibutiril-CoA sintetasa; una fosfotrans-4-hidroxibutirilasa; y una 4-hidroxibutirato quinasa;

(D) un organismo microbiano que tiene actividad deshidrogenasa o hidrogenasa de monóxido de carbono y una vía reductora TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima reductora vía TCA expresada en una cantidad suficiente para convertir el CO, CO2 o H2 a acetil-CoA, en el que dicha enzima se selecciona del grupo conformado por una ATP citrato-liasa, una citrato-liasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una alfa-cetoglutarato: oxidorreductasa ferredoxina, una succinil-CoA sintetasa, una de succinil-CoA transferasa, una fumarato reductasa, una fumarasa y una malato deshidrogenasa,

en donde dicho organismo microbiano comprende además una vía de 4-hidroxibutirato, que comprende: una 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa; una 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, una 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa o una 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa; una fosfotrans-4-hidroxibutirilasa, y una 4-hidroxibutirato quinasa;

(E) un organismo microbiano que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima que se expresa en una cantidad suficiente para producir la reducción de equivalentes de monóxido de carbono o hidrógeno, fijando de ese modo CO2 a través de un ciclo de TCA reductora, en donde dicho al menos un ácido nucleico

exógeno se selecciona de una deshidrogenasa de monóxido de carbono, una hidrogenasa, una NAD(P)H: ferredoxina oxidorreductasa, y una ferredoxina,

en donde dicho organismo microbiano comprende además una vía de 1,4-butanodiol que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada del grupo conformado por: una succinil-CoA transferasa o una succinil-CoA sintetasa; una succinil-CoA reductasa (aldehído de conformación); una 4-hidroxibutirato deshidrogenasa; una 4-hidroxibutirato quinasa; una fosfotrans-4-hidroxibutirilasa; una 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (aldehído de conformación); una de 1,4-butanodiol deshidrogenasa; una succinato reductasa; una succinil-CoA reductasa (alcohol de conformación) ; una 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, una 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa o una 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa; una -hidroxibutirato reductasa; una 4-hidroxibutiril-fosfato reductasa; y una 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (alcohol de conformación);

(F) un organismo microbiano que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima que se expresa en una cantidad suficiente para producir la reducción de equivalentes de monóxido de carbono o hidrógeno, fijando de ese modo CO2 a través de un ciclo de TCA reductora, en el que dicho al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una deshidrogenasa monóxido de carbono, una hidrogenasa, y un NAD(P)H: ferredoxina oxidorreductasa;

en donde dicho organismo microbiano comprende además una vía de 1,4-butanodiol que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada del grupo conformado por: una succinil-CoA transferasa o una succinil-CoA sintetasa; una succinil-CoA reductasa (aldehído de conformación); una 4 -hidroxibutirato deshidrogenasa; una 4-hidroxibutirato quinasa; una fosfotrans-4-hidroxibutirilasa; una 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (aldehído de conformación); una de 1,4-butanodiol deshidrogenasa; una succinato reductasa; una succinil-CoA reductasa (alcohol de conformación) ; una 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, una 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa o una 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa; una 4-hidroxibutirato reductasa; una 4-hidroxibutiril-fosfato reductasa; y una 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (alcohol de conformación);

(G) un organismo microbiano que tiene una ruta reductora TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima reductora vía TCA; en donde dicho al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato-

liasa, una citrato-liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato: ferredoxina oxidorreductasa, y

al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una deshidrogenasa de monóxido de carbono, una hidrogenasa, una NAD(P)H:ferredoxina oxidorreductasa, y una ferredoxina,

en donde dichas enzimas se expresan en una cantidad suficiente para fijar el carbono de 1) CO, 2) CO_2 y H_2, 3) CO y CO_2, 4) gas de síntesis que comprende CO y H_2, o 5) gas de síntesis que comprende CO, CO_2, H_2 y , a través de dicha vía de TCA reductora,

en donde dicho organismo microbiano comprende además una vía de 1,4-butanodiol, y

en donde dicho organismo microbiano comprende al menos cinco enzimas seleccionadas de: una 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa; una 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (alcohol de conformación); una 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (aldehído formando), una 1,4-butanodiol deshidrogenasa, una 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, una 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa o una 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa; una fosfotrans-4-hidroxibutirilasa; una 4-hidroxibutirato quinasa y una 4-hidroxibutirato reductasa;

(H) un organismo microbiano que tiene una ruta reductora TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima reductora vía TCA expresada en una cantidad suficiente para convertir 1) CO, 2) CO2 y H2, 3) CO y CO2, 4) gas de síntesis que comprende CO y H2, y 5) gas de síntesis que comprende CO, CO2, H2 a acetil-CoA, en el que dicho al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP citrato-liasa, una citrato-liasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una alfa-cetoglutarato: ferredoxina oxidorreductasa, una succinil-CoA sintetasa, una succinil-CoA transferasa, una fumarato reductasa, fumarasa y una malato deshidrogenasa; y

una vía de reducción equivalente de producción que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima reductora equivalente de producción seleccionada de una deshidrogenasa de monóxido de carbono, una hidrogenasa y una NAD(P)H: ferredoxina oxidorreductasa,

en donde dicho organismo microbiano comprende además una vía de 1,4-butanodiol que comprende: una vía de 1,4-butanodiol que comprende: una 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa; una 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (alcohol de conformación); una 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (aldehído de conformación); una de 1,4-butanodiol deshidrogenasa, y una 4-hidroxibutirato reductasa;

(I) un organismo microbiano que tiene una ruta reductora TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima reductora vía TCA; en el que dicho al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP-citrato liasa, una citrato-liasa, una fumarato reductasa, y una alfa-cetoglutarato: ferredoxina oxidorreductasa; y

al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima seleccionada de una deshidrogenasa de monóxido de carbono, una hidrogenasa, una NAD(P)H: ferredoxina oxidorreductasa, y una ferredoxina,

en donde dichas enzimas se expresan en una cantidad suficiente para fijar el carbono de 1) CO, 2) CO2 y H2, 3) CO y CO2, 4) gas de síntesis que comprende CO y H2, o 5) gas de síntesis que comprende CO, CO2, H2 y , a través de dicha vía de TCA reductora,

en donde dicho organismo microbiano comprende además una vía de 4-hidroxibutirato, y

en donde dicho organismo microbiano comprende cinco enzimas seleccionadas de: una 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, una 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, una 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa o una 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa; una fosfotrans-4-hidroxibutirilasa; y una 4-hidroxibutirato quinasa; y

(J) un organismo microbiano que tiene una ruta reductora TCA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima reductora vía TCA expresada en una cantidad suficiente para convertir 1) CO, 2) CO2 y H2, 3) CO y CO2, 4) gas de síntesis que comprende CO y H2, y 5) gas de síntesis que comprende CO, CO2, H2 , a acetil-CoA;

en donde dicho al menos un ácido nucleico exógeno se selecciona de una ATP citrato liasa, una citrato liasa, una aconitasa, una isocitrato deshidrogenasa, una alfa-cetoglutarato: ferredoxina oxidorreductasa, una succinil-CoA sintetasa, una de succinil-CoA transferasa, una fumarato reductasa, una fumarasa y una malato deshidrogenasa;

una vía de reducción equivalente de producción que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima reductora equivalente de producción seleccionada de una deshidrogenasa de monóxido de carbono, una hidrogenasa y una NAD(P)H: ferredoxina oxidorreductasa,

en donde dicho organismo microbiano comprende además una vía de 4-hidroxibutirato, que comprende: una 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa; una 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, una 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa o una 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa; una fosfotrans-4-hidroxibutirilasa, y una 4-hidroxibutirato quinasa.

17. Un método para producir 1,4-butanodiol, que comprende cultivar el organismo microbiano de ocurrencia no natural de la reivindicación 16 bajo condiciones y durante un periodo suficiente para producir 1,4-butanodiol.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: AAAA MM DD	Recorrido:
2020	14 9 22	4

Tipo de Radicación: Entrada: X Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador: Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	12-77180	08	
2	14-209645	0	
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	***Soporte Documental***
7	CD X
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:
El cd anexo contiene: 8 archivos en formato PDF, los cuales son procesados y subidos al sistema

Claudia

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-077180- -00008-0000

Fecha: 2014-09-22 16:14:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 14

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7

No. 14-209645- -00000-0000

Fecha: 2014-09-22 16:14:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 14

14

DE UTILIDAD ☐

- ☐ 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 ☐

Box No. VIII (ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51*bis*.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

in relation to this international application,

GENOMATICA, INC. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

an assignment from:

HASELBECK, Robert to GENOMATICA, INC., dated 22 September 2010 (22.09.2010);
TRAWICK, John D. to GENOMATICA, INC., dated 27 September 2010 (27.09.2010);
NIU, Wei to GENOMATICA, INC., dated September 22, 2010 (22.09.2010); and
BURGARD, Anthony P., to GENOMATICA, INC., dated 22 September 2010 (22.09.2010).

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (ii)".

MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE 1,4-BUTANODIOL, 4-HIDROXIBUTANAL, 4-HIDROXIBUTIRIL-COA, PUTRESCINA Y COMPUESTOS RELACIONADOS CON LOS MISMOS

Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de E.U.A. No. 61/251, 287, presentada el 13 de octubre 2009, todo el contenido de las cuales se incorporan en la presente por referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere en general en el diseño de computadora de los organismos y de ingeniería de organismos, más particularmente para los organismos que tienen 1,4-butanodiol, 4 -hidroxibutiril-CoA, la capacidad de biosíntesis de 4-hidroxibutanal o putrescina.

El compuesto ácido 4-hidroxibutanoico (4-hidroxibutanoato, 4-hidroxibutirato, 4-HB) es un ácido 4-carboxílico de carbono que tiene un potencial industrial como un bloque de construcción para varios productos químicos como materias primas y de especialidad. En particular, 4-HB tiene el potencial para servir como un nuevo punto de entrada en la familia de 1,4-butanodiol de productos químicos, que incluyen disolventes, resinas, precursores de polímeros y productos químicos de especialidad. 1,4-butanodiol (BDO) es un polímero intermedio y disolvente industrial con un mercado mundial de

aproximadamente 3 mil millones libras/año. Los BDO se producen actualmente a partir de precursores petroquímicos, principalmente acetileno, anhídrido maleico y óxido de propileno.

Por ejemplo, el acetileno se hace reaccionar con 2 moléculas de formaldehído en la reacción de síntesis de Reppe (Kroschwitz y Grant, Enciclopedia de Chem. Tech., John Wiley and Sons, Inc., Nueva York (1999)), seguido por hidrogenación catalítica para formar 1,4-butanodiol. Se ha estimado que el 90% del acetileno producido en los E.U.A. se consume para la producción de butanodiol. Alternativamente, puede estar formado por esterificación y la hidrogenación catalítica de anhídrido maleico, que se deriva de butano. Corriente abajo, el butanodiol puede transformarse adicionalmente, por ejemplo, por oxidación de γ-butirolactona, que puede convertirse después en pirrolidona y N-metil-pirrolidona, o hidrogenolisis a tetrahidrofurano. Estos compuestos han variado usos como productos intermedios de polímero, disolventes y aditivos, y tienen un mercado combinado de casi 2 mil millones libras/año.

Es conveniente desarrollar un método para la producción de estos productos químicos por medios alternativos que no sólo sustituyen productos renovables para derivados del petróleo como materia prima sino también usan procesos de uso intensivo con menos energía y dinero. El

Departamento de Energía ha propuesto 1,4-diácidos, y en particular, el ácido succínico, como productos intermedios clave producidos biológicamente para la fabricación de la familia de productos de butanodiol (Informe DOE, "Químicos y Biomasa con Valor Agregado Superior", 2004). Sin embargo, el ácido succínico es costoso de aislar y purificar y requiere altas temperaturas y presiones para la reducción catalítica a butanodiol.

Por lo tanto, existe una necesidad de medios alternativos para producir eficazmente cantidades comerciales de 1,4-butanodiol y sus precursores químicos. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona ventajas relacionadas.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona organismos microbianos de origen no natural que contienen un 1,4-butanodiol (BDO), 4-hidroxibutanal (4-HBal), 4-hidroxibutiril CoA-(4-HBCoA) y/o ruta de putrescina que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un BDO, 4-HBal y/o una enzima de ruta de putrescina expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, 4-HBal, 4-HBCoA y/o putrescina. Los organismos microbianos pueden optimizarse para la expresión de BDO, 4-HBal, 4-HBCoA y/o putrescina. La invención proporciona adicionalmente métodos para usar dichos organismos

microbianos para producir BDO, 4-HBal, 4-HBCoA y/o putrescina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra las rutas bioquímicas para 4-hidroxibutirato (4-HB) y para producción de 1,4-butanodiol. Los primeros 5 pasos son endógenos para la E. coli, mientras que el resto puede ser expresado de forma heteróloga. Las enzimas que catalizan las reacciones biosintéticas son: (1) succinil-CoA sintetasa, (2) deshidrogenasa de semialdehído succínico independiente de CoA, (3) α-cetoglutarato deshidrogenasa, (4) transaminasa semialdehído de glutamato:succinato; (5) glutamato descarboxilasa, (6) deshidrogenasa de semialdehído succínico dependiente de CoA; (7) 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa; (8) α-cetoglutarato descarboxilasa; (9) 4-hidroxibutiril CoA: acetil-CoA transferasa; (10) butirato cinasa; (11) fosfotransbutirilasa; (12) aldehído-deshidrogenasa; (13) alcohol deshidrogenasa.

La Figura 2 es un diagrama esquemático que muestra la biosíntesis de homoserina en E. coli.

La Figura 3 muestra la producción de 4-HB en medio de glucosa mínima utilizando cepas de E. coli que alojan plásmidos que expresan diferentes combinaciones de genes de la ruta de 4-HB, (a) la concentración de 4-HB en caldo de

cultivo; (b) concentración de succinato en caldo de cultivo; (c) el cultivo de OD, medido a 600 nm. Los grupos de barras representan los puntos de tiempo 24 horas, 48 horas y 72 horas (si se mide). Los códigos a lo largo del eje x indican la combinación de cepas/plásmido utilizadas. El primer índice se refiere a la cepa huésped: 1, MG1655 $lacI^Q$; 2, MG1655 ΔgabD $lacI^Q$; 3, MG1655 ΔgabD ΔaldA $lacI^Q$. El segundo índice se refiere a la combinación de plásmido utilizado: 1, pZE13 - 0.004-0035 y pZA33-0036; 2, pZE13-0004-0035 y pZA33-0010n; 3, pZEl3-0004-0008 y pZA33-0036; 4, pZE13-0004-0008 y pZA33 0010n; 5, Control de vectores pZE13 y pZA33.

La Figura 4 muestra la producción de 4-HB de la glucosa en cepas de E. coli que expresan α-cetoglutarato descarboxilasa de Mycobacterium tuberculosis. Las cepas 1-3 contienen pZE13-0032 y el pZA33-0036. La cepa 4 expresa únicamente los vectores vacíos pZE13 y pZA33. Las cepas huésped son las siguientes: 1 y 4, MG1655 $lacI^Q$; 2, MG1655 ΔgabD $lacI^Q$; 3, MG1655 ΔgabD ΔaldA $lacI^Q$. Las barras se refieren a la concentración a las 24 y 48 horas.

La Figura 5 muestra la producción de BDO de 10 mM de 4-HB en cepas recombinantes de E. coli. Las posiciones numeradas corresponden a experimentos con MG1655 $lacI^Q$ que contiene pZA33-0024, expresando cat2 de P. gingivalis y los siguientes genes expresados en pZE13: 1, ninguno (de control), 2, 0002; 3, 0003; 4, 0003n; 5, 0011; 6, 0013; 7,

0023; 8, 0025, 9; 0008n; 10, 0035. El número de genes se definen en la Tabla 6. Para cada posición, las barras se refieren a condiciones aerobias, microaeróbicas, y anaerobias, respectivamente. Las condiciones microaeróbicas fueron creadas mediante el sellado de los tubos de cultivo, pero no evacuándolos.

La Figura 6 muestra el espectro de masas de 4-HB y BDO producidos por MG1655 $lacI^{Q}$ pZE13-0004-0035-0002-pZA33 0034-0036 desarrollados en medio mínimo M9 suplementado con 4 g/L glucosa no marcado (A, C, E y G) ^{13}C-glucosa uniformemente marcado (b, d, f, y h). (a) y (b), fragmento característico 116 de masa de BDO derivatizado, que contiene 2 átomos de carbono; (c) y (d), fragmento característico 177 de masa, de BDO derivatizado, que contiene 1 átomo de carbono; (e) y (f), fragmento característico 117 de masa de 4-HB derivatizado, que contiene 2 átomos de carbono; (g) y (h) fragmento característico 233 de masa, de 4-HB derivatizado, que contiene 4 átomos de carbono.

La Figura 7 es un diagrama de proceso de flujo esquemático de bioprocesos para la producción de γ-butirolactona. El panel (a) ilustra fermentación para alimentación de lotes con separación por lotes y el panel (b) ilustra fermentación de alimentación por lotes con separación continua.

Las Figuras 8A y 8B muestran rutas de 1,4-butanodiol (BDO) ilustrativas. La Figura 8A muestra las rutas de BDO de succinil-CoA. La Figura 8B muestra las rutas de BDO de alfa-cetoglutarato.

Las Figuras 9A-9C muestran rutas de BDO ilustrativas. Las Figuras 9A y 9B muestran rutas de 4-aminobutirato. La Figura 9C muestra un camino de acetoacetil-CoA a 4-aminobutirato.

La Figura 10 muestra rutas ilustrativas de BDO de alfa-cetoglutarato.

La Figura 11 muestra rutas ilustrativas de BDO de glutamato.

La Figura 12 muestra rutas ilustrativas de BDO acetoacetil-CoA.

La Figura 13 muestra rutas ilustrativas de BDO de homoserina.

Las Figuras 14 muestran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de E. coli succinil-CoA sintetasa. La Figura 14A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID NO :) del operón E. coli sucCD. Las Figuras 14B (SEC ID NO :) y 14C (SEC ID NO :) muestran las secuencias de aminoácidos de las subunidades sintetasa CoA succinilo codificadas por el operón sucCD.

La Figura 15 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de Mycobacterium bovis alfa-cetoglutarato

descarboxilasa. La Figura 15A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID NO :) de Mycobacterium bovis sucA gen. La Figura 15B muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID NO :) de M. bovis alfa-cetoglutarato descarboxilasa.

La Figura 16 muestra la biosíntesis en E. coli de 4-hidroxibutirato de glucosa en medio mínimo a través de alfa-cetoglutarato bajo condiciones anaerobias (microaerofílica). La cepa huésped es ECKh-401. Los experimentos han sido etiquetados basado en los genes de la trayectoria corriente arriba presentes en el plásmido pZA33 como sigue: 1) 4hbd-sucA; 2) sucCD-sucD-4hbd; 3) sucCD-sucD-4hbd-sucA.

La Figura 17 muestra la biosíntesis en E. coli de 4-hidroxibutirato de glucosa en medio mínimo a través de succinato y alfa-cetoglutarato. La cepa huésped es de tipo silvestre MG1655. Los experimentos están etiquetados sobre la base de los genes presentes en los plásmidos pZE13 y pZA33 de la siguiente manera: 1) control de vectores vacíos 2) pZE13 vacío, pZA33-4hbd, 3) pZE13-sucA, pZA33-4hbd.

La Figura 18A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID NO :) de succinato semialdehído deshidrogenasa CoA-dependiente (sucD) de Porphyromonas gingivalis, y la Figura 18B muestra la secuencia de aminoácidos codificada (SEC ID NO :).

La Figura 19A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID NO :) de 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (4hbd) desde Porphymonas gingivalis, y la Figura 19B muestra la secuencia codificada de aminoácidos (SEC ID NO :).

La Figura 20A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID NO :) de 4-hidroxibutirato CoA transferasa (CAT2) de Porphyromonas gingivalis, y la Figura 20B muestra la secuencia de aminoácidos codificada (SEC ID NO :).

La Figura 21A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID NO :) de fosfotransbutirilasa iptb) a partir de Clostridium acetobutylicum, y la Figura 21B muestra la secuencia de aminoácidos codificada (SEC ID NO :).

La Figura 22A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID NO :) de butirato cinasa (bukl) a partir de Clostridium acetobutylicum, y la Figura 22B muestra la secuencia de aminoácidos codificada (SEC ID NO :).

La Figura 23 muestra secuencias de nucleótidos alternativas para C. acetobutylicum 020 (Fosfotransbutirilasa) con codones alterados para codones más prevalescientess de E. coli en relación con la secuencia C acetobutylicum nativo. Figuras 23A-23D (020A-020D, SEC ID No.:, respectivamente) contienen secuencias con un número creciente de raras codones de E. coli reemplazados por los codones más frecuentes (A <B <C <D).

La Figura 24 muestra secuencias de nucleótidos alternativas para C. acetobuytlicum 021 (butirato cinasa) con codones alterados para codones más prevalescientes E. coli relativos a la secuencia C. acetobutylicum nativo. Las Figuras 24A-24D (021A-021B, SEC ID Nos.:, respectivamente) contienen secuencias con un número creciente de codones raros de E. coli reemplazados por los codones más frecuentes (A <B <C <D).

La Figura 25 muestra la expresión mejorada de butirato cinasa (BK) y fosfotransbutirilasa (PTB) con codones optimizados para la expresión en E. coli. La Figura 25A muestra electroforesis en gel de dodecilsulfato de poliacrilamida de sodio (SDS-PAGE) teñida para las proteínas con azul de Coomassie; línea 1, el vector de control sin inserto; línea 2, la expresión de secuencias C. acetobutylicum nativas en E. coli; línea 3, la expresión de codón optimizado PTB-BK 020B-021B, línea 4, la expresión de codón optimizado PTB-BK 020C-021C. Se muestran las posiciones de BK y PTB. La Figura 25B muestra los BK y el PTB actividades de la secuencia nativa de C. acetobutylicum (2021n) en comparación con el codón optimizado 020B-021B (2021B) y 020C-021C (2021C).

La Figura 26 muestra la producción de BDO y de gamma-butirilactona (GBL) en varias cepas que expresan las enzimas productoras de BDO: CAT2 (034); 2021n, 2021B, 2021C.

La Figura 27A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID NO :) del gen nativo ayuda Clostridium biejerinckii (025n), y 27B Figura muestra la secuencia de aminoácidos codificada (SEC ID NO :).

Las Figuras 28A-28D muestran las secuencias de genes alternativos para el gen de la ayuda Clostridium beijerinckii (025A-025D, SEC ID No.:, respectivamente), en la que un creciente número de codones raros se sustituyen por los codones más frecuentes (A <B <C <D).

La Figura 29 muestra la expresión del gen de ayuda nativo de C. beijerinckii y las variantes de codones optimizados, sin complementos (control sin inserto), 025n, 025A, 025B, 025C, 025D.

La Figura 30 muestra BDO o BDO y la producción de etanol en diversas cepas. La Figura 30 muestra la producción de BDO en cepas que contienen el gen nativo C ayuda beijerinckii (025n) o variantes con codones optimizados para la expresión en E. coli (025A-025D). La Figura 30B muestra la producción de etanol y BDO en las cepas que expresan el C. acetobutylicum AdhE2 enzima (002C) en comparación con las variantes 025B codones optimizados. El tercer grupo muestra la expresión de P. gingivalis sucD (035). En todos los casos, P. gingivalis cat2 (034) también se expresa.

La Figura 31A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID NO :) del gen adhl de Geobacillus

thermoglucosidasius, y la Figura 31B muestra la secuencia de aminoácidos codificada (SEC ID NO :).

La Figura 32A muestra la expresión del gen adhl de Geobacillus thermoglucosidasius en E. coli. Cualquiera de lisados de células enteras o sobrenadantes fueron analizadas por SDS-PAGE y teñidos con Azul de Coomassie para el plásmido sin inserto, plásmido con 083 (N-bencil-3-pirrolidinol deshidrogenasa de Geotrichum capitatum) y el plásmido insertos con 084 (adhl de Geobacillus thermoglucosidasius). La Figura 32B muestra la actividad de 084 con butiraldehído (diamantes) o 4-hidroxibutiraldehído (cuadrados) como sustratos.

La Figura 33 muestra la producción de BDO en varias cepas: plásmido sin inserto, 025B, 025B-026n, 025B-026A, 025B, 026B, 025B, 026C, 025B-050, 025B-052, 025B-053, 025B-055; 025B-057, 025B-058, 025B-071, 025B-083, 025B-084; PTSlacO-025B; PTSlacO-025B-026n.

La Figura 34 muestra un mapa plasmídico para el vector de PRE118-V2.

La Figura 35 muestra la secuencia de la región ECKh-138 que abarca ACEF y los genes ipdA. El gen K. pneumonia lpdA está subrayado, y el codón cambió en la mutante Glu354Lys sombreada.

La Figura 36 muestra la comparación de secuencias de proteínas de la ipdA de E. coli nativa y ipdA mutante de K. neumonía.

La Figura 37 muestra la producción de 4-hidroxibutirato (barras de la izquierda) y BDO (barras de la derecha) en las cepas AB3, MG1655 y AldhA ECKh 138. Todas las cepas de E. coli expresan sucCD, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis en el medio de copias del plásmido pZA33, y cat2 de P. gingivalis, AdhE2 de C. acetobutylicum en la copia de alta del plásmido pZE13.

La Figura 38 muestra la secuencia de nucleótidos del extremo 5' del gen ACEE fusionado al promotor pflB-P6 y el sitio de unión al ribosoma (RBS). La secuencia 5' en cursiva muestra el comienzo del gen Arop, que se transcribe en la dirección opuesta desde el operón PDH. La secuencia en cursiva 3' muestra el comienzo del gen ACEE. En mayúsculas: pflB RBS. Subrayado: sitio FNR vinculante. En negrita: pflB-P6 secuencia promotora.

La Figura 39 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID NO :) en la región ACEF-LPDA en la cepa ECKh-456.

La Figura 40 muestra la producción de 4-hidroxibutirato, BDO y piruvato (de izquierda a derecha bares, respectivamente) para cada una de las cepas ECKh-439, ECKh-455 y 456-ECKh.

Figura 41A muestra una vista esquemática de los sitios de recombinación para la supresión del gen MDH. La Figura 41B muestra la secuencia del producto de PCR de la amplificación de gen de resistencia a cloranfenicol (CAT) flanqueado por sitios FRT y regiones de homología del gen de la MDH PKD3 plásmido.

La Figura 42 muestra la secuencia del arco Una región eliminada en la cepa ECKh-401.

La Figura 43 muestra la secuencia de la región que comprende un gen mutado de la cepa gltA ECKh-422.

La Figura 44 muestra la actividad de la citrato sintasa del producto del gen de tipo silvestre y el mutante gltA R163L. El ensayo se realizó en ausencia (diamantes) o presencia de 0,4 mM de NADH (cuadrados).

La Figura 45 muestra el 4-hidroxibutirato (barras de la izquierda) y BDO (barras de la derecha) la producción en las cepas ECKh-401 y ECKh-422, los dos genes que expresan para la completa ruta de BDO en los plásmidos.

La Figura 46 muestra los flujos metabólicos y centrales asociados del 95% intervalos de confianza de los experimentos de etiquetado metabólicos. Los valores son los flujos molares normalizados a un régimen de captación de glucosa de 1 mmol/h. El resultado indica que el flujo de carbono se encamina a través de la citrato sintasa en la

dirección oxidativa y que la mayor parte del carbono entra en la ruta de BDO en lugar de completar el ciclo de Krebs.

La Figura 47 muestra la formación del producto extracelular de las cepas ECKh-138 y 422-ECKh, que ambas expresan toda la ruta de BDO en los plásmidos. Los productos medidos fueron acetato (As), piruvato (Pyr), 4-hidroxibutirato (4HB), 1,4-butanodiol (BDO), etanol (EtOH) y otros productos, que incluyen gamma-butirolactona (GBL), succinato y lactato.

La Figura 48 muestra la secuencia de la región a raíz de la sustitución de la PEP carboxilasa (PPC) por fosfoenolpiruvato carboxicinasa de H. influenzae (PEPCK). La región de codificación de PEPCK está subrayada.

La Figura 49 muestra el crecimiento de las cepas de PEPCK evolucionado cultivadas en medio mínimo conteniendo 50 mM $NaHCO_3$.

La Figura 50 muestra la formación de producto en la cepa ECKh-453 expresando CAT2 de P. gingivalis y Ald de C. beijerinckii en los plásmido pZS * 13. Los productos medidos fueron 1,4-butanodiol (BDO), piruvato, 4-hidroxibutirato (4HB), acetato, γ-butirolactona (GBL) y etanol.

La Figura 51 muestra la producción de BDO de dos cepas, ECKh-453 y el 432-ECKh. Ambos contienen los plásmidos pZS* 13 que expresan CAT2 de P. gingivalis y Ald de C. beijerinckii. Los cultivos se cultivaron bajo condiciones

microaerobias, con los recipientes picados con agujas de calibre 27 o 18, como se indica.

La Figura 52 muestra la secuencia de nucleótidos del ADN genómico de la cepa ECKh-426 en la región de inserción de un fragmento de ADN policistrónico que contiene un promotor, gen sucCD, gen sucD, gen 4hbd y una secuencia de terminación.

La Figura 53 muestra la secuencia de nucleótidos de la región cromosómica de la cepa ECKh-432 en la región de inserción de una secuencia policistrónico que contiene un promotor, gen sucA, gen 4hbd de C. kluyveri y una secuencia de terminación.

La Figura 54 muestra la síntesis de BDO a partir de glucosa en medio mínimo en la cepa ECKh-432 que tiene codificación de BDO corriente arriba de los genes de la ruta integrada en el cromosoma y que contiene un plásmido que aloja intermedios genes de la ruta de BDO.

La Figura 55 muestra un producto de PCR que contiene los genes que no son de fosfotransferasa (ni STP) de utilización de sacarosa flanqueadas por regiones de homología con la región rrnC.

La Figura 56 muestra un diagrama esquemático del sitio de integraciones en el operón rrnC.

La Figura 57 muestra la concentración de producto promedio, normalizada a el cultivo DO600, después de 48 horas

de crecimiento de la cepa ECKh-432 desarrollado en glucosa y la tensión ECKh-463 desarrollado en sacarosa. Ambos contienen los plásmidos pZS * 13 que expresan CAT2 de P. gingivalis y Ald de C. beijerinckii. Los datos son para 6 cultivos replicados de cada cepa. Los productos medidos fueron 1,4-butanodiol (BDO), 4-hidroxibutirato (4HB), γ-butirolactona (GBL), piruvato (Pyr) y acetato (ACE) (izquierda a derecha bares, respectivamente).

La Figura 58 muestra las rutas ilustrativas para 1,4-butanodiol de succcinyl-CoA y alfa-cetoglutarato. Abreviaturas: A) succinil-CoA reductasa (aldehído de conformación), b) alfa-cetoglutarato descarboxilasa, C) 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, D) 4-hidroxibutirato reductasa, E) 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

La Figura 59A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID NO :) de reductasa ácido carboxílico de Nocardia iowensis (GNM_720), y 59B Figura muestra la secuencia de aminoácidos codificada (SEC ID NO :).

La Figura 60A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID NO :) de fosfopanteteina transferasa, que fue codón optimizado, y la Figura 60B muestra la secuencia de aminoácidos codificada.

La Figura 61 muestra un mapa plasmídico del plásmido pZS *-13S-720 721opt.

Las Figuras 62A y 62B muestran las rutas a 1,4-butanodiol del succinato, succcinyl-CoA y alfa-cetoglutarato. Abreviaturas: A) succinil-CoA reductasa (aldehído formando), b) alfa-cetoglutarato descarboxilasa, C) 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, D) 4-hidroxibutirato reductasa, E) 1,4-butanodiol deshidrogenasa, F) succinato reductasa, G) succinil-CoA transferasa, H) succinil-CoA-hidrolasa, I) succinil-CoA sintetasa (o succinil-CoA ligasa), J) Glutamato deshidrogenasa, K) de las glutamato transaminasas, L) glutamato descarboxilasa, H) 4-aminobutirato deshidrogenasa, N) 4-aminobutirato transaminasa, S) 4-hidroxibutirato cinasa, P) fosfotrans-4-hidroxibutirilasa, Q) 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (aldehído formando), R) 4-hidroxibutiril-fosfato reductasa, S) succinil-CoA reductasa (alcohol de formación), T) 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, U) 4-hidroxibutiril-CoA-hidrolasa, V) 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa (o 4-hidroxibutiril-CoA ligasa), W) 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (alcohol de formación), X) alfa-cetoglutarato reductasa, Y) 5-hidroxi-2-oxopentanoato deshidrogenasa, Z) 5-hidroxi-2-oxopentanoato descarboxilasa, AA) 5-hidroxi-2-oxopentanoato deshidrogenasa (descarboxilación).

La Figura 63 muestra las rutas para putrescina de succinato, succcinyl-CoA y alfa-cetoglutarato. Abreviaturas: A) succinil-CoA reductasa (aldehído formando), b) alfa-cetoglutarato descarboxilasa, C) 4-aminobutirato reductasa,

D) putrescina deshidrogenasa, E) putrescina transaminasa, F) Succinato reductasa, G) succinil-CoA transferasa, H) succinil-CoA hidrolasa, I) succinil-CoA sintetasa (o succinil-CoA ligasa), J) glutamato deshidrogenasa, K) transaminasa glutamato, L) glutamato descarboxilasa, H) 4-aminobutirato deshidrogenasa, N) 4-aminobutirato transaminasa, S) alfa-cetoglutarato reductasa, P) 5-amino-2-oxopentanoato deshidrogenasa, Q) 5-amino- 2-oxopentanoato transaminasa, R) 5-amino-2-oxopentanoato descarboxilasa, S) ornitina deshidrogenasa, T) ornitina transaminasa, U) ornitina descarboxilasa.

La Figura 64A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID NO :) de reductasa ácido carboxílico de Mycobacterium smegmatis mc (2) 155 (designado 890) y muestra la Figura 64B la secuencia de aminoácidos codificada (SEC ID NO :).

La Figura 65A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID NO :) de reductasa ácido carboxílico de Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis K-10 (designado 891), y muestra la Figura 65B la secuencia de aminoácidos codificada (SEC ID NO :).

La Figura 66A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID NO :) de ácido carboxílico reductasa de Mycobacterium marinum M (designado 892), y la Figura 66B muestra la secuencia de aminoácidos codificada (SEC ID NO :).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al diseño y la producción de células y organismos que tienen capacidades de producción para la biosíntesis de ácido 4-hidroxibutanoico (4-HB), γ-butirolactona, 1,4-butanodiol (BDO), 4-hidroxibutanal (4-HBal), 4-hidroxibutiril-CoA (4-HBCoA) y/o putrescina. La invención, en particular, se refiere al diseño de los organismos microbianos capaces de producir BDO, 4-HBal, 4-HBCoA y/o putrescina por la introducción de uno o más ácidos nucleicos que codifican una enzima de la ruta de BDO, 4-HBal, 4-HBCoA y/o putrescina.

En una modalidad, la invención utiliza en modelos estequiométricos de computadora del metabolismo de Escherichia coli que identifican diseños metabólicas para la producción biosintética de 4-hidroxibutanoico (4-HB), 1,4-butanodiol (BDO), 4-HBal, 4-HBCoA y/o putrescina. Los resultados descritos en este documento indican que las rutas metabólicas pueden ser diseñadas y recombinantemente diseñadas para lograr la biosíntesis de 4-HBal, 4 HBCoA-o 4-HB y de los productos intermedios tales como 1,4 -butanodiol o putrescina en Escherichia coli y otras células u organismos. La producción biosintética de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO y/o putrescina, por ejemplo, para el diseño en computadora puede ser confirmado por la construcción de cepas que tienen el genotipo metabólico diseñado. Estas células

tratadas metabólicamente u organismos también pueden ser sometidos a la evolución de adaptación para aumentar aún más la biosíntesis de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO y/o putrescina, incluso bajo condiciones cercanas crecimiento máximo teórico.

En ciertas modalidades, la biosíntesis característica de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO y/o putrescina de las cepas diseñadas las vuelven genéticamente estables y útiles especialmente en bioprocesos continuos. Las estrategias de tensión del diseño separadas se identificaron con la incorporación de diferentes capacidades de reacción no-nativss o heterólogad en E. coli u otros organismos huésped que llevan a productores de 4-MP y 1,4-butanodiol de las rutas metabólicas de cualquiera de semialdehído succínico CoA-independiente deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa y semialdehído succínico CoA-dependiente deshidrogenasa, o glutamato: semialdehído succínico transaminasa. En los diseños metabólicos por computadora se identificó que dio como resultado la biosíntesis de 4-HB en tanto E. coli y especies de levaduras de cada una de estas rutas metabólicas. El compuesto intermedio 1,4-butanodiol γ-butirolactona se puede generar en cultivo por ciclación espontánea bajo condiciones a pH <7.5, particularmente bajo condiciones ácidas, tales como por debajo de pH 5.5, por ejemplo, el pH <7, pH <6.5, pH <6, y particularmente a pH <5.5 o inferior.

Las cepas identificadas a través del componente computacional de la plataforma puede ser puesto en producción real por ingeniería genética de cualquiera de las alteraciones metabólicas predichas que conducen a la producción biosintética de 4-HB, productos intermedios y/o 1,4-butanodiol corriente abajo o de otro tipo. En todavía una modalidad adicional, las cepas que exhiben la producción biosintética de estos compuestos puede ser sometida adicionalmente a la evolución de adaptación para aumentar aún más la biosíntesis de producto. Los niveles de la biosíntesis de producto de rendimiento de evolución adaptativa siguiente también se puede predecir por el componente computacional del sistema.

En otras modalidades específicas, los organismos microbianos fueron construidos para expresar una ruta biosintética 4-HB que codifica los pasos enzimáticos de succinato a 4-HB y 4-HB-CoA. La co-expresión de succinato coenzima A transferasa, semialdehído succínico CoA-dependiente deshidrogenasa, 4-hidroxibutirato NAD-dependiente deshidrogenasa y coenzima 4-hidroxibutirato A transferasa en un organismo huésped microbiano dio como resultado una producción significativa de comparación de 4-HB para alojar los organismos microbianos que carecen de un 4-HB biosintético. En una modalidad específica adicional, se generaron organismos microbianos que producen 4-HB que

utilizan α-cetoglutarato como un sustrato mediante la introducción de ácidos nucleicos que codifican una cetoglutarato descarboxilasa y 4-hidroxibutirato NAD-dependiente deshidrogenasa.

En otra modalidad específica, los organismos microbianos que contienen una ruta biosintética 1,4-butanodiol (BDO) se construyeron de BDO biosintetizados cuando se cultivaron en presencia de 4-HB. La ruta biosintética de BDO consistió en un ácido nucleico que codifica ya sea un aldehído/alcohol deshidrogenasa multifuncional o bien ácidos nucleicos que codifican una aldehído deshidrogenasa y un alcohol deshidrogenasa. Para apoyar el crecimiento en sustratos 4-HB, estos organismos microbianos productores de BDO también expresan 4-hidroxibutirato-CoA cinasa o 4-butirato transferasa en relación con la fosfotranshidroxibutirilasa. En todavía una modalidad específica adicional, los organismos microbianos que se generaron sintetizando BDO a través de la expresión exógena de ácidos nucleicos que codifican una ruta biosintética funcional de 4-HB y una ruta biosintética funcional de BDO. La ruta biosintética de 4-HB consta de succinato coenzima A transferasa, semialdehído succínico CoA-dependiente deshidrogenasa, 4-hidroxibutirato NAD-dependiente deshidrogenasa y coenzima 4-hidroxibutirato A transferasa. La ruta de BDO consistió en una aldehído/alcohol

deshidrogenasa multifuncional. Además se describen en este documento rutas adicionales para la producción de BDO (véanse las Figuras 8-13).

En una modalidad adicional, se describe en la presente es la clonación y expresión de una enzima ácido carboxílico reductasa que funciona en un 4-hidroxibutanal, 4-hidroxibutiril-CoA o 1,4-butanodiol ruta metabólica. Las ventajas de emplear una ácido carboxílico reductasa en lugar de una acil-CoA reductasa para formar 4-hidroxibutiraldehído (4-hidroxibutanal) incluyen etanol y menor formación de subproductos GBL que acompañan la producción de BDO. También se describe en este documento la aplicación de ácido carboxílico reductasa como parte de numerosas rutas adicionales para producir 1,4-butanodiol y putrescina a partir de metabolitos del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), por ejemplo, succinato, succinil-CoA, y/o alfa-cetoglutarato.

Tal como se usa en la presente, el término "no natural" cuando se utiliza en referencia a un organismo microbiano o microorganismo de la invención significa que el organismo microbiano tiene al menos una alteración genética que no se encuentra normalmente en una cepa de origen natural de la referencia de especies, incluyendo cepas de tipo silvestre de la especie de referencia. Las alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, la introducción de

modificaciones expresables de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos metabólicos, otras adiciones de ácidos nucleicos, supresiones de ácidos nucleicos y/o interrupción otras funciones del material genético del organismo microbiano. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, las regiones codificantes y fragmentos funcionales de los mismos, para polipéptidos heterólogos, homólogos o tanto heterólogos como homólogos para las especies de referencia. Las modificaciones adicionales incluyen, por ejemplo, regiones reguladoras no codificantes en el que las modificaciones alteran la expresión de un gen u operón. Los ejemplos de polipéptidos metabólicos incluyen enzimas o proteínas dentro de una ruta biosintética de una familia de compuestos 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina.

Una modificación metabólica se refiere a una reacción bioquímica que se altera desde su estado natural. Por lo tanto, los microorganismos de origen no natural puede tener modificaciones genéticas a ácidos nucleicos que codifican polipéptidos, fragmentos metabólicos o funcionales de los mismos. Los ejemplos de modificaciones metabólicas se describen en este documento.

Tal como se usa en la presente, el término "aislado" cuando se utiliza en referencia a un organismo microbiano significa un organismo que está sustancialmente libre de al menos un componente dado que el organismo

microbiano al que se hace referencia se encuentra en la naturaleza. El término incluye un organismo microbiano que se retira de algunos o todos los componentes tal como se encuentra en su entorno natural. El término también incluye un organismo microbiano que se retira de algunos o todos los componentes dado que el organismo microbiano se encuentra en entornos no presentes en la naturaleza. Por lo tanto, un organismo microbiano aislado está parcial o completamente separado de otras sustancias como se encuentra en la naturaleza o que se siembra, almacena o subsiste en ambientes no naturales. Ejemplos específicos de los organismos microbianos aislados incluyen microbios parcialmente puros, microbios sustancialmente puros y microbios cultivados en un medio que es de origen no natural.

Tal como se usa en la presente, los términos "microbiano", "organismo microbiano" o "microorganismo" significa cualquier organismo que existe como una célula microscópica que se incluye dentro de los dominios de arqueas, bacterias o eucariotas. Por lo tanto, el término pretende abarcar las células procariotas o eucariotas u organismos que tienen un tamaño microscópico e incluir bacterias, arqueas y eubacterias de todas las especies, así como los microorganismos eucarióticos tales como levaduras y hongos. El término también incluye cultivos de células de

cualquier especie que pueda ser cultivada para la producción de un bioquímico.

Tal como se usa en la presente, el término "4-hidroxibutanoico" significa un derivado 4-hidroxi del ácido butírico que tiene la fórmula química $C_4H_8O_3$ y una masa molecular de 104.11 g/mol (126.09 g/mol para su sal de sodio).

Tal como se usa en la presente, el término "4-hidroxibutanoico" significa un derivado 4-hidroxi del ácido butírico que tiene la fórmula química $C_4H_8O_3$ y una masa molecular de 104.11 g/mol (126.09 g/mol para su sal de sodio). El compuesto químico 4-hidroxibutanoico también es conocido en la técnica como 4-HB, 4-hidroxibutirato, ácido gamma-hidroxibutírico o GHB. El término tal como se utiliza en la presente está destinada a incluir cualquiera de las formas del compuesto de diversas sales e incluyen, por ejemplo, 4-hidroxibutanoato y 4-hidroxibutirato. Ejemplos específicos de las formas de sal de 4-HB incluyen sodio 4-HB y potasio 4-HB. Por lo tanto, los términos 4-hidroxibutanoico, ácido 4-HB, 4-hidroxibutirato, 4-hidroxibutanoato, ácido gamma-hidroxibutírico y el GHB, así como otros nombres reconocidos en la materia se utilizan como sinónimos en este documento.

Tal como se usa en la presente, el término "monómero" cuando se utiliza en referencia a 4-HB significa

4-HB en una forma no polimérico o no derivatizada. Ejemplos específicos de polimérico 4-HB incluyen poli-4-hidroxibutanoico y copolímeros de, por ejemplo, 4-HB y 3-HB. Un ejemplo específico de una forma derivada de 4-HB es 4-HB-CoA. Otros poliméricos 4-HB formas y otras formas derivatizadas de 4-HB también son conocidos en la técnica.

Tal como se usa en la presente, el término "γ-butirolactona" significa una lactona que tiene la fórmula química C4H6O2 y una masa molecular de 86.089 g/mol. El compuesto químico γ-butirolactona también se sabe en la técnica como GBL, butirolactona, 1,4-lactona, 4-butirolactona, 4-hidroxibutírico lactona del ácido gamma-hidroxibutírico y ácido lactona. El término tal como se utiliza en la presente está destinado a incluir cualquiera de las formas del compuesto de sal diferentes.

Tal como se usa en la presente, el término "1,4-butanodiol" significa un derivado de alcohol de alcano butano, que lleva dos grupos hidroxilo que tiene la fórmula química $C_4H_{10}O_2$ y una masa molecular de 90.12 g/mol. El compuesto químico 1,4-butanodiol también es conocido en la técnica como BDO y es un producto químico intermedio o precursor de una familia de compuestos que se refiere en la presente como familia de compuestos de BDO.

Tal como se usa en la presente, el término "4-hidroxibutanal" significa un aledehido que tiene la fórmula

química $C_4H_8O_2$ y una masa molecular de 88.10512 g/mol. El compuesto químico 4-hidroxibutanal (4-HBal) también se conoce en la técnica como 4-hidroxibutiraldehído.

Tal como se usa en la presente, el término "putrescina" significa una diamina que tiene la fórmula química $C_4H_{12}N_2$ y una masa molecular de 88.15148 g/mol. El compuesto químico de putrescina es también conocido en la técnica como 1,4-butanodiamina, 1,4-diaminobutano butilendiamina, tetrametilendiamina, tetrametildiamina y 1,4 butilendiamina.

Tal como se usa en la presente, el término "tetrahidrofurano" significa un compuesto orgánico heterocíclico correspondiente al totalmente hidrogenado analógicamente del compuesto aromático furano que tiene la fórmula química C_4H_8O y una masa molecular de 72.11 g/mol. El compuesto químico tetrahidrofurano también es conocido en la técnica como THF, tetrahidrofurano, 1,4-epoxibutano, óxido de butileno, óxido de ciclotetrametileno, oxaciclopentano, óxido de dietilenglicol, oxolano, furanidina, hidrofurano, óxido de tetra-metileno. El término tal como se utiliza en la presente está destinado a incluir cualquiera de las formas del compuesto de sal diferentes.

Tal como se usa en la presente, el término "CoA" o "coenzima A" significa un cofactor orgánico o grupo prostético (parte no proteico de una enzima), cuya presencia

es necesaria para la actividad de muchas enzimas (la apoenzima) para formar un sistema de enzimas activas. La coenzima A funciona como las enzimas de condensación de ciertos actos de transferencia del grupo acetilo o acilo y otros en la síntesis y oxidación de ácidos grasos, la oxidación de piruvato y en otra acetilación.

Tal como se usa en la presente, el término "sustancialmente anaeróbico" cuando se utiliza en referencia a un cultivo o condición de crecimiento significa que la cantidad de oxígeno es menor que aproximadamente 10% de saturación de oxígeno disuelto en medios líquidos. También se pretende que el término incluya cámaras selladas de medio líquido o sólido mantenido con una atmósfera de menos de aproximadamente 1% de oxígeno.

Los organismos que no son microbianos de origen natural de la invención pueden contener alteraciones genéticas estables, que se refieren a los microorganismos que pueden ser cultivados durante más de cinco generaciones sin pérdida de alteración. En general, las alteraciones genéticas estables incluyen modificaciones que persisten más de 10 generaciones, particularmente las modificaciones estables que persistirán más de aproximadamente 25 generaciones, y más particularmente, modificaciones genéticas estables serán mayores a 50 generaciones, incluso indefinidamente.

Los expertos en la técnica comprenderán que las alteraciones genéticas, incluyendo las modificaciones metabólicas ejemplificadas en este documento se describen con referencia a una fuente adecuada u organismo huésped tales como E. coli, levaduras u otros organismos descritos en la presente y sus reacciones metabólicas correspondientes o un organismo como fuente apropiada para el material genético deseado tales como los genes que codifican enzimas de sus reacciones metabólicas correspondientes para una ruta metabólica deseada. Sin embargo, dada la secuenciación completa del genoma de una amplia variedad de organismos y el alto nivel de esperiencia en el área de la genómica, los expertos en la técnica serán fácilmente capaces de aplicar las enseñanzas y la orientación proporcionada en este documento para prácticamente todos los demás organismos. Por ejemplo, las alteraciones metabólicas de E. coli ejemplificadas en la presente, pueden aplicarse fácilmente a otras especies mediante la incorporación del mismo o análogo que codifica el ácido nucleico a partir de distintas especies de las especies mencionadas. Tales alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, alteraciones genéticas de especies homólogas, en general, y en particular, desplazamientos de genes ortólogos, parálogos o no-ortólogos.

Un ortólogo es un gen o genes que están relacionados por descendencia vertical y son responsables de

manera sustancial de las mismas funciones o idénticas en los distintos organismos. Por ejemplo, un epóxido hidrolasa de ratón e epóxido hidrolasa de humano puede ser considerado ortólogo para la función biológica de la hidrólisis de los epóxidos. Los genes están relacionados por descendencia vertical cuando, por ejemplo, comparten similitud de secuencia de la cantidad suficiente para indicar que son homólogos, o relacionados por la evolución de un antepasado común. Los genes también se pueden considerar ortólogos si comparten la estructura tridimensional, pero no necesariamente con similitud de secuencias, de una cantidad suficiente para indicar que han evolucionado a partir de un antepasado común en la medida en que la similitud de secuencia primaria no es identificable. Los genes que son ortólogos pueden codificar proteínas con similitud de secuencia de aproximadamente 25% a 100% de identidad de secuencia de aminoácidos. También se puede considerar genes que codifican proteínas que comparten una similitud de aminoácidos menor que el 25% que han surgido por descendencia vertical si su estructura tridimensional también muestra similitudes. Los miembros de la familia de enzimas proteasa serina, incluyendo activador del plasminógeno tisular y elastasa, se considera que han surgido por descendencia vertical de un antepasado común.

Los ortólogos incluyen genes o sus productos génicos codificados que a través de, por ejemplo, la evolución, han divergido en la estructura o actividad global. Por ejemplo, cuando una especie codifica un producto génico exhibiendo dos funciones y en donde dichas funciones han sido separadas en genes distintos en una segunda especie, los tres genes y sus productos correspondientes se consideran ortólogos. Para la producción, incluyendo la producción de crecimiento de acoplamiento, de un producto bioquímico, los expertos en la materia entenderán que el gen ortólogo aloja la actividad metabólica que se introduce o interrumpe, deberá ser elegido para la construcción del microorganismo de origen no natural. Un ejemplo de ortólogos que exhiben las actividades separables es donde distintas actividades se han dividido en distintos productos de los genes entre dos o más especies o dentro de una sola especie. Un ejemplo específico es la separación de la proteolisis elastasa y la proteolisis del plasminógeno, dos tipos de actividad de serina proteasa, en moléculas distintas como el activador del plasminógeno y la elastasa. Un segundo ejemplo es la separación de micoplasma 5'- exonucleasa 3' y actividad de polimerasa III de ADN de Drosophila. La polimerasa de ADN de la primera especie se puede considerar un ortólogo a uno o ambos de la exonucleasa de la polimerasa o la de la segunda especie, y viceversa.

En contraste, los parálogos son homólogos relacionados, por ejemplo, sufren de 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, la hidrolasa de epóxido microsomal (epóxido hidrolasa I) e hidrolasa de epóxido soluble (epóxido hidrolasa II) se pueden considerar parálogos porque representan dos enzimas diferentes, co-evolucionaron de un ancestro común, que catalizan las reacciones distintas y tienen funciones distintas en la misma especie. Los parálogos son proteínas de la misma especie con similitud de secuencias entre sí lo que sugiere que son homólogas o relacionadas a través de la co-evolución de un ancestro común. Los grupos de familias de proteínas paralogas incluyen los homólogos hipA, los genes Luciferasa, peptidasas y otros.

Un desplazamiento del gen es un gen no ortólogo de una especie que puede sustituir a una función de los genes que hacen referencia en una especie diferente. La sustitución incluye, por ejemplo, ser capaz de realizar sustancialmente la misma o una función similar en la especie de origen en comparación con la función de referencia en las diferentes especies. Aunque en general, un desplazamiento de gen no ortólogo será identificada como estructuralmente relacionada con un gen que codifica la función de referencia

conocida, menos estructuralmente relacionados, pero genes funcionalmente similares y sus productos génicos correspondientes no obstante todavía están dentro del significado del término tal como se utiliza en este documento. La similitud funcional requiere, por ejemplo, al menos alguna similitud estructural en el sitio activo o región de unión de un producto génico no ortólogo en comparación con un gen que codifica la función que se pretende sustituir. Por lo tanto, un gen no ortólogo incluye, por ejemplo, un parálogo o un gen no relacionado.

Por lo tanto, en la identificación y la construcción de los organismos microbianos que no están presentes naturalmente de la invención que tienen 4-HB, GBL, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO y/o capacidad biosintética putrescina, los expertos en la técnica entenderán con la aplicación de la enseñanza y la orientación proporcionada en este documento para una especie en particular que la identificación de modificaciones metabólicas pueden incluir la identificación y la inclusión o la inactivación de ortólogos. En la medida en que parálogos y/o genes de desplazamiento no ortólogo están presentes en el microorganismo de referencia que codifican una enzima que cataliza una reacción metabólica similar o sustancialmente similar, los expertos en la técnica también pueden utilizar estos genes evolutivamente relacionados.

Los desplazamientos de genes ortólogos, parálogos y no ortólogos pueden ser determinados por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la inspección de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos para dos polipéptidos revelará identidad de secuencia y similitudes entre las secuencias comparadas. Sobre la base de estas similitudes, los expertos en la técnica se pueden determinar si la similitud es suficientemente alta para indicar las proteínas están relacionadas con la evolución de un antepasado común. Los algoritmos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como Alingn, BLAST, Clustal W y otros comparan y determinan una similitud de secuencias en bruto o de identidad y también determinan la presencia o la significación de las diferencias en la secuencia a la que se puede asignar un peso o puntuación. Tales algoritmos también son conocidos en la técnica y son igualmente aplicables para la determinación de similitud de secuencias de nucleótidos o de identidad. Los parámetros de similitud suficiente para determinar la relación se calcula sobre la base de métodos bien conocidos para el cálculo de similitud estadística, o la posibilidad de encontrar un partido similar en una muestra aleatoria polipéptido y la importancia del partido determinado. Un equipo de comparación de dos o más secuencias puede, si se desea, optimizarse también visualmente por los expertos en la técnica. Los productos relacionados de genes o

proteínas se puede esperar que tenga una alta similitud, por ejemplo, de 25% a 100% de identidad de secuencia. Las proteínas que no están relacionadas pueden tener una identidad que es esencialmente el mismo que se espera que se produzca por casualidad, si una base de datos de tamaño suficiente es escaneado (aproximadamente 5%). Las secuencias entre 5% y 24% pueden o no representar homología suficiente para concluir que las secuencias comparadas están relacionadas. El análisis estadístico adicional para determinar la importancia de estas coincidencias, dado el tamaño del conjunto de datos puede llevarse a cabo para determinar la relevancia de estas secuencias.

Los ejemplos de parámetros para determinar la relación de dos o más secuencias utilizando el algoritmo BLAST, por ejemplo, puede ser como se establece a continuación. En pocas palabras, la secuencia de alineaciones amino ácido se puede realizar utilizando BLASTP la versión 2.0.8 (Ene-05-1999) y los siguientes parámetros: Coincidencia: 0 BLOSUM62; espacio abierto: 11; extensión de espacio: 1; x_dropoff: 50; esperado: 10.0; tamaño de palabra: 3; filtro: encendido. Los lineamientos de secuencias de ácidos nucleicos se pueden realizar utilizando la versión 2.0.6 BLASTN (septiembre-16-1998) y los siguientes parámetros: Coincidencia: 1; desajuste: -2; espacio abierto: 5; espacio de extensión: 2; x_dropoff: 50; esperado: 10.0;

tamaño de palabra: 11; filtro: apagado. Los expertos en la técnica sabrán que se pueden hacer modificaciones a los parámetros anteriores para aumentar o disminuir la severidad de la comparación, por ejemplo, y determinar la relación de dos o más secuencias.

En la presente se describen biocatalizadores microbianos no presentes en la naturaleza u organismos microbianos que incluyen un organismo microbiano que tiene un ruta biosintética de ácido 4-hidroxibutanoico (4-HB) que incluye al menos un ácido nucleico que codifica 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa exógena, CoA-deshidrogenasa independiente semialdehído succínico, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico CoA-dependiente deshidrogenasa, glutamato: semialdehído succínico transaminasa, alfa-cetoglutarato descarboxilasa, o glutamato descarboxilasa, en donde el ácido nucleico exógeno se expresa en cantidades suficientes para producir monómero 4-hidroxibutanoico (4-MP). 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa también se refiere como deshidrogenasa 4-hidroxibutirato deshidrogenasa o 4-HB. Succinil-CoA sintetasa también se refiere como succinil-CoA sintasa o succinil-CoA ligasa.

También se describe en la presente un biocatalizador de origen no natural microbiano u organismo microbiano incluyendo un organismo microbiano que tiene una ruta biosintética de ácido 4-hidroxibutanoico (4-HB) que

tiene al menos un ácido nucleico que codifica 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa exógena, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico CoA -dependiente deshidrogenasa, o α-cetoglutarato descarboxilasa, en donde el ácido nucleico exógeno se expresa en cantidades suficientes para producir monómero 4-hidroxibutanoico (4-MP).

Los biocatalizadores microbianos de origen no natural u organismos microbianos pueden incluir organismos microbianos que emplean combinaciones de reacciones metabólicas para producir biosintéticamente los compuestos de la invención. Los compuestos biosintetizados pueden ser producidos intracelularmente y/o secretados en el medio de cultivo. Ejemplos de compuestos producidos por los microorganismos de origen no natural incluyen, por ejemplo, ácido 4-hidroxibutanoico, 1,4-butanodiol y γ-butirolactona.

En una modalidad, un organismo microbiano de origen no natural está diseñado para producir 4-HB. Este compuesto es un punto de entrada útil en la familia de compuestos 1,4-butanodiol. Las reacciones bioquímicas para la formación de 4-HB de succinato, de succinato a través de succinil-CoA o de α-cetoglutarato se muestran en los pasos 1-8 de la Figura 1.

Se entiende que cualquier combinación de enzimas apropiadas de una ruta de BDO, 4-HBal, 4-HBCoA y/o putrescina puede utilizarse siempre y cuando se logra la conversión de un componente de partida para el producto de BDO, 4-HBal, 4-

HBCoA y/o putrescina. Así, se entiende que cualquiera de las rutas metabólicas descritas en la presente puede ser utilizada y es bien comprendido por los expertos en la técnica cómo seleccionar enzimas adecuadas para lograr una ruta deseada, como se describe en la presente.

En otra modalidad, se describe en la presente es un organismo microbiano de origen no natural, que comprende un organismo microbiano que tiene un 1,4-butanodiol (BDO) ruta que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, la ruta de BDO que comprende 4-aminobutirato transferasa CoA, 4-aminobutiril-CoA hidrolasa, 4-aminobutirato-CoA ligasa, 4-aminobutiril-CoA-oxidorreductasa (desaminante), 4-aminobutiril-CoA transaminasa, o 4-hidroxibutiril CoA-deshidrogenasa (véase el Ejemplo VII Tabla 17). La ruta de BDO puede comprender además 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol), 4-hidroxibutiril-CoA reductasa, o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

Se entiende por los expertos en la técnica que varias combinaciones de las rutas se pueden utilizar, como se describe en la presente. Por ejemplo, en un organismo microbiano de origen no natural, los ácidos nucleicos pueden codificar 4-aminobutirato CoA transferasa, 4-aminobutiril-CoA hidrolasa, o 4-aminobutirato-CoA ligasa; 4-aminobutiril-CoA

oxidorreductasa (desaminante) o 4 - aminobutiril-CoA transaminasas y 4-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa. Otras combinaciones ilustrativaes se describen específicamente a continuación y además se pueden encontrar en las Figuras 8-13. Por ejemplo, la ruta de BDO puede comprender además 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol), 4-reductasa hidroxibutiril-CoA, o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

Además en la presente se describe un organismo microbiano de origen no natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de BDO que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, la ruta de BDO que comprende 4-aminobutirato CoA transferasa, 4-aminobutiril-CoA hidrolasa, 4-aminobutirato-CoA ligasa, 4-aminobutiril-CoA reductasa (formador de alcohol), 4-aminobutiril-CoA reductasa, 4-aminobutan-1-ol deshidrogenasa, 4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (Desaminante) o 4-aminobutan-1-ol transaminasa (véase el Ejemplo VII y Tabla 18) y puede comprender además 1,4-butanodiol deshidrogenasa. Por ejemplo, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar 4-aminobutirato-CoA transferasa, 4-aminobutiril-CoA hidrolasa, o 4-aminobutirato-CoA ligasa; 4-aminobutiril-CoA reductasa (formador de alcohol) y 4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (desaminante) o 4-aminobutan-

1-ol transaminasa. Además, los ácidos nucleicos pueden codificar 4-aminobutirato-CoA transferasa, 4-aminobutiril-CoA hidrolasa, o 4-aminobutirato-CoA ligasa; 4-aminobutiril-CoA reductasa; 4-aminobutan-1-ol-deshidrogenasa y 4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (desaminante) o 4-aminobutan-1-ol transaminasa.

También se describe en la presente un organismo microbiano de origen no natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de BDO que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, la ruta de BDO que comprende 4-aminobutirato cinasa, 4-aminobutiraldehído deshidrogenasa (fosforilación), 4-aminobutan-1-ol deshidrogenasa, 4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (desaminante), 4-aminobutan-1-ol transaminasa, [(4-aminobutanolil)oxi]fosfónico oxidorreductasa (desaminante), ácido fosfónico [(4-aminobutanolil) oxi] transaminasa, 4-hidroxibutiril-fosfato deshidrogenasa, o 4-hidroxibutiraldehído deshidrogenasa (fosforilación) (véase el Ejemplo VII y en la Tabla 19). Por ejemplo, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar 4-aminobutirato cinasa; 4-aminobutiraldehído deshidrogenasa (fosforilación); 4-aminobutan-1-ol deshidrogenasa, y 4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (desaminante) o 4-aminobutan-1-ol transaminasa. Alternativamente, los ácidos nucleicos

exógenos pueden codificar 4-aminobutirato cinasa; [(4-aminobutanolil) oxi] fosfónico oxidorreductasa (desaminante) o ácido fosfónico [(4-aminobutanolil) oxi] transaminasa; 4-hidroxibutiril-fosfato deshidrogenasa y 4-hidroxibutiraldehído deshidrogenasa (fosforilación).

Además en la presente se describe un organismo microbiano de origen no natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de BDO que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO que se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, la ruta de BDO que comprende alfa-cetoglutarato 5 - cinasa, semialdehído 2,5-dioxopentanoico deshidrogenasa (fosforilación), ácido 2,5-dioxopentanoico reductasa, alfa-cetoglutarato CoA transferasa, alfa-cetoglutaril-CoA hidrolasa, alfa-cetoglutaril-CoA ligasa, alfa-cetoglutaril-CoA reductasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa, alfa-cetoglutaril-CoA reductasa (formador de alcohol), ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa, o ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación) (véase el Ejemplo VIII y en la Tabla 20) . La ruta de BDO puede comprender además 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol), 4- hidroxibutiril-CoA reductasa, o 1,4-butanodiol deshidrogenasa. Por ejemplo, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar alfa-cetoglutarato 5-cinasa; semialdehído 2,5-dioxopentanoico deshidrogenasa

(fosforilación); ácido 2,5-dioxopentanoico reductasa; y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa. Alternativamente, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar alfa-cetoglutarato 5-cinasa; semialdehído 2,5-dioxopentanoico deshidrogenasa (fosforilación); ácido 2,5-dioxopentanoico reductasa; y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (Descarboxilación). Alternativamente, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar alfa-cetoglutarato CoA transferasa, alfa-cetoglutaril-CoA hidrolasa, o alfa-cetoglutaril CoA-ligasa; alfa-cetoglutaril-CoA reductasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa. En otra modalidad, los ácidos nucleicos exógenos puede codificar alfa-cetoglutarato CoA transferasa, alfa-cetoglutaril-CoA hidrolasa, o alfa-cetoglutaril CoA-ligasa; alfa- cetoglutaril-CoA reductasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación). Alternativamente, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar alfa-cetoglutarato CoA transferasa, alfa-cetoglutaril-CoA hidrolasa, o alfa-cetoglutaril CoA-ligasa; alfa-cetoglutaril-CoA reductasa (formador de alcohol) y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa. En otra modalidad, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar alfa-cetoglutarato CoA transferasa, alfa- cetoglutaril-CoA hidrolasa, o alfa-cetoglutaril CoA-ligasa; alfa-cetoglutaril-

CoA reductasa (formador de alcohol), y 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (Descarboxilación).

Además se describe en este documento es un organismo microbiano de origen no natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de BDO que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, la ruta de BDO que comprende glutamato-CoA transferasa, glutamil-CoA hidrolasa, glutamil-CoA ligasa, 5-glutamato cinasa, glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa (fosforilación), glutamil-CoA reductasa, glutamato-5-semialdehído reductasa, glutamil-CoA reductasa (formador de alcohol), ácido 2-amino-5 -hidroxipentanoico oxidorreductasa (desaminante), ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico transaminasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación) (véase el Ejemplo IX y la Tabla 21). Por ejemplo, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar glutamato-CoA transferasa, glutamil-CoA hidrolasa, o glutamil-CoA-ligasa; glutamil-CoA reductasa; glutamato-5-semialdehído reductasa; ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico oxidorreductasa (desaminante) o ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico transaminasa, y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa o ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación).

Alternativamente, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar glutamato 5-cinasa; glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa (fosforilación); glutamato-5-semialdehído reductasa; ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico oxidorreductasa (desaminante) o ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico transaminasa y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa o ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación). En otra modalidad, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar glutamato CoA transferasa, glutamil-CoA hidrolasa, o glutamil-CoA ligasa; glutamil-CoA reductasa (formador de alcohol); ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico oxidorreductasa (desaminante) o ácido 2 - amino-5-hidroxipentanoico transaminasa y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa o ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación). En otra modalidad, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar glutamato 5-cinasa; glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa (fosforilación); ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico oxidorreductasa (Desaminante) o ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico transaminasa y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa o ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (Descarboxilación).

También se describe en la presente un organismo microbiano de origen no natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de BDO que comprende al menos

un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, la ruta de BDO que comprende 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, vinilacetil Δ-CoA-isomerasa, o 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa (ver Ejemplo X y en la Tabla 22). Por ejemplo, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxibutiril-CoA deshidratasa; vinilacetil Δ-CoA-isomerasa, y 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa.

Además se describe en este documento un organismo microbiano de origen no natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de BDO que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, la ruta de BDO que comprende homoserina desaminasa, homoserina CoA transferasa, homoserina-CoA hidrolasa, homoserina-CoA ligasa, homoserina-CoA-desaminasa, 4-hidroxibut-2-enoil-CoA transferasa, 4-hidroxibut-2-enoil-CoA hidrolasa, 4-hidroxibut-2-enoil-CoA ligasa, 4-hidroxibut-2-enoato reductasa, 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa, 4-hidroxibutiril-CoA ligasa, o 4-hidroxibut-2-enoil-CoA reductasa (véase el Ejemplo XI y la Tabla 23). Por ejemplo, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar homoserina desaminasa; 4-hidroxibut-2-enoil-CoA

transferasa, 4-hidroxibut-2-enoil-CoA hidrolasa, 4-hidroxibut-2-enoil-CoA ligasa; 4-hidroxibut-2-enoil-CoA reductasa. Alternativamente, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar homoserina CoA transferasa, homoserina-CoA hidrolasa, o homoserina-CoA ligasa; homoserina-CoA desaminasa y 4- hidroxibut-2-enoil-CoA reductasa. En una modalidad adicional, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar homoserina desaminasa; 4-hidroxibut-2-enoato reductasa; y 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa, o 4- hidroxibutiril-CoA ligasa. Alternativamente, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar homoserina CoA transferasa, homoserina-CoA hidrolasa, o homoserina-CoA ligasa; homoserina-CoA desaminasa; y 4-hidroxibut-2-enoil-CoA reductasa.

Además en este documento se describe un organismo microbiano de origen no natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de BDO que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO se expresa en una cantidad suficiente para producir BOD, la ruta de BDO que comprende succinil-CoA reductasa (formador de alcohol), 4-hidroxibutiril-CoA-hidrolasa, 4-hidroxibutiril-CoA ligasa, 4-hidroxibutanal deshidrogenasa (fosforilación) (véase Cuadro 15). Tal una ruta de BDO puede comprender además succinil-CoA reductasa, 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, 4-hidroxibutiril-CoA cinasa, 4-

hidroxibutirato transferasa, fosfotrans-4-hidroxibutirilasa, 4- hidroxibutiril-CoA reductasa, 4- hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol), o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

Además en la presente descrita es un organismo microbiano de origen no natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de BDO que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, la ruta de BDO que comprende glutamato deshidrogenasa, 4 -aminobutirato oxidorreductasa (desaminante), 4-aminobutirato transaminasa, la enzima glutamato descarboxilasa, 4-hidroxibutiril-CoA-hidrolasa, 4-hidroxibutiril-CoA ligasa, 4-hidroxibutanal deshidrogenasa (fosforilación) (véase Cuadro 16). Esta ruta de BDO puede comprender, además de alfa-cetoglutarato descarboxilasa, 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, 4- hidroxibutiril-CoA cinasa, 4-hidroxibutirato transferasa, fosfotrans-4 hidroxi-butirilasa, 4- hidroxibutiril-CoA reductasa, 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol), o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

Las rutas descritas anteriormente son meramente ilustrativas. El experto en la técnica puede seleccionar fácilmente las rutas apropiadas de las descritas en la

presente para obtener una ruta adecuada de BDO u otra ruta metabólica, según se desee.

La invención proporciona organismos genéticamente modificados que permiten mejorar la producción de un producto deseado, tal como BDO aumentando o disminuyendo el producto subproductos inconvenientes. Como se describe en este documento, la invención proporciona un organismo microbiano no natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de 1,4-butanodiol (BDO) que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO . En una modalidad, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar exógeno succinil-CoA sintetasa (véase Ejemplo XII). Por ejemplo, la succinil-CoA sintetasa pueden ser codificados por los genes un Escherichia coli sucCD.

En otra modalidad, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar exógeno alfa-cetoglutarato descarboxilasa (véase el Ejemplo XIII). Por ejemplo, la descarboxilasa de alfa-cetoglutarato puede ser codificado por el gen Mycobacterium bovis sucA. En todavía otra modalidad, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar deshidrogenasa exógeno succinato semialdehído y 4-hidroxibutirato deshidrogenasa y opcionalmente transferasa 4-hidroxibutiril-CoA/acetil-CoA

(véase el Ejemplo XIII). Por ejemplo, la deshidrogenasa semialdehído succinato (CoA-dependiente), 4-hidroxibutirato deshidrogenasa y 4-hidroxibutiril-CoA/acetil-CoA transferasa puede ser codificada por Porphyromonas gingivalis W83 genes. En una modalidad adicional, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar butirato cinasa exógena y fosfotransbutirilasa (véase el Ejemplo XIII). Por ejemplo, la cinasa y butirato fosfotransbutirilasa puede ser codificado por el Clostridium acetobutylicum bukl y los genes PTB.

En otra modalidad, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar exógeno 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (véase el Ejemplo XIII). Por ejemplo, el 4-reductasa hidroxibutiril-CoA puede ser codificada por el gen ald de Clostridium beijerinckii. Además, en una modalidad de la invención, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar exógeno 4-hidroxibutanal reductasa (véase el Ejemplo XIII). Por ejemplo, el 4-hidroxibutanal reductasa puede ser codificada por gen adhl de Geobacillus thermoglucosidasius. En otra modalidad, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar subunidades exógenas de piruvato deshidrogenasa (véase el Ejemplo XIV). Por ejemplo, el exógeno piruvato deshidrogenasa puede ser NADH insensible. La subunidad de la piruvato deshidrogenasa puede ser codificada

por el gen de la Klebsiella pneumonia ipdA. En una modalidad particular, la subunidad del organismo microbiano de genes piruvato deshidrogenasa que puede estar bajo el control de un promotor de piruvato formiato liasa.

En todavía otra modalidad, el organismo microbiano está genéticamente modificado para interrumpir un gen que codifica un sistema de control respiratorio aeróbico regulador (véase Ejemplo XV). Por ejemplo, la interrupción puede ser del gen arcA. Dicho organismo puede comprender además la interrupción de una codificación de gen malato deshidrogenasa. En una modalidad adicional, el organismo microbiano está genéticamente modificado para expresar un exógeno NADH citrato sintasa insensible (véase Ejemplo XV). Por ejemplo, la NADH citrato sintasa insensible puede ser codificada por gltA, tal como un mutante de R163L gltA. En todavía otra modalidad, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar fosfoenolpiruvato carboxicinasa exógena (véase Ejemplo XVI). Por ejemplo, la fosfoenolpiruvato carboxicinasa puede ser codificada por un gen de fosfoenolpiruvato carboxicinasa de Haemophilus influenza.

Se entiende que cualquiera de una serie de modificaciones genéticas, como se describe en este documento, se puede utilizar sola o en diversas combinaciones de una o más de las modificaciones genéticas que se describen en la

presente para aumentar la producción de BDO en un organismo que produce BDO microbiano. En una modalidad particular, el organismo microbiano puede ser genéticamente modificado para incorporar cualquiera y hasta todas las modificaciones genéticas que conducen a una mayor producción de BDO. En una modalidad particular, el organismo microbiano que contiene una ruta de BDO puede ser genéticamente modificado para expresar exógeno succinil-CoA sintetasa; para expresar exógeno alfa-cetoglutarato descarboxilasa; para expresar succinato semialdehído deshidrogenasa exógeno y 4-hidroxibutirato deshidrogenasa y, opcionalmente, 4-CoA-hidroxibutiril/acetil-CoA transferasa; para expresar exógeno butirato cinasa y fosfotransbutirilasa; para expresar 4-hidroxibutiril-CoA reductasa exógeno y para expresar 4-hidroxibutanal reductasa exógena; para expresar piruvato deshidrogenasa exógena; para interrumpir un gen que codifica un sistema respiratorio de control regulador aeróbico, para expresar un exógeno NADH citrato sintasa insensible y para expresar exógeno fosfoenolpiruvato carboxicinasa. Tales cepas para mejorar la producción se describen en los Ejemplos XII-XIX. Por lo tanto, se entiende que, además de las modificaciones descritas anteriormente, tales cepas pueden incluir adicionalmente otras modificaciones descritas en la presente. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, la supresión de lactato deshidrogenasa endógena (IDHA),

alcohol deshidrogenasa (adhesivo), y/o formiato piruvato liasa (pflB) (ver Ejemplos XII-XIX y en la Tabla 28).

Además se proporciona un organismo microbiano en donde uno o más genes que codifican las enzimas expresadas exógenamente se integran en el sitio fimD del organismo huésped (véase Ejemplo XVII). Por ejemplo, uno o más genes que codifican una enzima de la ruta de BDO se puede integrar en el sitio fimD para aumentar la producción de BDO. Además se proporciona un organismo microbiano expresan un sistema de absorción de sacarosa no fosfotransferasa que aumenta la producción de BDO.

Aunque los organismos microbianos genéticamente modificados descritos en la presente se ejemplifican con los organismos microbianos que contienen enzimas de la ruta particular, BDO, se entiende que tales modificaciones se pueden incorporar en cualquier organismo microbiano que tiene un BDO, 4-HBal, 4-HBCoA y/o ruta de putrescina adecuada para producción mejorada en presencia de las modificaciones genéticas. Los organismos microbianos de la invención, por lo tanto, pueden tener cualquiera de las rutas de BDO, 4-HBal, 4-HBCoA y/o putrescina descritos en la presente. Por ejemplo, la ruta de BDO puede comprender 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico CoA-dependiente deshidrogenasa, 4-hidroxibutirato: CoA transferasa, 4-butirato cinasa, fosfotransbutirilasa,

alfa-cetoglutarato descarboxilasa, aldehído deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa o un aldehído/alcohol deshidrogenasa (ver Figura 1). Alternativamente, la ruta de BDO puede comprender 4-aminobutirato CoA transferasa, 4-aminobutiril-CoA hidrolasa, 4-aminobutirato-CoA ligasa, 4-aminobutiril-CoA oxidorreductasa (desaminante), 4- aminobutiril-CoA transaminasa, o 4-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa (véase Cuadro 17). Tal una ruta de BDO puede comprender además 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol), 4-hidroxibutiril-CoA reductasa, o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

Además, la ruta de BDO puede comprender 4-aminobutirato CoA transferasa, 4-aminobutiril-CoA hidrolasa, 4-aminobutirato-CoA ligasa, 4-aminobutiril-CoA reductasa (formador de alcohol), 4-aminobutiril-CoA reductasa, 4-aminobutan-1-ol-deshidrogenasa, 4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (desaminante) o 4-aminobutan-1-ol transaminasas (véase Cuadro 18). Además, la ruta de BDO puede comprender 4-aminobutirato cinasa, 4-aminobutiraldehído deshidrogenasa (fosforilación), 4-aminobutan-1-ol deshidrogenasa, 4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (desaminante), 4-aminobutan-1-ol transaminasa, [(4-aminobutanolol) oxi] fosfónico oxidorreductasa (desaminante), [(4-aminobutanolil)oxi] fosfónico transaminasa, ácido 4-hidroxibutiril-fosfato deshidrogenasa, o 4

hidroxibutiraldehído-deshidrogenasa (fosforilación) (véase Tabla 19). Tal una ruta puede comprender además de 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

La ruta de BDO también puede comprender alfa-cetoglutarato 5-cinasa, semialdehído 2,5-dioxopentanoico deshidrogenasa (fosforilación), ácido 2,5-dioxopentanoico reductasa, alfa-cetoglutarato CoA transferasa, alfa-cetoglutaril-CoA hidrolasa, alfa-CoA-cetoglutaril ligasa, alfa-cetoglutaril-CoA reductasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa, alfa-cetoglutaril-CoA reductasa (formador de alcohol), ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa, o ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación) (véase Tabla 20). Tal una ruta de BDO puede comprender además 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol), 4- hidroxibutiril-CoA reductasa, o 1,4-butanodiol deshidrogenasa. Además, la ruta de BDO puede comprender glutamato CoA transferasa, glutamil-CoA hidrolasa, glutamil-CoA ligasa, glutamato 5-cinasa, glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa (fosforilación), glutamil-CoA reductasa, glutamato-5-semialdehído reductasa, glutamil- CoA reductasa (formador de alcohol), ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico oxidorreductasa (desaminante), ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico transaminasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación) (véase Cuadro 21). Tal ruta

de BDO puede comprender además 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol), 4-reductasa hidroxibutiril-CoA, o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

Además, la ruta de BDO puede comprender 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, vinylacetil-CoA Δ-isomerasa, o 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa (véase la Tabla 22). Además, la ruta de BDO puede comprender homoserina desaminasa, homoserina CoA transferasa, homoserina-CoA hidrolasa, homoserina-CoA ligasa, homoserina-CoA desaminasa, 4-hidroxibut-2-enoil-CoA transferasa, 4-hidroxibut-2-enoil-CoA hidrolasa, 4-hidroxibut-2-enoil-CoA ligasa, 4-hidroxibut-2-enoato reductasa, 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa, 4-hidroxibutiril-CoA ligasa, o 4-hidroxibut-2-enoil-CoA reductasa (véase Cuadro 23). Tal ruta de BDO puede comprender además 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol), 4-hidroxibutiril-CoA reductasa, o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

La ruta de BDO, además, puede comprender succinil-CoA reductasa (formador de alcohol), 4- hidroxibutiril-CoA hidrolasa, 4-hidroxibutiril-CoA ligasa, o 4 hidroxibutanal-deshidrogenasa (fosforilación) (véase Cuadro 15). Tal ruta puede comprender además succinil-CoA reductasa, 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, 4-hidroxibutiril-CoA cinasa, 4-hidroxibutirato transferasa, fosfotrans-4-

hidroxibutirilasa, 4- hidroxibutiril-CoA reductasa, 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol), o 1,4-butanodiol deshidrogenasa. Además, la ruta de BDO puede comprender glutamato deshidrogenasa, 4-aminobutirato oxidorreductasa (desaminante), 4-aminobutirato transaminasa, glutamato descarboxilasa, 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa, 4-hidroxibutiril-CoA ligasa, o 4- hidroxibutanal deshidrogenasa (fosforilación) (Ver Tabla 16). Esta ruta de BDO puede comprender, además de alfa-cetoglutarato descarboxilasa, 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, 4-hidroxibutiril-CoA cinasa, 4-hidroxibutirato transferasa, fosfotrans-4 hidroxibutirilasa, 4- hidroxibutiril-CoA reductasa, 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol), o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

La invención proporciona adicionalmente un organismo microbiano no natural, que comprende una ruta de 4-hidroxibutanal que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta 4-hidroxibutanal expresado en una cantidad suficiente para producir 4-hidroxibutanal, la ruta succinil 4-hidroxibutanal comprende CoA reductasa (formador de aldehído); 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, y 4-hidroxibutirato reductasa (véase la Figura 58, pasos A-C-D). La invención también proporciona un organismo microbiano no natural, que comprende una ruta de 4-hidroxibutanal que comprende al menos un ácido nucleico

exógeno que codifica un enzima de la ruta 4-hidroxibutanal expresado en una cantidad suficiente para producir 4-hidroxibutanal, la ruta de 4-hidroxibutanal que comprende alfa-cetoglutarato descarboxilasa; 4-hidroxibutirato deshidrogenasa y 4-hidroxibutirato reductasa (Figura 58, los pasos B-C-D).

La invención proporciona además un organismo microbiano de origen no natural, que comprende una ruta de 4-hidroxibutanal que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta 4-hidroxibutanal expresado en una cantidad suficiente para producir 4-hidroxibutanal, la ruta de 4-hidroxibutanal comprende succinato reductasa; 4-hidroxibutirato deshidrogenasa y 4-hidroxibutirato reductasa (véase la Figura 62, los pasos FCD). En otra modalidad, la invención proporciona un organismo microbiano no natural, que comprende una ruta de 4-hidroxibutanal que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta 4-hidroxibutanal expresado en una cantidad suficiente para producir 4-hidroxibutanal, la ruta 4- hidroxibutanal que comprende alfa-cetoglutarato descarboxilasa, o glutamato transaminasa o el glutamato deshidrogenasa y el glutamato decarboxilasa y 4 aminobutirato-transaminasa o 4-aminobutirato deshidrogenasa; 4-hidroxibutirato deshidrogenasa y 4-hidroxibutirato

reductasa (véase la Figura 62, B o pasos ((J o K)-1-(M o N))-CD).

La invención también proporciona un organismo microbiano no natural, que comprende una ruta de 4-hidroxibutanal que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta 4-hidroxibutanal expresada en una cantidad suficiente para producir 4-hidroxibutanal, la ruta de 4-hidroxibutanal que comprende alfa-cetoglutarato reductasa; 5-hidroxi-2-oxopentanoato deshidrogenasa y 5-hidroxi-2-oxopentanoato descarboxilasa (véase Figura 62, los pasos X-Y-Z). En otra modalidad, la invención proporciona un organismo microbiano no natural, que comprende una ruta de 4-hidroxibutiril-CoA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta 4-hidroxibutiril-CoA expresada en una cantidad suficiente para producir 4-hidroxibutiril-CoA, la ruta de 4-hidroxibutiril-CoA que comprende alfa-cetoglutarato reductasa; 5-hidroxi-2-oxopentanoato deshidrogenasa; y 5-hidroxi-2-oxopentanoato deshidrogenasa (descarboxilación) (véase la Figura 62, los pasos X-Y-AA).

La invención proporciona adicionalmente un organismo microbiano no natural, que comprende una ruta de putrescina que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta putrescina expresado en una cantidad suficiente para producir putrescina, la ruta de

putrescina comprende succinato reductasa; 4-aminobutirato deshidrogenasa o 4-aminobutirato transaminasas; 4-aminobutirato reductasa y putrescina deshidrogenasa o putrescina transaminasa (véase la Figura 63, pasos F-M/N-C-D/E). En todavía otra modalidad, la invención proporciona un organismo microbiano no natural, que comprende una ruta de putrescina que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta putrescina expresada en una cantidad suficiente para producir putrescina, la ruta de putrescina que comprende alfa-cetoglutarato descarboxilasa; 4-aminobutirato transaminasa o 4-aminobutirato deshidrogenasa; 4-aminobutirato reductasa; y putrescina deshidrogenasa o putrescina transaminasa (véase la Figura 63, pasos B-M/N-C-D/E). La invención proporciona adicionalmente un organismo microbiano no natural, que comprende una ruta de putrescina que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta putrescina expresada en una cantidad suficiente para producir putrescina, la ruta de putrescina comprende glutamato deshidrogenasa o glutamato transaminasa; glutamato decarboxilasa; 4-aminobutirato reductasa y de las putrescina transaminasas o putrescina deshidrogenasa (véase la Figura 63, pasos J/K-1-C-D/E).

La invención proporciona, en otra modalidad, un organismo microbiano de origen no natural, que comprende una ruta de putrescina que comprende al menos un ácido nucleico

exógeno que codifica un enzima de la ruta putrescina expresada en una cantidad suficiente para producir putrescina, la ruta de putrescina que comprende alfa-cetoglutarato reductasa; 5-amino-2-oxopentanoato deshidrogenasa o 5-amino-2-oxopentanoato transaminasa; 5-amino-2-oxopentanoato descarboxilasa; y putrescina deshidrogenasa o putrescina transaminasa (véase la Figura 63, pasos OP/QRD/E). También se proporciona un organismo microbiano no natural, que comprende una ruta de putrescina que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta putrescina expresada en una cantidad suficiente para producir putrescina, la ruta de putrescina que comprende alfa-cetoglutarato reductasa; 5-amino-2-oxopentanoato deshidrogenasa o 5-amino-2-oxopentanoato transaminasa; ornitina deshidrogenasa u ornitina transaminasa y ornitina descarboxilasa (véase la Figura 63, pasos O-P/Q-S/T-U).

En una modalidad adicional, la invención proporciona un organismo microbiano no natural que tiene un 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o ruta putrescina, en donde el organismo microbiano de origen no natural comprende al menos un ácido nucleico que codifica exógeno una enzima o proteína que convierte un sustrato de cualquiera de las rutas descritas en la presente (ver, por ejemplo, los Ejemplos y Figuras 1, 8-13, 58, 62 y 63). En una modalidad ilustrativa

para producir BDO, el organismo microbiano puede convertir un sustrato a un producto seleccionado del grupo que consta de succinato a succinil-CoA; succinil-CoA a semialdehído succínico; semialdehído succínico a 4-hidroxibutrato; 4-hidroxibutirato a 4-hidroxibutiril-fosfato; 4-hidroxibutiril-fosfato a 4-hidroxibutiril-CoA; 4-hidroxibutiril-CoA a 4-hidroxibutanal y 4-hidroxibutanal al 1,4-butanodiol. En una ruta para producir 4-HBal, un organismo microbiano puede convertir, por ejemplo, succinato de semialdehído succínico; semialdehído succínico a 4-hidroxibutirato, y 4-hidroxibutirato a 4-hidroxibutanal. Tal un organismo puede incluir adicionalmente la actividad para convertir 4-hidroxibutanal al 1,4-butanodiol con el fin de producir BDO. Sin embargo, otra ruta para producir 4-HBal puede ser, por ejemplo, alfa-cetoglutarato para semialdehído succínico; semialdehído succínico a 4-hidroxibutirato y 4-hidroxibutirato a 4-hidroxibutanal. Una ruta alternativa para producir 4-HBal puede ser, por ejemplo, alfa-cetoglutarato a ácido 2,5-dioxopentanoico; ácido 2,5-dioxopentanoico a ácido 5-hidroxi-2-oxopentanooico; y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico a 4-hidroxibutanal. Una ruta ilustrativa de 4-hidroxibutiril-CoA puede ser, por ejemplo, alfa-cetoglutarato a ácido 2,5-dioxopentanoico; ácido 2,5-dioxopentanoico a ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico a 4-hidroxibutiril-CoA. Una ruta de putrescina ilustrativa puede

ser, por ejemplo, succinato a succinil-CoA; succinil-CoA a semialdehído succínico; semialdehído succínico a 4-aminobutirato; 4-aminobutirato de 4-aminobutanal; y 4-aminobutanal a putrescina. Una ruta alternativa putrescina puede ser, por ejemplo, succinato de semialdehído succínico; semialdehído succínico a 4-aminobutirato; 4-aminobutirato de 4-aminobutanal; y 4-aminobutanal a putrescina. Un experto en la técnica comprenderá que estos son meramente ilustrativos y que cualquiera de los pares de productos sustrato descritos en la presente adecuados para producir un producto deseado y para el cual una actividad adecuada está disponible para la conversión que puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica basado en la presente memoria descriptiva. Así, la invención proporciona un organismo microbiano no natural que contiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima o proteína, donde la enzima o proteína convierte los sustratos y los productos de una ruta (ver Figuras 1, 8-13, 58, 62 y 63).

Aunque en general se describe en la presente como un organismo microbiano que contiene un ruta de 4-HB, 4 -HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina, se entiende que la invención proporciona adicionalmente un organismo microbiano no natural que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una ruta de enzima de 4-HB, 4 -HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina o proteína expresada en una cantidad suficiente

para producir un intermedio de una ruta de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina. Por ejemplo, como se describe en la presente, las rutas de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO y putrescina se ejemplifican en las Figuras 1, 8-13, 58, 62 y 63. Por lo tanto, además de un organismo microbiano que contiene, por ejemplo, una ruta de BDO que produce BDO, la invención proporciona adicionalmente un organismo microbiano no natural que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO, donde el organismo microbiano produce un BDO ruta intermedia, tal como un producto en lugar de un intermedio de la ruta. En una modalidad ilustrativa, como se muestra en la Figura 62, por ejemplo, la invención proporciona un organismo microbiano que produce succinil-CoA, semialdehído succínico, 4-hidroxibutirato, 4-hidroxibutiril-fosfato, 4-CoA-hidroxibutirilo, o 4-hidroxibutanal como un producto, más que un intermedio. Otra forma de modalidad ilustrativa incluye, por ejemplo, un organismo microbiano que produce alfa-cetoglutarato, ácido 2,5-dioxopentanoico, el ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico, o 4-hidroxibutanal como un producto en lugar de un intermedio. Un ejemplo de modalidad en una ruta de putrescina incluye, por ejemplo, un organismo microbiano que produce glutamato, 4-aminobutirato, o 4-aminobutanal como un producto en lugar de un intermedio. Una modalidad alternativa en una ruta de putrescina puede ser, por ejemplo, un

organismo microbiano que produce 2,5-dioxopentanoato, 5-amino-2-oxopentanoato, u ornitina como un producto en lugar de un intermediario.

Se entiende que cualquiera de las rutas descritas en la presente, como se describe en los Ejemplos y ejemplificado en las Figuras, incluyendo las rutas de las Figuras 1, 8-13, 58, 62 y 63, pueden ser utilizados para generar un microbiana de origen no natural organismo que produce cualquier ruta intermedia o producto, según se desee. Como se describe en este documento, tal organismo microbiano que produce un intermedio se puede utilizar en combinación con otro organismo microbiano expresan enzimas corriente abajo de la ruta para producir un producto deseado. Sin embargo, se entiende que un organismo microbiano no natural que produce una ruta de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina intermedia puede ser utilizado para producir el intermedio como un producto deseado.

La invención se describe en la presente con referencia general a la reacción metabólica de reacción, o uno de sus productos, o con referencia específica a uno o más ácidos nucleicos o genes que codifican una enzima asociada con o catalizan la reacción metabólica, reactivo o producto a la que se hace referencia. A menos que se indique expresamente lo contrario en este documento, los expertos en la materia entenderán que la referencia a una reacción

también constituye referencia a los reactivos y los productos de la reacción. Del mismo modo, a menos que se indique lo contrario en este documento, la referencia a un reactivo o producto, también hace referencia a la reacción y la referencia que a cualquiera de estos metabólica constituye también hace referencia al gen o los genes que codifican las enzimas que catalizan la reacción se hace referencia, reactivo o producto. Asimismo, dado los campos bien conocidos de la bioquímica metabólica, enzimología y genómica, la referencia en la presente a un gen o ácido nucleico que codifica también constituye una referencia a la enzima codificada correspondiente y la reacción se cataliza así como los reactivos y productos de la reacción.

La producción de 4-HB a través de los modos biosintéticos utilizando los organismos microbianos de la invención es particularmente útil ya que puede producir monómero 4-HB. Los organismos microbianos que no son de origen natural de la invención y su biosíntesis de 4-HB y compuestos de la familia de BDO también son particularmente útiles debido a que el producto 4-HB puede ser (1) secretado, (2) puede ser desprovisto de cualquier derivatización como coenzima A; (3) evita cambios termodinámicos durante la biosíntesis; (4) permite la biosíntesis directa de BDO, y (5) permite la conversión química espontánea de 4-HB a γ-butirolactona (GBL) en medio de pH ácido. Esta última

característica es también particularmente útil para la síntesis química eficaz o la biosíntesis de compuestos de la familia BDO tales como 1,4-butanodiol y/o tetrahidrofurano (THF), por ejemplo.

Los organismos microbianos generalmente carecen de la capacidad para sintetizar 4-HB y por lo tanto, cualquiera de los compuestos descritos en este documento para estar dentro de la familia de los compuestos 1,4-butanodiol o conocidos por aquellos en la técnica para estar dentro de la familia de compuestos de 1,4-butanodiol. Además, los organismos que tengan todas las capacidades enzimáticas metabólicas requeridas no son conocidos para producir las enzimas 4-HB descritas y las rutas bioquímicas ejemplificadas en la presente. Más bien, con la posible excepción de unos pocos microorganismos anaerobios descritos más adelante, los microorganismos que tienen la capacidad enzimática para utilizar 4-HB como un sustrato para producir, por ejemplo, succinato. En contraste, los organismos microbianos no presentes en la naturaleza de la invención pueden generar 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO y/o putrescina como un producto. Como se describió anteriormente, la biosíntesis de 4-HB en su forma monomérica no sólo es particularmente útil en la síntesis química de la familia de compuestos de BDO, también permite la biosíntesis de compuestos de la familia de BDO y evita procedimientos de síntesis química total.

Los organismos microbianos que no son de origen natural de la invención que pueden producir 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO/o putrescina y son producidas por asegurar que un organismo microbiano huésped incluye capacidades funcionales para la síntesis bioquímica completa de al menos una ruta biosintética de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO y/o putrscina de la invención. Asegurando al menos un requisito de ruta biosintética de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA o BDO confiere la capacidad de biosíntesis de 4-HB en el organismo microbiano huésped.

Varias rutas biosintéticas de 4-HB están ejemplificadas en este documento y se muestran para fines de ilustración en la Figura 1. Las rutas 4-HB y BDO adicionales se describen en las Figuras 8-13. Una ruta biosintética 4-HB incluye la biosíntesis de succinato 4-HB (la ruta de succinato). Las enzimas que participan en esta ruta de 4-HB incluyen semialdehído succínico independiente de CoA deshidrogenasa y 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa. En esta ruta, el semialdehído succínico CoA- independiente deshidrogenasa cataliza la reacción inversa a la flecha mostrada en la Figura 1. Otra ruta biosintética de 4-HB incluye la biosíntesis de succinato a través de succinil-CoA (la ruta de succinil-CoA). Las enzimas que participan en esta ruta 4-HB incluyen succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico CoA-dependiente deshidrogenasa y 4-hidroxibutanoato

deshidrogenasa. Otras tres rutas biosintéticas 4-HB incluyen la biosíntesis de 4-HB de α-cetoglutarato (las rutas a-cetoglutarato). Por lo tanto, una tercera ruta biosintética de 4-HB es la biosíntesis de semialdehído succínico a través de glutamato: semialdehído succínico transaminasa, glutamato decarboxilasa y 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa. Una cuarta ruta biosintética de 4-HB también incluye la biosíntesis de 4-HB de α-cetoglutarato, pero utiliza α-cetoglutarato descarboxilasa para catalizar la síntesis de semialdehído succínico. 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa cataliza la conversión de semialdehído succínico a 4-HB. Una quinta ruta biosintética de 4-HB incluye la biosíntesis de α-cetoglutarato a través de succinil-CoA y utiliza α-cetoglutarato deshidrogenasa para producir succinil-CoA, que se cuela en la ruta de succinil-CoA descrita anteriormente. Cada una de estas rutas biosintéticas 4-HB, sus sustratos, reactivos y productos se describen más adelante en los Ejemplos. Como se describe en este documento, 4-HB adicional puede ser convertido biosintéticamente a BDO por la inclusión de enzimas adecuadas para producir BDO (véase el ejemplo). Así, se entiende que una ruta de 4-HB se puede utilizar con las enzimas para la conversión de 4-HB a BDO para generar una ruta de BDO.

Los organismos que no son de origen natural microbianos de la invención pueden ser producidos mediante la

introducción de ácidos nucleicos expresables que codifican una o más de las enzimas que participan en una o más de las rutas biosintéticas de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina. Dependiendo del organismo microbiano huésped elegido para la biosíntesis de los ácidos nucleicos para algunas o todas de una ruta biosintética 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina particular que puede ser expresado. Por ejemplo, si se desea un huésped elegido es deficiente en una o más enzimas en una ruta biosintética, por ejemplo, el succinato de ruta de 4-HB, a continuación, los ácidos nucleicos expresables para la enzima deficiente, por ejemplo, tanto el semialdehído succínico CoA-independiente deshidrogenasa como 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa en este ejemplo, se introduce en el huésped para la expresión exógena posterior. Alternativamente, si el huésped elegido exhibe expresión endógena de algunas enzimas de la ruta, pero es deficiente en otros, entonces un ácido nucleico que codifica se necesita para la enzima deficiente que logre biosíntesis de 4 -HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina. Por ejemplo, si el huésped elegido exhibe semialdehído succínico CoA-independiente deshidrogenasa endógena, pero es deficiente en 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, a continuación, es necesario un ácido nucleico que codifica esta enzima para lograr biosíntesis de 4-HB. Así, un organismo microbiano de origen no natural de la invención puede ser producida

mediante la introducción de actividades exógenas enzima o proteína para obtener una ruta biosintética deseada o una ruta biosintética deseada puede obtenerse mediante la introducción de una o más enzimas exógenas o actividades de proteínas que, junto con una o más enzimas endógenas o proteínas, produce un producto deseado, tal como 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO y/o putrescina.

De igual manera, cuando se selecciona biosíntesis de 4-HB que se produzca a través de ruta de succinato a succinil-CoA (la ruta de succinil-CoA), que codifica los ácidos nucleicos de las deficiencias en enzimas huésped de succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico y CoA-dependiente deshidrogenasa y/o hidroxibutanoato 4-deshidrogenasa se expresan exógenamente en el receptor huésped. Selección de 4-HB a través de la biosíntesis de α-cetoglutarato para ruta de semialdehído succínico (la ruta de α-cetoglutarato) puede utilizar la expresión exógena de las deficiencias huésped en una o más de las enzimas para glutamato: semialdehído succínico transaminasa, glutamato descarboxilasa y/o 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, o α-cetoglutarato descarboxilasa y 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente las enzimas de la ruta para la producción de 4-HB o BDO, como se describe en la presente.

Dependiendo de la ruta biosintética de 4-HB, 4-

HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina constituyentes de un organismo huésped microbiana seleccionada, los organismos microbianos no presentes en la naturaleza de la invención incluirán al menos una exógenamente expresado de la ruta ácido nucleico que codifica 4-HB, 4-HB, 4-HBCoA, BDO o putrescina y hasta todos los ácidos nucleicos que codifican una o más rutas biosintéticas de 4-HB o BDO. Por ejemplo, biosíntesis de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina puede establecerse en un huésped deficiente en una enzima de la ruta o proteínas a través de la expresión exógena del ácido nucleico de codificación correspondiente. En un huésped deficiente en todas las enzimas o proteínas de una ruta de 4-HB, HB-4, 4-HBCoA, BDO o putrescina, se pueden incluir la expresión exógena de toda la enzima o las proteínas en la ruta, aunque se entiende que todas las enzimas o proteínas de una ruta puede ser expresada incluso si el huésped contiene al menos una de las enzimas o proteínas de la ruta. Si se desea, la expresión exógena de todas las enzimas o proteínas en una ruta para la producción de 4-HB, HB-4, 4-HBCoA, BDO o putrescina pueden ser incluidas. Por ejemplo, la biosíntesis de 4-HB puede ser establecida a partir de las cinco rutas en un huésped deficiente en 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa a través de la expresión exógena de una 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa que codifica el ácido nucleico. En contraste, 4-HB se puede establecer la biosíntesis de las cinco rutas en

una gran deficiencia en las ocho enzimas a través de la expresión exógena de los ocho semialdehído succínico CoA-independiente deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico CoA- dependiente deshidrogenasa, el glutamato: semialdehído succínico transaminasas, glutamato descarboxilasa, α-cetoglutarato descarboxilasa, α-cetoglutarato deshidrogenasa y 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa.

Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionadas en este documento, los expertos en la materia entenderán que el número de ácidos nucleicos que codifica la introducción en una forma expresable, al menos, será paralela a las deficiencias de la ruta 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina del organismo huésped microbiano seleccionada. Por lo tanto, un organismo microbiano de origen no natural de la invención puede tener una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o hasta todos los ácidos nucleicos que codifican las enzimas descritas en este documento que constituyen uno o más las rutas biosintéticas de 4-HB, 4- HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina. En algunas modalidades, los organismos microbianos no presentes en la naturaleza también puede incluir otras modificaciones genéticas que facilitan u optimizan biosíntesis de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina o que confieren otras funciones útiles en el organismo microbiano huésped. Una otra

funcionalidad tal puede incluir, por ejemplo, el aumento de la síntesis de una o más de los precursores de la ruta 4-HB tales como succinato, succinil-CoA, α-cetoglutarato, 4-aminobutirato, glutamato, acetoacetil-CoA, y/o homoserina.

Generalmente, un organismo huésped microbiano se selecciona de tal manera que produce el precursor de una ruta de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina, ya sea como una molécula producida naturalmente o como un producto de ingeniería que, o bien proporciona de producción nueva de un precursor deseado o aumento de la producción de un precursor producida naturalmente por el organismo microbiano huésped. Por ejemplo, succinil-CoA, α-cetoglutarato, 4-aminobutirato, glutamato, acetoacetil-CoA, y homoserina se producen naturalmente en un organismo huésped tal como E. coli. Un organismo huésped puede ser diseñado para aumentar la producción de un precursor, tal como en la presente se describe. Además, un organismo microbiano que ha sido diseñado para producir un precursor deseado puede ser utilizado como un organismo huésped y además se trata por ingeniería genética para expresar enzimas o proteínas de una ruta 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina.

En algunas modalidades, un organismo microbiano de origen no natural de la invención se genera a partir de un huésped que contiene la capacidad enzimática para sintetizar 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina. En esta modalidad

específica, puede ser útil para aumentar la síntesis o la acumulación de una ruta de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina para productos, por ejemplo, la reacciones de la ruta de impulsión 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO putrescina o hacia la 4-HB, 4 -HBal, 4-HBCoA, BDO o la producción de putrescina. El aumento de la síntesis o la acumulación se pueden lograr, por ejemplo, la sobreexpresión de ácidos nucleicos que codifican una o más de las enzimas de rutas de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina descritas en la presente. Más de expresión de las enzimas de ruta 4-HB, 4 -HBal, 4-HBCoA, BDO o de putrescina o enzimas puede ocurrir, por ejemplo, a través de la expresión del gen exógenos o genes endógenos, o mediante la expresión exógena del gen o genes heterólogos. Por lo tanto, los organismos naturales pueden ser generados fácilmente para no ser, naturalmente, 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina producen organismos microbianos de la invención a través de la sobreexpresión de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis y así sucesivamente hasta que toda la codificación de los ácidos nucleicos o enzimas 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina biosintéticas. Además, un organismo de origen no natural puede ser generado por mutagénesis de un gen endógeno que se traduce en un aumento de la actividad de una enzima en la ruta biosintética 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina.

En modalidades particularmente útiles, se emplea la expresión exógena de los ácidos nucleicos que codifican. La expresión exógena confiere la capacidad de personalizar la expresión y/o elementos reguladores en el huésped y la aplicación para lograr un nivel de expresión deseado que es controlado por el usuario. Sin embargo, la expresión endógena también puede ser utilizada en otras modalidades, tales como mediante la eliminación de una inducción negativa regulador efector o de promotor del gen cuando está vinculado a un promotor inducible o otro elemento regulador. De esta manera, un gen endógeno que tiene un promotor inducible de origen natural puede ser regulado hasta proporcionar el agente inductor apropiado, o la región reguladora de un gen endógeno puede ser diseñado para incorporar un elemento regulador inducible, permitiendo así la regulación de la expresión aumentada de un gen endógeno en un momento deseado. De manera similar, un promotor inducible puede ser incluido como un elemento regulador de un gen exógeno introducido en un organismo microbiano de origen no natural (véanse los ejemplos).

"Exógeno" como se usa en la presente pretende significar que la molécula de referencia o la actividad referenciada se introducen en el organismo microbiano huésped. La molécula puede ser introducida, por ejemplo, mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica en

el material huésped genética tal como mediante la integración en un cromosoma del huésped o como material genético no cromosómico tal como un plásmido. Por lo tanto, el término tal como se utiliza en referencia a la expresión de un ácido nucleico que codifica se refiere a la introducción del ácido nucleico que codifica en una forma expresable en el organismo microbiano. Cuando se usa en referencia a una actividad biosintética, el término se refiere a una actividad que se introduce en el organismo huésped de referencia. La fuente puede ser, por ejemplo, un ácido homólogo o heterólogo que codifica ácido nucleico que expresa la introducción actividad referenciada siguiendo en el organismo microbiano huésped. Por lo tanto, el término "endógeno" se refiere a una molécula de referencia o actividad que está presente en el huésped. Asimismo, el término cuando se usa en referencia a la expresión de un ácido nucleico que codifica se refiere a la expresión de un ácido nucleico que codifica contenido dentro del organismo microbiano. El término "heteróloga" se refiere a una molécula o actividad derivada de una fuente distinta de la especie de referencia, mientras que "homólogo" se refiere a una molécula o derivado de la actividad del organismo microbiano huésped. Por consiguiente, la expresión exógena de un ácido nucleico que codifica la invención puede utilizar uno o ambos un ácido nucleico de codificación heteróloga u homóloga.

Se entiende que cuando más de un ácido nucleico exógeno está incluido en un organismo microbiano que de los más de uno ácidos nucleicos exógenos se refiere al ácido nucleico que codifica referenciada o actividad biosintética, como se discutió anteriormente. Se entiende, además, como se describe en este documento, que más de un tales ácidos nucleicos exógenos pueden ser introducidos en el organismo microbiano huésped en moléculas de ácidos nucleicos separadas, en moléculas de ácido nucleico policistronicas, o una combinación de los mismos y todavía se considera como algo más que una ácido nucleico exógeno. Por ejemplo, como se describe en la presente un organismo microbiano puede ser diseñado para expresar dos o más ácidos nucleicos exógenos que codifican una enzima o proteína de la ruta deseada. En el caso en que dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una actividad deseada se introduce en un organismo huésped microbiano, se entiende que los dos ácidos nucleicos exógenos pueden ser introducidos como un único ácido nucleico, por ejemplo, en un único plásmido, en plásmidos separados, se puede integrar en el cromosoma del huésped en un solo sitio o varios sitios y todavía ser considerado como dos ácidos nucleicos exógenos. De manera similar, se entiende que más de dos ácidos nucleicos exógenos pueden ser introducidos en un organismo huésped en cualquier combinación deseada, por ejemplo, en un único plásmido, en plásmidos separados, se

pueden integrar en el cromosoma del huésped en un solo sitio o varios sitios y todavía ser considerados como dos o más ácidos nucleicos exógenos, por ejemplo tres ácidos nucleicos exógenos. Así, el número de referencia de ácidos nucleicos exógenos o actividades biosintéticas se refiere al número de codificación de ácidos nucleicos o el número de actividades no biosintéticas, el número de distintos ácidos nucleicos introducidos en el organismo huésped.

Las fuentes de ácidos nucleicos que codifican una enzima de ruta de 4-HB, 4 -HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de las especies donde el producto del gen codificado es capaz de catalizar la reacción a la que se hace referencia. Estas especies incluyen tanto los organismos procariotas como eucariotas, incluyendo pero no limitado a, bacterias, arqueas y eubacterias incluidas, y eucariotes, incluidas las levaduras, plantas, insectos, animales y especies de mamíferos, incluyendo seres humanos. Las especies ilustrativas para tales fuentes incluyen, por ejemplo, Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces kluyveri, Clostridium kluyveri, Clostridium acetobutylicum, Clostridium beijerinckii, Clostridium saccharoperbutylacetonicum, Clostridium perfringens, Clostridium difficile, Clostridium botulinum, Clostridium tyrobutyricum, Clostridium tetanomorphum, Clostridium tetani, Clostridium propionicum, Clostridium

aminobutyricum, Clostridium subterminale, Clostridium sticklandii, Ralstonia eutropha, Mycobacterium bovis, Mycobacterium tuberculosis, Porphyromonas gingivalis, Arabidopsis thaliana, Thermus thermophilus, especies de Pseudomonas, incluyendo Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas fluorescens, el Homo sapiens, Oryctolagus cuniculus, Rhodobacter spaeroides, Thermoanaerobacter brockii, Metallosphaera sedula, Leuconostoc mesenteroides, Chloroflexus aurantiacus, Roseiflexus castenholzii, Erythrobacter, Simmondsia chinensis, Acinetobacter spp., incluyendo Acinetobacter calcoaceticus y Acinetobacter baylyi, Porphyromonas gingivalis, Sulfolobus tokodaii, Sulfolobus solfataricus, Sulfolobus acidocaldarius, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus megaterium, Bacillus brevis, Bacillus pumilus, Rattus norvegicus, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Euglena gracilis, Treponema denticola, Moorella thermoacetica, Thermotoga maritima, Halobacterium salinarum, Geobacillus stearothermophilus, Aeropyrum pernix, Sus scrofa, Caenorhabditis elegans, Corynebacterium glutamicum, Acidaminococcus fermentans, Lactococcus lactis, Lactobacillus plantarum, Streptococcus thermophilus, Enterobacter aerogenes, Cándida, Aspergillus terreus, Pedicoccus pentosaceus, Zymomonas mobilus, Acetobacter pasteurians, Kluyveromyces lactis, Eubacterium barkeri, Bacteroides

capillosus, Anaerotruncus colihominis, Natranaerobius thermophilusm, Campylobacter jejuni, Haemophilus influenzae, Serratia marcescens, Citrobacter amalonaticus, Myxococcus xanthus, Fusobacterium nuleatum, Penicillium chrysogenum, marinos gamma proteobacteria, bacteria productora de butirato, Nocardia iowensis, Nocardia farcinica, Streptomyces griseus, Schizosaccharomyces pombe, Geobacillus thermoglucosidasius, Salmonella typhimurium, Vibrio cholera, Helicobacter pylori, Nicotiana tabacum, Oryza sativa, Haloferax mediterranei, Agrobacterium tumefaciens, Achromobacter denitrificans, Fusobacterium nucleatum, Streptomyces clavuligenus, Acinetobacter baumanii, Mus musculus, Lachancea kluyveri, Trichomonas vaginalis, Trypanosoma brucei, Pseudomonas stutzeri, Bradyrhizobium japonicum, Mesorhizobium loti, Bos taurus, Nicotiana glutinosa, Vibrio vulnificus, Selenomonas ruminantium, Vibrio parahaemolyticus, Archaeoglobus julgidus, Haloarcula marismortui, Pyrobaculum aerophilum, Mycobacterium smegmatis MC2 155, Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis K-10, Mycobacterium marinum M, DSM 20162 Tsukamurella paurometabola, Cyanobium PCC7001, Dictyostelium discoideum AX4, y otros descritos en este documento (ver ejemplos). Por ejemplo, los organismos microbianos que tienen 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o producción putrescina biosintética se ejemplifica en la presente con referencia a E. coli y

huéspedes de levadura. Sin embargo, con la secuencia completa del genoma, ahora disponible para más de 550 especies (más de la mitad de estos disponibles en bases de datos públicas, como la Revista), incluyendo 395 genomas de microorganismos y una gran variedad de levaduras, hongos, plantas, y los genomas de mamíferos, el identificación de los genes que codifican el requisito 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o actividad putrescina biosintética para uno o más genes en especies relacionadas o distante, incluyendo por ejemplo, homólogos, ortólogos, parálogos y desplazamientos no ortólogo de genes de genes conocidos y el intercambio de alteraciones genéticas entre organismos es rutinaria y bien conocidos en la técnica. En consecuencia, las alteraciones metabólicas que permiten la biosíntesis de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina y otros compuestos de la invención descrita en la presente con referencia a un organismo particular, tales como E. coli o levaduras pueden aplicarse fácilmente a otro microorganismos, incluidos los organismos procariotas y eucariotas por igual. Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionada en este documento, los expertos en la técnica sabrá que una alteración metabólica se ejemplifica en un organismo puede ser aplicado igualmente a otros organismos.

En algunos casos, como cuando una alternativa 4-HB, 4-HBal, BDO o ruta biosintética putrescina existe en una especie no relacionados, 4-HB, 4-HBal, BDO o biosíntesis de

putrescina puede ser conferido a la especie huésped, por ejemplo, la expresión exógena de un paralog o parálogos de las especies no relacionadas, que cataliza una similar, pero no idéntica reacción metabólica para reemplaleatoria la reacción se hace referencia. Debido a ciertas diferencias entre las redes metabólicas existir entre diferentes organismos, los expertos en la materia entenderán que el uso real de genes entre diferentes organismos puede ser diferente. Sin embargo, dadas las enseñanzas y la guía proporcionada en este documento, los expertos en la técnica comprenderá también que las enseñanzas y métodos de la invención se puede aplicar a todos los organismos microbianos utilizando las alteraciones metabólicas afines a los en la presente ejemplificado para construir un organismo microbiano en una especie de interés que sintetizar 4-HB, como monómero 4-HB, 4-HBal, BDO o putrescina.

Los organismos hospedadores microbianos pueden ser seleccionados a partir de, y los microorganismos de origen no natural microbianos generan en, por ejemplo, bacterias, levaduras, hongos o cualquiera de una variedad de otros microorganismos aplicables a procesos de fermentación. Bacterias ilustrativaes incluyen determinadas especies de Escherichia coli, Klebsiella oxytoca, Anaerobispirilum succiniciproducens, Actinobacillus succinogenes, Mannheimia succiniciproducens, Rhizobium etli, Bacillus subtilis,

Corynebacterium glutamicum, Gluconobacter oxydans, Zymomonas mobilis, Lactococcus lactis, Lactobacillus plantarum, Streptomyces coelicolor, Clostridium acetobutylicum, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida. Ejemplos de levaduras u hongos incluyen especies seleccionadas de Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe y Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces marxianus, Aspergillus terreus, Aspergillus niger, Pichia pastoris, Rhizopus arrhizus, Rhizopus oryzae, y similares. E. coli es un organismos huésped particularmente útiles, ya que es un organismo microbiano bien caracterizado adecuado para la ingeniería genética. Otros organismos huésped particularmente útiles incluyen levaduras tales como Saccharomyces cerevisiae. Se entiende que cualquier organismo microbiano huésped adecuado se puede utilizar para introducir modificaciones metabólicas y/o genéticas para producir un producto deseado.

Los métodos para construir y probar los niveles de expresión de un huésped de origen no natural que produce 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO, o putrescina se puede llevar a cabo, por ejemplo, por métodos recombinantes y de detección conocidos en la técnica. Tales métodos se pueden encontrar descritos en, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001), Ausubel y otros,

Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999). 4-HB y GBL puede separarse, por ejemplo, mediante HPLC utilizando una columna Spherisorb ODS 5 l y una fase móvil de 70% 10 mM de solución reguladora de fosfato (pH = 7) y 30% de metanol y se detecta mediante un detector UV a 215 nm (Hennessy et al 2004, J. Forense Sci. 46 (6):. 1-9). BDO es detectado por el gas de cromatografía o por HPLC y detector de índice de refracción usando un Aminex HPX-87H de la columna y una fase móvil de 0.5 mM de ácido sulfúrico (González-Pajuelo et al., Met. Eng. 7:329-336 (2005)).

Las secuencias exógenas de ácidos nucleicos que participan en una ruta para la producción de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina puede ser introducido de manera estable o transitoriamente en una célula huésped mediante técnicas bien conocidas en la técnica, incluyendo, pero no se limitan a, conjugación, electroporación, transformación química, transducción, transfección y transformación de ultrasonido. Para la expresión en E. coli exógeno u otras células procariotas, algunas secuencias de ácidos nucleicos en los genes o cDNAs de eucariotas ácidos nucleicos puede codificar señales de orientación como una señal N-terminal mitocondrial o de otro objetivo, que puede ser retirado antes de la transformación en huésped procariótico las células, si se desea. Por ejemplo, la eliminación de una secuencia líder

mitocondrial condujo a una mayor expresión en E. coli (Hoffmeister y col. J. Biol. Chem. 280:4329-4338 (2005)). Para la expresión en levadura exógena o de otras células eucariotas, los genes se pueden expresar en el citosol sin la adición de la secuencia líder, o pueden ser dirigidos a mitocondrias o otros orgánulos, o dirigidos para la secreción, mediante la adición de una secuencia adecuada de enfoque como una orientación mitocondrial o la secreción de señal adecuado para las células huésped. Así, se entiende que las modificaciones apropiadas a una secuencia de ácido nucleico de suprimir o incluir una secuencia objetivo puede ser incorporado en una secuencia de ácido nucleico exógeno para impartir propiedades convenientes. Además, los genes pueden ser sometidos a la optimización codón con técnicas bien conocidas en la técnica para lograr la expresión óptima de las proteínas.

Un vector de expresión o vectores pueden ser construidos a puerto una o más rutas biosintéticas de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina y/o uno o más ácidos nucleicos de codificación biosintética como se ejemplifica en la presente unida operativamente a secuencias de control de la expresión funcional en el organismo huésped. Los vectores de expresión aplicables para su uso en los organismos huésped microbianos de la invención incluyen, por ejemplo, plásmidos, vectores de fagos, vectores virales, episomas y cromosomas

artificiales, incluyendo los vectores y las secuencias de selección o marcadores operables para la integración estable en un cromosoma del huésped. Además, los vectores de expresión pueden incluir uno o más genes marcadores seleccionables y secuencias apropiadas de control de expresión. Los genes marcadores seleccionables también pueden incluirse, por ejemplo, proporcionando resistencia a los antibióticos o toxinas, complementar deficiencias auxotróficas, o suministrar nutrientes no críticos en los medios de cultivo. Las secuencias de control de la expresión pueden incluir promotores constitutivos e inducibles, potenciadores de transcripción, terminadores de transcripción y similares que son bien conocidos en la técnica. Cuando dos o más ácidos nucleicos exógenos de codificación deben ser co-expresados, se pueden insertar ácidos nucleicos, por ejemplo, en un vector de expresión único o en vectores de expresión separados. Para la expresión de solo vector, los ácidos nucleicos de codificación pueden ser operativamente ligados a una secuencia común de control de expresión o ligados a diferentes secuencias de control de la expresión, tales como un promotor inducible y un promotor constitutivo. La transformación de secuencias de ácidos nucleicos exógenos que intervienen en una ruta metabólica o sintética se puede confirmar mediante métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, por ejemplo, análisis de ácidos

nucleicos, tales como transferencias Northern o una reacción en cadena de polimerasa (PCR) de ARNm, o inmunotransferencia para la expresión de productos génicos, u otros métodos analíticos adecuados para probar la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos introducidos o su producto del gen correspondiente. Se entiende por los expertos en la técnica que el ácido nucleico exógeno se expresa en una cantidad suficiente para producir el producto deseado, y se entiende además que los niveles de expresión puede ser optimizado para obtener una expresión suficiente usando métodos bien conocidos en la técnica y como se describe en la presente.

Los organismos microbianos que no son de origen natural de la invención se construyen utilizando métodos bien conocidos en la técnica como se ejemplifica en la presente para expresar exógenamente por lo menos un ácido nucleico que codifica una enzima de ruta de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina en cantidades suficientes para producir 4-HB, tales como monómero 4-HB, 4-HBal, 4-HBCo, BDO o putrescina. Se entiende que los organismos microbianos de la invención se siembran bajo condiciones suficientes para producir 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina. Ejemplos de los niveles de expresión para enzimas de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina en cada ruta se describen más adelante en los Ejemplos. Siguiendo las enseñanzas y la orientación

proporcionada en este documento, los organismos microbianos no presentes en la naturaleza de la invención puede lograr la biosíntesis de 4-HB, tales como monómero 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina dando como resultado concentraciones intracelulares entre aproximadamente 0.1-200 mm o más, por ejemplo, 0.1-25 mm o más. Generalmente, la concentración intracelular de 4-HB, tales como monómero 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina es de entre aproximadamente 3-150 mm o más, particularmente sobre 5-125 mm o más, y más particularmente entre aproximadamente 8-100 mM, por ejemplo, alrededor de 3-20mM, particularmente entre aproximadamente 5-15 mM y más particularmente entre aproximadamente 8-12 mM, incluyendo aproximadamente 10 mM, 20 mM, 50 mM, 80 mM o más. Las concentraciones intracelulares entre y por encima de cada uno de estos intervalos ilustrativaes también pueden lograrse a partir de los organismos microbianos no presentes en la naturaleza de la invención. En modalidades particulares, los organismos microbianos de la invención, en particular cepas tales como las descritas en la presente (ver Ejemplos XII-XIX y en la Tabla 28), pueden proporcionar una producción mejorada de un producto deseado, tal como 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina mediante el aumento de la producción de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina y/o disminuyendo subproductos inconvenientes. Tales niveles de producción incluyen, pero no se limitan a, las descritas en la presente

y que incluyen desde aproximadamente 1 gramo a aproximadamente 25 gramos por litro, por ejemplo aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o incluso mayores cantidades de producto por litro.

Además del cultivo y condiciones de fermentación descritas en la presente, la condición de crecimiento para lograr la biosíntesis de BDO, 4-HB, 4-HBCoA, 4-HBal y/o putrescina puede incluir la adición de un osmoprotector a las condiciones de cultivo. En ciertas modalidades, los organismos microbianos no presentes en la naturaleza de la invención pueden ser sostenidos, cultivados o fermentados como se describe en la presente en presencia de un osmoprotector. Brevemente, una osmoprotector se refiere a un compuesto que actúa como un osmolito y ayuda a un organismo microbiano como se describe en la presente sobreviven al estrés osmótico. Los osmoprotectores incluyen, pero no se limitan a, betaínas, aminoácidos y la azúcar trehalosa. Los ejemplos no limitantes de los mismos son glicina betaína, betaína pralina, dimetiltetina, dimetilslfoniopropionato, 3-dimetilsulfonio-2-metilproprionato, ácido pipecólico, dimetilsulfonioacetato, colina, L-carnitina y ectoína. En un aspecto, el osmoprotector es la glicina betaína. Se entiende que un experto en la técnica que la cantidad y tipo de osmoprotector adecuado para la protección de un organismo

microbiano se describe en la presente a partir de estrés osmótico dependerá del organismo microbiano que se utilice. La cantidad de osmoprotector en las condiciones de cultivo puede ser, por ejemplo, no más de aproximadamente 0.1 mM, no más de aproximadamente 0.5 mM, no más de aproximadamente 1.0 mM, no más de aproximadamente 1.5 mM, no más de aproximadamente 2.0 mm, sin más de aproximadamente 2.5 mM, no más de aproximadamente 3.0 mM, no más de aproximadamente 5.0 mM, no más de aproximadamente 7.0 mM, no más de aproximadamente lOmM, no más de aproximadamente 50 mM, no más de aproximadamente lOOmM o no más de aproximadamente 500 mM .

En algunas modalidades, las condiciones de cultivo incluyen el crecimiento anaerobio o sustancialmente anaerobio o las condiciones de mantenimiento. Los ejemplos de condiciones anaeróbicas se han descrito anteriormente y son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de condiciones anaeróbicas para los procesos de fermentación se describen en este documento y se describen, por ejemplo, en publicación de E.U.A. 2009/0047719, presentada el 10 de agosto de 2007. Cualquiera de estas condiciones se puede emplear con los organismos microbianos no presentes en la naturaleza, así como otras condiciones anaerobias bien conocidos en la técnica. Bajo tales condiciones anaerobias o sustancialmente anaerobias, los productores de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina pueden sintetizar 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o

putrescina a concentraciones intracelulares de 5-10 mM o más, así como todas las demás concentraciones ejemplificadas en la presente. Se entiende que, aunque la descripción anterior se refiere a las concentraciones intracelulares, 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina producen organismos microbianos que pueden producir 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina intracelularmente y/o secretan el producto en el medio de cultivo.

Las condiciones de cultivo pueden incluir, por ejemplo, los procedimientos de cultivo líquidos, así como otros procedimientos de fermentación y grandes de cultivo a gran escala. Como se describe en este documento, los rendimientos particularmente útiles de los productos biosintéticos de la invención puede obtenerse bajo condiciones de cultivo anaeróbicas o sustancialmente anaeróbicas.

Como se describe en este documento, una condición de crecimiento ilustrativa para el logro de la biosíntesis de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina incluyen condiciones de cultivo anaerobio o fermentación. En ciertas modalidades, los organismos microbianos no presentes en la naturaleza de la invención pueden ser sostenidos, cultivados o fermentados en condiciones anaerobias o sustancialmente anaeróbicas. Brevemente, las condiciones anaeróbicas se refieren a un ambiente exento de oxígeno. Las condiciones sustancialmente

anaeróbicas incluyen, por ejemplo, un cultivo, la fermentación por lotes o fermentación continúa de tal manera que la concentración de oxígeno disuelto en el medio se mantiene entre 0 y 10% de saturación. Las condiciones sustancialmente anaerobias también incluyen el cultivo o las células en reposo en un medio líquido o en agar sólido dentro de una cámara sellada que se mantiene con una atmósfera de oxígeno inferior al 1%. El porcentaje de oxígeno puede ser mantenido, por ejemplo, rociando el cultivo con una mezcla N_2/CO_2 o de otro modo, no oxígeno del gas o los gases.

La invención también proporciona un biocatalizador de origen no natural microbiana incluyendo un organismo microbiano que tiene rutas biosintéticas de ácido 4-hidroxibutanoico (4-HB) y 1,4-butanodiol (BDO) que incluyen al menos un ácido nucleico que codifica exógeno 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, CoA deshidrogenasa independiente de semialdehído succínico, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico CoA- dependiente deshidrogenasa, 4-hidroxibutirato: CoA transferasa, el glutamato: semialdehído succínico transaminasa, glutamato decarboxilasa, aldehído CoA-independiente deshidrogenasa, aldehído CoA-dependiente deshidrogenasa o alcohol deshidrogenasa, donde el ácido nucleico exógeno se expresa en cantidades suficientes para producir 1,4-butanodiol (BDO). 4-hidroxibutirato: CoA transferasa también es conocida como 4-

hidroxibutiril CoA: acetil-CoA transferasa. Las enzimas adicionales de la ruta 4-HB o BDO también se describen en este documento (ver ejemplos y Figuras 8-13).

La invención proporciona además biocatalizador microbiano no natural incluyendo un organismo microbiano que tiene rutas biosintéticas de ácido 4-hidroxibutanoico (4-HB) y 1,4-butanodiol (BDO), las rutas incluyen al menos un ácido nucleico que codifica 4 - hidroxibutanoato deshidrogenasa exógeno, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico CoA-dependiente deshidrogenasa, 4-hidroxibutirato: CoA transferasa, 4-butirato cinasa, fosfotransbutirilasa, α-cetoglutarato descarboxilasa, aldehído deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa o un aldehído/alcohol deshidrogenasa, en donde el ácido nucleico exógeno es expresado en cantidades suficientes para producir 1,4-butanodiol (BDO).

Los organismos microbianos no naturales también se pueden generar por biosíntesis de BDO. Al igual que con el 4-HB producen organismos microbianos de la invención, los productores de organismos microbianos de BDO también pueden producirse intracelular o secretamente a BDO en el medio de cultivo. Siguiendo las enseñanzas y la orientación proporcionada anteriormente para la construcción de los organismos microbianos que sintetizan 4-HB, las rutas adicionales de BDO se pueden incorporar en el 4-HB producen organismos microbianos para generar organismos que también

sintetizan BDO y otros compuestos de la familia de BDO. La síntesis química de BDO y sus productos intermedios son conocidos. Los organismos microbianos que no son de origen natural de la invención capaces de eludir la biosíntesis de BDO de esta síntesis química utilizando 4-HB como un punto de entrada como se ilustra en la Figura 1. Como se describe más adelante, los productores de 4-HB también se pueden utilizar para convertir químicamente 4-HB a GBL y luego a BDO o THF, por ejemplo. Alternativamente, los productores de 4-HB pueden ser modificados para incluir capacidades biosintéticos para la conversión de 4-HB y/o GBL a BDO.

Las rutas adicionales BDO para introducirse en productores de 4-HB incluyen, por ejemplo, la expresión exógena en un fondo de huésped deficiente o la sobreexpresión de una o más de las enzimas ejemplificadas en la Figura 1 como pasos 9-13. Una ruta del ejemplo se incluyen, por ejemplo, actividades de la enzima necesarias para llevar a cabo las reacciones mostradas como pasos 9, 12 y 13 en la Figura 1, donde las aldehído y alcohol deshidrogenasas pueden ser enzimas separadas o una enzima multifuncional que tiene tanto aldehído como la actividad de la alcohol deshidrogenasa. Otra ruta tal incluye, por ejemplo, las actividades enzimáticas necesarias para llevar a cabo las reacciones mostradas como los pasos 10, 11, 12 y 13 en la Figura 1, también cuando las aldehído y alcohol

deshidrogenasas pueden ser enzimas separadas o una enzima multifuncional que tiene tanto actividad de aldehído y alcohol deshidrogenasa. En consecuencia, las rutas adicionales BDO se introducen en productores 4-HB incluyen, por ejemplo, la expresión exógena en un fondo huésped deficiente o la sobreexpresión de una o más de un 4-hidroxibutirato: CoA transferasa, butirato cinasa, fosfotransbutirilasa, aldehído CoA-independiente deshidrogenasa, aldehído CoA- dependiente deshidrogenasa o un alcohol deshidrogenasa. En ausencia de acil-CoA sintetasa endógeno capaz de modificar 4-HB, los de origen no natural BDO productoras organismos microbianos que pueden incluir además un exógeno acil-CoA sintetasa selectivo para 4-HB, o la combinación de múltiples enzimas que tienen como una conversión reacción neta de 4-HB en 4-HB-CoA. Como se ejemplifica más adelante en los Ejemplos, actividad de la ruta de BDO de butirato de cinasa y exhibición fosfotransbutirilasa y catalizan las conversiones como se ilustra en la Figura 1 con un sustrato 4-HB. Por lo tanto, estas enzimas también pueden ser denominadas en la presente como 4-hidroxibutirato cinasa y fosfotranshidroxibutirilasa respectivamente.

Ejemplos de alcohol deshidrogenasa y aldehído que pueden ser utilizados para estas conversiones en vivo a partir de 4-HB a BDO se enumeran a continuación en la Tabla 1.

ALCOHOL DESHIDROGENASAS

ec:1.1.1.1	alcohol deshidrogenasa
ec:1.1.1.2	alcohol deshidrogenasa (NADP+)
ec:1.1.1.4	(R,R)-butanodiol deshidrogenasa
ec:1.1.1.5	acetoina deshidrogenasa
ec:1.1.1.6	glicerol deshidrogenasa
ec:1.1.1.7	propanodiol-fosfato deshidrogenasa
ec:1.1.1.8	glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (NAD+)
ec:1.1.1.11	D-arabinitol 4-deshidrogenasa
ec:1.1.1.12	L-arabinitol 4-deshidrogenasa
ec:1.1.1.13	L-arabinitol 2-deshidrogenasa
ec:1.1.1.14	L-iditol-2-deshidrogenasa
ec:1.1.1.15	D-iditol-2-deshidrogenasa
ec:1.1.1.16	galactitol 2-deshidrogenasa
ec:1.1.1.17	manitol-1-fosfato 5-deshidrogenasa
ec:1.1.1.18	inositol-2 deshidrogenasa
ec:1.1.1.21	aldehído reductasa
ec:1.1.1.23	histidinol deshidrogenasa
cc:1.1.1.26	glioxilato reductasa
ec:1.1.1.27	L-lactato deshidrogenasa
ec:1.1.1.28	D-lactato deshidrogenasa
ec:1.1.1.29	glicerato deshidrogenasa
ec:1.1.1.30	3-hidroxibutirato deshidrogenasa
ec:1.1.1.31	3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa
ec:1.1.1.35	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa
ec:1.1.1.36	acetoacetil-CoA reductasa
ec:1.1.1.37	malato deshidrogenasa
ec:1.1.1.38	malato deshidrogenasa (oxaloacetato-descarboxilación)
ec:1.1.1.39	malato deshidrogenasa (descarboxilación)
ec:1.1.1.40	malato deshidrogenasa (oxaloacetato-descarboxilación) (NADP+)
ec:1.1.1.41	isocitrato deshidrogenasa (NAD+)
ec:1.1.1.42	isocitrato deshidrogenasa (NADP+)
ec:1.1.1.54	alil-alcohol deshidrogenasa
ec:1.1.1.55	lactaldehído reductasa (NADF)
ec:1.1.1.56	ribitol-2-deshidrogenasa
ec:1.1.1.59	3-hidroxipropionato deshidrogenasa
ec:1.1.1.60	2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa
ec:1.1.1.61	4-hidroxibutirato deshidrogenasa
ec:1.1.1.66	omega-hidroxidecanoato deshidrogenasa
ec:1.1.1.67	manitol 2-deshidrogenasa
ec:1.1.1.71	alcohol deshidrogenasa [NAD(P)+]
ec:1.1.1.72	glicerol deshidrogenasa (NADP+)
ec:1.1.1.73	octanol deshidrogenasa
ec:1.1.1.75	(R)-aminopropanol deshidrogenasa
ec:1.1.1.76	(S,S)-butanediol deshidrogenasa
ec:1.1.1.77	lactaldehído reductasa metilglioxal
ec:1.1.1.78	reductasa (dependiente de NADH)
ec:1.1.1.79	glioxilato reductasa (NADP+)
ec:1.1.1.80	isopropanol deshidrogenasa (NADP+)
ec:1.1.1.81	hidroxipiruvato reductasa
ec:1.1.1.82	malato deshidrogenasa (NADP+)
ec:1.1.1.83	D-malato deshidrogenasa (descarboxilación)
ec:1.1.1.84	dimetilmalato deshidrogenasa
ec:1.1.1.85	3-isopropilmalato deshidrogenasa
ec:1.1.1.86	acido cetol reductoisomerasa
ec:1.1.1.87	homoisocitrato deshidrogenasa
ec:1.1.1.88	hidroximetilglutaril-CoA reductasa
ec:1.1.1.90	alcohol arílico deshidrogenasa
ec:1.1.1.91	alcohol arílico deshidrogenasa (NADP+)
ec:1.1.1.92	oxaloglicolato reductasa (descarboxilación)
ec:1.1.1.94	glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [NAD(P)+]
ec:1.1.1.95	fosfoglicerato deshidrogenasa
ec:1.1.1.97	alcohol 3-hidroxibencílico deshidrogenasa
ec:1.1.1.101	acilglicerona-fosfato reductasa
ec:1.1.1.103	L-treonina 3-deshidrogenasa
ec:1.1.1.104	4-oxoprolina reductasa
ec:1.1.1.105	retinol deshidrogenasa
cc:1.1.1.110	indolclactato deshidrogenasa
ec:1.1.1.112	indanol deshidrogenasa
ec:1.1.1.113	L-xilosa 1-deshidrogenasa
ec:1.1.1.129	L-treonato 3-deshidrogenasa
ec:1.1.1.137	ribitol-5-fosfato 2-deshidrogenasa
ec:1.1.1.138	manitol2-deshidrogenasa (NADP+)
ec:1.1.1.140	sorbitol-6-fosfato 2-deshidrogenasa
ec:1.1.1.142	D-pinitol deshidrogenasa
ec:1.1.1.143	sequoitol deshidrogenasa
ec:1.1.1.144	perilil-alcohol deshidrogenasa
ec:1.1.1.156	glicerol 2-deshidrogenasa (NADP+)
ec:1.1.1.157	3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa
ec:1.1.1.163	ciclopentanol deshidrogenasa
ec:1.1.1.164	hexadecanol deshidrogenasa
ec:1.1.1.165	2-alquin-1-ol deshidrogenasa
ec:1.1.1.166	hidroxiciclohexanocarboxilato deshidrogenasa
ec:1.1.1.167	hidroximalonato deshidrogenasa
ec:1.1.1.174	ciclohexano-1,2-diol deshidrogenasa
ec:1.1.1.177	glicerol-3-fosfato 1-deshidrogenasa (NADP+)
ec:1.1.1.178	3-hidroxi-2-metilbutiril-CoA deshidrogenasa
ec:1.1.1.185	L-glicol deshidrogenasa
ec:1.1.1.190	indol-3-acetaldehído reductasa (NADH)
ec:1.1.1.191	indol-3-acetaldehído reductasa (NADF)
ec:1.1.1.192	alcohol de cadena larga deshidrogenasa
ec:1.1.1.194	coniferil-alcohol deshidrogenasa
ec:1.1.1.195	cinamil-alcohol deshidrogenasa
ec:1.1.1.198	(+)-borneol deshidrogenasa
ec:1.1.1.202	1,3-propanediol deshidrogenasa
ec:1.1.1.207	(-)-mentol deshidrogenasa

ec:1.1.1.208 (+)-neomentol deshidrogenasa
ec:1.1.1.216 farnesol deshidrogenasa
ec:1.1.1.217 bencil-2-metil-hidroxibutirato deshidrogenasa
ec:1.1.1.222 (R)-4-hidroxifenilactato deshidrogenasa
ec:1.1.1.223 isopiperitenol deshidrogenasa
ec:1.1.1.226 4-hidroxiciclohexanocarboxilato deshidrogenasa
ec:1.1.1.229 dietil 2-metil-3-oxosuccinato reductasa
ec:1.1.1.237 hidroxifenilpiruvato reductasa
ec:1.1.1.244 metanol deshidrogenasa
ec:1.1.1.245 ciclohexanol deshidrogenasa
ec:1.1.1.250 D-arabinitol 2-deshidrogenasa
ec:1.1.1.251 galactitol 1-fosfato 5-deshidrogenasa
ec:1.1.1.255 manitol deshidrogenasa
ec:1.1.1.256 fluoren-9-ol deshidrogenasa
ec:1.1.1.257 4-(hidroximetil)bencen-sulfonato deshidrogenasa
ec:1.1.1.258 6-hidroxihexanoato deshidrogenasa
ec:1.1.1.259 3-hidroxipimeloil-CoA deshidrogenasa
ec:1.1.1.261 glicerol-1-fosfato deshidrogenasa [NAD(P)+]
ec:1.1.1.265 3-metilbutanal reductasa
ec:1.1.1.283 metilglioxal reductasa (NADF-dependent)
ec:1.1.1.286 isocitrato-homoisocitrato deshidrogenasa
ec:1.1.1.287 D-arabinitol deshidrogenasa (NADP+)
butanol deshidrogenasa

ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS

ec:1.2.1.2 formato deshidrogenasa
ec:1.2.1.3 aldehído deshidrogenasa (NAD+)
ec:1.2.1.4 aldehído deshidrogenasa (NADP+)
ec:1.2.1.5 aldehído deshidrogenasa [NAD(P)+]
ec:1.2.1.7 benzaldehído deshidrogenasa (NADP+)
ec:1.2.1.8 betaina-aldehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.9 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NADP+)
ec:1.2.1.10 acetaldehído deshidrogenasa (acetilating)
ec:1.2.1.11 aspartato-semialdehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.12 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (fosforilación)
ec:1.2.1.13 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NADP+) (fosforilación)
ec:1.2.1.15 malonato-semialdehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.16 succinato-semialdehído deshidrogenasa [NAD(P)+]
ec:1.2.1.17 glioxilato deshidrogenasa (acilación)
ec:1.2.1.18 malonato-semialdehído deshidrogenasa (acetilación)
ec:1.2.1.19 aminobutiraldehído dehidrogenasa
ec:1.2.1.20 glutarato-semialdehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.21 glicolaldehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.22 lactaldehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.23 2-oxoaldehído deshidrogenasa (NAD+)
ec:1.2.1.24 succinato-semialdehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.25 2-oxoisovalerato deshidrogenasa (acilating)
ec:1.2.1.26 2,5-dioxovalerato deshidrogenasa
ec:1.2.1.27 metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa (acilación)
ec:1.2.1.28 benzaldehído deshidrogenasa (NAD+)
ec:1.2.1.29 aril-aldehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.30 aril-aldehído deshidrogenasa (NADP+)
ec:1.2.1.31 L-aminoadipato-semialdehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.32 aminomuconato-semialdehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.36 retinal deshidrogenasa
ec:1.2.1.39 fenilacetaldehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.41 glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.42 hexadecanal deshidrogenasa (acilating)
ec:1.2.1.43 formato deshidrogenasa (NADP+)
ec:1.2.1.45 4-carboxi-2-hidroximuconato-6-semialdehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.46 formaldehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.47 4-trimetilamoniobutiraldehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.48 aldehído de cadena larga deshidrogenasa
ec:1.2.1.49 2-oxoaldehído deshidrogenasa (NADP+)
ec:1.2.1.51 piruvato deshidrogenasa (NADP+)
ec:1.2.1.52 oxoglutarato deshidrogenasa (NADP+)
ec:1.2.1.53 4-hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.57 butanal deshidrogenasa
ec:1.2.1.58 fenilglioxilato deshidrogenasa (acilating)
ec:1.2.1.59 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NAD(P)+) (fosforilación)
ec:1.2.1.62 4-formilbencen sulfonato deshidrogenasa
ec:1.2.1.63 6-oxohexanoato deshidrogenasa
ec:1.2.1.64 4-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.65 salicilaldehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.66 micotiol-depend. formaldehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.67 vanilin deshidrogenasa
ec:1.2.1.68 coniferil-aldehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.69 fluoroacetaldehído deshidrogenasa
ec:1.2.1.71 succinilglutamato-semialdehído deshidrogenasa

En este documento se describen otras enzimas y rutas ilustrativas (véanse los ejemplos). Además, se entiende que las enzimas pueden ser utilizadas para llevar a cabo reacciones para las que el sustrato no es el sustrato natural. Mientras que la actividad para el sustrato no natural puede ser menor que el sustrato natural, se entiende que tales enzimas se pueden utilizar, ya sea como de origen natural o modificado mediante la evolución dirigida o la evolución de adaptación, tal como en la presente se describe (ver también los ejemplos).

La producción de BDO a través de cualquiera de las rutas descritas en esta memoria se basa, en parte, en la identificación de las enzimas adecuadas para la conversión de los precursores de BDO. Un número de enzimas específicas para varias de las etapas de reacción han sido identificados. Para esas transformaciones donde las enzimas específicas para los precursores de la reacción no han sido identificadas, los candidatos se han identificado las enzimas que son los más adecuados para catalizar los pasos de reacción. Las enzimas se han demostrado de manera que funcionan en una amplia gama de sustratos, como se discute a continuación. Además, los avances en el campo de la ingeniería de proteínas también hacen que sea posible modificar las enzimas para actuar con eficacia en los substratos, incluso si no es un sustrato natural. A continuación se describen varios ejemplos de

enzimas de amplia especificidad de diversas clases adecuadas para una ruta de BDO así como los métodos que se han utilizado para la evolución de las enzimas para actuar sobre sustratos no naturales.

Una clase de enzimas clave en las rutas de BDO es el oxidoreductasas que las cetonas o aldehídos interconvierten a alcoholes (1.1.1). Numerosas enzimas ilustrativaes de esta clase puede operar en una amplia gama de sustratos. Un alcohol deshidrogenasa (1.1.1.1) purificado a partir de la bacteria del suelo Brevibacterium sp KU 1309 (Hirano et al. J. Biosc. Bioeng. 100:318-322 (2005)) se muestra para funcionar en una plétora de hidrocarburos alifáticos, así como alcoholes aromáticos con actividades altas. La Tabla 2 muestra la actividad de la enzima y su kilometros en diferentes alcoholes. La enzima es reversible y tiene una actividad muy alta en varios aldehídos también (Tabla 3).

Tabla 2. Actividades relativas de una alcohol deshidrogenasa de Brevibacterium sp KU para oxidar varios alcoholes.

Sustrato	Actividad Relativa (0%)	K_m (mM)
2-feniletanol	100*	0.025
(S)-2-fenilpropanol	156	0.157
(R)-2-fenilpropanol	63	0.020
Alcohol bencílico	199	0.012
3-fenilpropanol	135	0.033
Etaol	76	
1-butanol	111	
1-octanol	101	
1-dodecanol	68	
1-Feniletanol	46	
2-propanol	54	

* La actividad de 2-feniletanol, correspondiente a 19.2 U/mg, se tomó como 100%.

Tabla 3. Las actividades relativas de un alcohol deshidrogenasa de Brevibacterium sp KU 1309 para reducir diversos compuestos de carbonilo.

Sustrato	Actividad Relativa (%)	K_m (mM)
Fenilacetaldehído	100	0.61
2-fenilpropionaldehído	188	0.864
1-octilaldehído	87	
Acetofenola	0	

Lactato deshidrogenasa (1.1.1.27) de Raistonia eutropha es otra enzima que se ha demostrado que tiene actividades altas en varios 2-oxoácidos tales como 2-oxobutirato, 2-oxopentanoato y 2-oxoglutarato (un compuesto análogo a C5 2-oxoadipato) (Steinbüchel y Schlegel., Eur. J. Biochem. 130:329-334 (1983)). En la Tabla 4 en Columna 2 se muestran las actividades de IDHA de R. eutropha (antes A. eutrophus) sobre diferentes sustratos (Steinbüchel y Schlegel, supra, 1983).

Tabla 4. La actividad in vitro de R. eutropha IDHA (Steinbüchel y Schlegel, supra, 1983) sobre diferentes sustratos y se comparó con el piruvato.

Sustrato		Actividad (%) de	
	L(+)-lactato deshidrogenasa de A. eutrophus	L(*)-lactato deshidrogenasa de músculo de conejo	D(-)-lactato deshidrogenasa de L. leichmanii
Glioxilato	8.7	23.9	5.0
Piruvato	100.0	100.0	100.0
2-Oxobutirato	107.0	18.6	1.1
2-oxovalerato	125.0	0.7	0.0
3-metil-2-oxobutirato	28.5	0.0	0.0
3-metil-2-oxovalerato	5.3	0.0	0.0
4-metil-2-oxopentanoato	39.0	1.4	1.1
Oxolacetato	0.0	33.1	23.1
2-oxoglutarato	79.6	0.0	0.0
3-fluoropiruvato	33.6	74.3	40.0

Las oxidorreductasas que pueden convertir 2-oxoácidos a sus homólogos acil-CoA (1.2.1) se ha demostrado que aceptan múltiples sustratos. Por ejemplo, complejo de 2-

ceto-ácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BCKAD), también conocida como 2-oxoisovalerato deshidrogenasa (1.2.1.25), participa en rutas de degradación de aminoácidos de cadena ramificada, la conversión de 2-ceto ácidos derivados de valina, leucina e isoleucina a sus derivados acil-CoA y CO_2. En algunos organismos incluyendo Rattus norvegicus (Paxton et al., Biochem. J. 234:295-303 (1986)) y Saccharomyces cerevisiae (Sinclair et al., Biochem. Mol. Biol. Int. 32:911-922 (1993), este complejo se ha demostrado que tiene un sustrato de amplia gama que incluye oxo-ácidos lineales tales como 2-oxobutanoato y alfa-cetoglutarato, además de los precursores de aminoácidos de cadena ramificada.

Los miembros de otra clase de enzimas, a saber, aminotransferasas (2.6.1), se han reportado por actuar en varios sustratos. Ha sido identificado Aspartato aminotransferasa (aspAT) de Pyrococcus fursious, expresado en E. coli y la proteína recombinante caracterizada para demostrar que la enzima tiene las más altas actividades hacia aspartato y las actividades de alfa-cetoglutarato, pero menores, significativo para alanina, glutamato y aminoácidos aromáticos (Ward et al., Archaea 133-141 (2002)). En otro caso, una aminotransferasa identificada de Leishmania mexicana y expresada en E. coli (Bernal et al., FEMS Microbiol. Lett. 229:217-222 (2003)) se informó de una

especificidad de sustrato amplio de la tirosina (actividad considerada del 100 % en tirosina), fenilalanina (90%), triptófano (85%), aspartato (30%), leucina (25%) y metionina (25%), respectivamente (Vernal y col., Mol. Biochem. Parasitol 96:83 -92 (1998)). Se ha reportado una amplia especificidad similar por una tirosina aminotransferasa de Trypanosoma cruzi, aunque ambas de estas enzimas tienen una homología de secuencia de sólo el 6%. La última enzima puede aceptar leucina, metionina, así como tirosina, fenilalanina, triptófano y alanina como donadores eficientes de amino (Nowicki et al., Biochim. Biophys. Acta 1546: 268-281 (2001)).

Las transferasas CoA (2.8.3) han demostrado tener la capacidad para actuar en más de un sustrato. Específicamente, una transferasa CoA se purificó a partir de Clostridium acetobutylicum y se informó que tienen las principales actividades en acetato, propionato y butirato. También tienen actividades significativas con valerato, isobutirato, y crotonato (Wiesenborn et al., Appl. Environ. Microbiol. 55:323-329 (1989)). En otro estudio, la enzima acil-CoA: acetato-CoA transferasa de E. coli, también conocida como acetato-CoA transferasa (EC 2.8.3.8), se ha demostrado que transfiere el resto CoA a acetato de una variedad de sustratos acilo-CoA ramificados y lineales, incluyendo isobutirato (Matthies y Schink, aplicación

Environm. Microbiol. 58:1435-1439 (1992)), valerato (Vanderwinkel et al., Biochem Biophys Res. Commun. 33:902-908 (1968 b)) y butanoato (Vanderwinkel et al., Biochem Biophys Res. Commun. 33:902-908 (1968a).

Otras clases de enzimas adicionalmente soportan la amplia especificidad de sustrato para enzimas. Algunas isomerasas (5.3.3) también han sido probadas para que funcionen en varios sustratos. Por ejemplo, la L-ramnosa isomerasa de Pseudomonas stutzeri cataliza la isomerización entre diferentes aldoalsas y cetosas (Yoshida et al., J. Mol. Biol. 365: 1505-1516 (2007)). Estos incluyen isomerización entre L-ramnosa y L-ramnulosa, L-manosa y L-fructosa, L-xilosa y L-xilulosa, D-ribosa y D-ribulosa, y D-alosa y D-psicosa.

En otra clase de enzimas, las fosfotransferasas (2.7.1), la homoserina cinasa (2.7.1.39) de E. coli que convierte la L-homoserina a fosfato L-homoserina, se encontró que los análogos fosforilan numerosas homoserinas. En estos sustratos, el grupo carboxilo funcional en la posición R había sido reemplazado por un éster o por un grupo hidroximetilo (Huo y Viola, Bioquímica 35: 16180 a 16185 (1996)). La Tabla 5 demuestra la especificidad de sustrato amplio de esta cinasa.

Tabla 5. La especificidad del sustrato de homoserina cinasa

Substrato	K_{cal}	% k_{cal}	K_m (mM)	K_{cal}/K_m
L-homoserina	18.3±0.1	100	0.14±0.04	184±17
D-homoserina	8.3±1.1	32	31.8±7.2	0.26±0.03
L-aspartato β-semialdehído	2.1±0.1	8.2	0.28±0.02	7.5±0.3
L-2-amino-1,4-butanodiol	2.0±0.5	7.9	11.6±6.5	0.17±0.6
L-2-amino-5-hidroxivalerato	2.5±0.4	9.9	1.1±0.5	2.3±0.3
Ester metílico de L-homoserina	14.7±2.6	80	4.9±2.0	3.0±0.6
Ester etílico de L-homoserina	13.6±0.8	74	1.9±0.5	7.2±1.7
Ester isopropílico de L-homoserina	13.6±1.4	74	1.2±0.5	11.3±1.1
Ester n-propílico de L-homoserina	14.0±0.4	76	3.5±0.4	4.0±1.2
Ester isobutiólico de L-homoserina	16.4±0.8	84	6.9±1.1	2.4±0.3
Ester n-butílico de L-homoserina	29.1±1.2	160	5.8±0.8	5.0±0.5

Otra clase de enzimas útiles en las rutas de BDO son ácido-tiol ligasas (6.2.1). Al igual que las enzimas en otras clases, se ha determinado que ciertas enzimas en esta clase tienen especificidad por el sustrato amplio. Por ejemplo, acil CoA ligasa de Pseudomonas putida se ha demostrado que funciona sobre varios sustratos alifáticos incluyendo ácidos acético, propiónico, butírico, valérico, hexanoico, heptanoico y octanoico de compuestos aromáticos tales como ácidos fenilacético y fenoxiacético (Fernández-Valverde et al., Appl Environ Microbiol 59: 1149-1154 (1993)). Una enzima relacionada, malonil CoA sintetasa (6.3.4.9) de Rhizobium trifolii podrían convertir varios diácidos, a saber, malonato de etilo, propilo, alilo, isopropilo, dimetilo, ciclopropilo, ciclopropilmetileno, ciclobutilo, y bencilo en sus monotioesteres correspondientes (Pohl et al., J. Am.. Chem. Soc. 123:5822-5823 (2001)). De manera similar, las descarboxilasas (4.1.1) también se han encontrado con amplios rangos de sustrato. La piruvato descarboxilasa (PDC), también denominada como ácido ceto-descarboxilasa, una enzima clave en la fermentación alcohólica, que cataliza la descarboxilación del piruvato a acetaldehído. La enzima aislada de Saccharomyces cerevisiae tiene un rango amplio de sustrato para 2-ceto ácidos alifáticos incluyendo 2-cetobutirato, 2-cetovalerato y 2-fenilpiruvato (Li y Jordan, Bioquímica 38: 10. 004-10.012

(1999)). De manera similar, la descarboxilasa benzoilformato tiene un rango amplio de sustrato y ha sido objeto de estudios de ingeniería de enzimas. La enzima de Pseudomonas putida ha sido ampliamente estudiada y las estructuras cristalinas de esta enzima están disponibles (Polovnikova y otros, Biochemistry 42: 1820-1830 (2003); Hasson et al, Biochemistry 37:9918-9930 (1998)). La cadena ramificada alfa-cetoácido descarboxilasa (BCKA) se ha demostrado que actúa sobre una variedad de compuestos que varían en longitud de cadena de 3 a 6 átomos de carbono (Oku y Kaneda, J. Biol. Chem. 263:18386-18396 (1998); Smit et al., Appl. Environmental. Microbiol. 71:303-311 (2005b)). La enzima en Lactococcus lactis se ha caracterizado en una variedad de sustratos ramificados y lineales, incluyendo 2-oxobutanoato, 2-oxohexanoato, 2-oxopentanoato, 3-metil-2-oxobutanoato, 4-metil-2-oxobutanoato e isocaproato (Smit et al., Appl. Environ. Microbiol. 71 :303-311 (2005a).

Interesantemente, también se ha informado que las enzimas se sabe que tienen una actividad dominante para catalizar una función muy diferente. Por ejemplo, el cofactor-mutasa dependiente de fosfoglicerato (5.4.2.1) de Bacillus stearothermophilus y Bacillus subtilis se sabe que funcionan como una fosfatasa también (Rigden et al, Proteína Sci. 10: 1835-1846 (2001)). La enzima de B. stearothermophilus se sabe que tiene actividad en varios

sustratos, incluyendo 3-fosfoglicerato, alfa-naftilfosfato, p-nitrofenilfosfato, AMP, fructosa-6-fosfato, ribosa-5-fosfato y CMP.

En contraste con estos ejemplos en los que las enzimas naturalmente tienen amplias especificidades de sustrato, numerosas enzimas han sido modificadas mediante evolución dirigida para ampliar su especificidad hacia sus sustratos no naturales. Alternativamente, la preferencia sustrato de una enzima también se ha cambiado con la evolución dirigida. Por lo tanto, es factible para diseñar una enzima dada para la función eficiente en la naturaleza, por ejemplo, una mayor eficiencia, o un sustrato no natural, por ejemplo, una mayor eficacia. Por ejemplo, se ha informado que la enantioselectividad de una lipasa de Pseudomonas aeruginosa se mejoró significativamente (Reetz et al., Agnew. Chem. Int. Ed. Engl. 36:2830-2832 (1997)). Esta enzima hidroliza 2-metildecanoato de p-nitrofenilo con sólo 2% de exceso enantiomérico (ee) en favor de la (S)-ácido. Sin embargo, después de cuatro rondas sucesivas con propensión a errores mutagénesis y tamizado, se produjo una variante que cataliza la reacción requerida con 81% ee (Reetz et al., Agnew. Chem. Int. Ed. Engl. 36:2830-2832 (1997)).

Los métodos de evolución dirigida se han utilizado para modificar una enzima para funcionar en una matriz de sustratos no naturales. La especificidad del sustrato de la

lipasa en P. aeruginosa se amplió por la aleatorización de los residuos de aminoácidos cerca del sitio activo. Esto permitió la aceptación de ésteres alfa-sustituidos de ácidos carboxílicos por esta enzima (Reetz et al., Agnew. Chem. Int. Ed. Engl. 44:4192-4196 (2005)). En otra modificación exitosa de una enzima, el ADN intercambiado fue empleado para crear una aminotransferasa de Escherichia coli que los sustratos β-ramificados aceptados, que fueron mal aceptados por la enzima de tipo silvestre (Yano et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 95:5511-5515 (1998)). En concreto, al final de cuatro rondas de combinación, la actividad de la aspartato aminotransferasa por valina y 2-oxovalina aumentó en un máximo de cinco órdenes de magnitud, mientras que la disminución de la actividad hacia el sustrato natural, aspartato, hasta en 30 veces. Recientemente, se utilizó un algoritmo para diseñar una aldolasa retro que podría ser usada para catalizar la ruptura del enlace carbono-carbono en un sustrato no natural y no biológico, 4-hidroxi-4-(6-metoxi-2-naftil)-2-butanona (Jiang et al., Science 319: 1387-1391 (2008)). Estos algoritmos se utilizan en diferentes combinaciones de los cuatro motivos de diferentes catalizadores para diseñar nueva enzima y 20 de los diseños seleccionados para la caracterización experimental mejoró a un régimen de cuatro veces en la reacción no catalizada (Jiang et al., Science 319: 1387-1391 (2008)). De esta manera, no sólo se aproximan

a la ingeniería capaz de ampliar la gama de sustratos en los que puede actuar una enzima, pero permiten el diseño y construcción de las enzimas muy eficientes. Por ejemplo, un método de combinación de ADN (chimeragenesis aleatoria en plantillas transitorias o RACHITT) se informó para conducir a una ingeniería de monooxigenasa que tuvo una mejora de desulfuración en sustratos complejos en el régimen de 20 veces más rápido de conversión de un sustrato no natural (Coco et al., Nat. Biotechnol. 19:354-359 (2001)). De manera similar, la actividad específica de una enzima mutante triosafosfato isomerasa lenta se mejoró hasta 19 veces a partir de 1.3 veces (Hermes et al., Proc. Nat. Acad. Sci. E.U.A. 87: 696-700 1990)). Esta mejora en la actividad específica se llevó a cabo mediante mutagénesis aleatoria en toda la longitud de la proteína y la mejora podría ser rastreada para mutaciones en seis residuos de aminoácidos.

La eficacia de los enfoques de ingeniería de proteínas para alterar la especificidad de sustrato de una enzima para un sustrato deseado también se ha demostrado en varios estudios. La isopropilmalato deshidrogenasa de Thermus thermophilus fue modificada cambiando los residuos cerca del sitio activo de modo que ahora podría actuar en malato y D-lactato como sustratos (Fujita et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 65:2695-2700 (2001)). En este estudio, así como en otros, se señaló que uno o unos pocos residuos podrían ser

modificados para alterar la especificidad por el sustrato. Por ejemplo, el dihidroflavonol 4-reductasa para la que se cambió un solo aminoácido en la presunta sustrato región de unión preferentemente podría reducir dihidrocampferol (Johnson et al., Planta. J. 25:325-333 (2001)). La especificidad de sustrato de una isocitrato deshidrogenasa muy específico a partir de E. coli fue cambiado a isocitrato en forma de isopropilmalato cambiando un residuo en el sitio activo (Doyle et al., Bioquímica 40:4234-4241 (2001)). De manera similar, la especificidad de un cofactor 1,5-hidroxiprostaglandina deshidrogenasa NAD+-dependiente se alteró para NADP+ cambiando unos pocos residuos cerca del extremo N-terminal (Cho et al, Arch. Biochem Biophys 419: 139-146 (2003)). El análisis de secuencia y el análisis de modelado molecular que se utilizan para identificar los restos clave para la modificación, fueron estudiados además por mutagénesis dirigida al sitio.

Existen numerosos ejemplos que abarcan diversas clases de enzimas en los que se cambiaron la función de la enzima para favorecer un sustrato no natural sobre el sustrato natural de la enzima. Un fucosidasa se desarrolló a partir de una galactosidasa en E. coli por la combinación y tamizado de ADN (Zhang et al., Proc. Natl. Acad. E.U.A. 94:4504-4509 (1997)). De manera similar, la aspartato aminotransferasa de E. coli fue convertida en una tirosina

aminotransferasa usando modelado de homología y mutagénesis dirigida al sitio (Onuffer y Kirsch, Proteína Sci., 4:. 1750-1757 (1995)). La mutagénesis dirigida de dos residuos en el sitio activo de la benzoilformato descarboxilasa de P. putida informa la afinidad alterada (Km) hacia sustratos naturales y no naturales (Siegert et al., Protein Eng. Des Sel 18:345-357 (2005)). El citocromo c peroxidasa (PCC) de Saccharomyces cerevisiae se sometió a la evolución molecular dirigida para generar mutantes con mayor actividad contra el sustrato clásico guayacol peroxidasa, cambiando así la especificidad de sustrato de PCC de la proteína citocromo C para una molécula orgánica pequeña. Después de tres ciclos de combinación y tamizado de ADN, se aislaron mutantes que poseen una actividad 300 veces mayor contra guayacol y hasta una mayor especificidad 1000 veces de este sustrato relativo a la del sustrato natural (Iffland et al, Biochemistry 39: 10790 -10798 (2000)).

En algunos casos, las enzimas con las preferencias de sustrato diferentes que cualquiera de las enzimas parentales se han obtenido. Por ejemplo, bifenil-dioxigenasa mediada por la degradación de bifenilos policlorados se ha mejorado por los genes arrastrando los pies a partir de dos bacterias, Pseudomonas pseudoalcaligens y Burkholderia cepacia (Kumamaru et al., Nat. Biotechnol. 16:663-666 (1998)). Las oxigenasas quiméricas resultantes de bifenilo

mostraron diferentes preferencias de sustrato como enzimas parentales y mejoran la actividad de degradación hacia compuestos relacionados con bifenilo e hidrocarburos aromáticos de un solo anillo tales como tolueno y benceno, que fueron originalmente sustratos pobres para la enzima.

Además de cambiar la especificidad enzimática, también es posible mejorar las actividades sobre sustratos para los que las enzimas naturalmente tienen actividades bajas. Un estudio demostró que racemasa de aminoácidos a partir de P. putida que tenía una amplia especificidad de sustrato (en lisina, arginina, alanina, serina, metionina, cisteína, leucina e histidina, entre otros), pero una baja actividad hacia triptófano podría mejorarse significativamente por mutagénesis aleatoria (Kino et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 73: 1299-1305 (2007)). Del mismo modo, el sitio activo de la BCKAD bovino fue diseñado para favorecer sustrato alternativo acetil-CoA (Meng y Chuang, Bioquímica 33: 12879 - 12885 (1994)). Un aspecto interesante de estos enfoques es que incluso si los métodos aleatorios se han aplicado para generar estas enzimas mutadas con actividades eficaces, las mutaciones exactas o cambios estructurales que confieren la mejora en la actividad puede ser identificado. Por ejemplo, en el estudio mencionado, las mutaciones que facilitan la actividad mejoró en triptófano se remonta a dos diferentes posiciones.

La evolución dirigida también ha sido utilizada para expresar proteínas que son difíciles de expresar. Por ejemplo, sometiendo peroxidasa de rábano picante a mutagénesis aleatoria y la recombinación de genes, los mutantes se identificaron que tenían más de 14 veces mayor actividad que la de tipo silvestre (Lin et al., Biotechnol. Prog. 15:467-471 (1999)).

Otro ejemplo de evolución dirigida muestra las modificaciones extensas a las que pueden ser sometidas una enzima para lograr una gama de funciones deseadas. La enzima lactato deshidrogenasa de Bacillus stearothermophilus se sometió a mutagénesis dirigida al sitio, y tres sustituciones de aminoácidos se realizaron a los sitios que se creía para determinar la especificidad hacia hidroxiácidos diferentes (Clarke et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 148: 15-23 (1987)). Después de estas mutaciones, la especificidad de oxaloacetato sobre piruvato se aumentó a 500 en contraste con la enzima de tipo silvestre que tenía una especificidad catalítica para piruvato sobre oxaloacetato de 1000. Esta enzima se ha diseñado adicionalmente usando mutagénesis dirigida al sitio para tener actividad hacia cadena ramificada de piruvatos sustituidos (Wilks et al., Bioquímica 29:8587-8591 (1990)). Específicamente, la enzima tenía una mejora 55-veces en Kcat para el alfa-cetoisocaproato. Tres modificaciones estructurales se hicieron en la misma enzima

para cambiar su especificidad de sustrato de lactato a malato. La enzima fue muy activa y específica hacia malato (Wilks et al., Science 242:. 1541-1544 (1988)). La misma enzima de B. stearothermophilus fue diseñada posteriormente para tener una alta actividad catalítica hacia alfa-ceto ácidos con cadenas laterales cargadas positivamente, tales como aquellos que contienen grupos amonio (Hogan et al., Bioquímica 34:4225-4230 (1995)). Los mutantes con aminoácidos ácidos introducidos en la posición 102 de la enzima favorecieron la unión de tales grupos laterales de cadena de amonio. Los resultados obtenidos demostraron que los mutantes mostraron hasta 25-veces mejoras en los valores de K_{cat}/Km para sustratos de ácidos omega-amino-alfa-ceto. Curiosamente, esta enzima también estructuralmente modificada para funcionar como una fenilactato deshidrogenasa en lugar de una lactato deshidrogenasa (Wilks et al., Bioquímica 31:7802-7806 1992). Los sitios de restricción se introdujeron en el gen de la enzima que se extirpara una región del gen. Esta región codifica para un bucle de superficie móvil del polipéptido (residuos 98-110), que normalmente cierra el sitio activo de mayor disolvente y es un determinante importante de la especificidad por el sustrato. Los bucles de longitud variable y la secuencia se insertan de manera que hidroxiácido deshidrogenasas con especificidades de sustrato alteradas generadas. Con la construcción de un bucle de

tiempo, la actividad con el piruvato se redujo de un millón de veces, pero la actividad con fenilpiruvato fue en gran parte inalterada. Un conmutador en la especificidad (Kcat/Km) de 390,000 veces se logró. La selectividad 1700:1 de esta enzima para fenilpiruvato sobre el piruvato es que se requiere en una deshidrogenasa phenyllactate. Los estudios descritos anteriormente indican que varios enfoques de la ingeniería enzima puede utilizarse para obtener enzimas para las rutas de BDO como se describe en la presente.

Como se describe en este documento, se pueden utilizar las rutas biosintéticas a 1,4-butanodiol a partir de un número de intermediarios metabólicos centrales, incluyendo acetil-CoA, succinil-CoA, alfa-cetoglutarato, glutamato, 4-aminobutirato y homoserina. Acetil-CoA, succinil-CoA y alfa-cetoglutarato son intermediarios comunes del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), una serie de reacciones que están presentes en su totalidad en casi todas las células vivas que utilizan oxígeno para la respiración celular y está presente en formas truncadas en un número de microorganismos anaeróbicos. El glutamato es un aminoácido que se deriva de alfa-cetoglutarato a través de glutamato deshidrogenasa o cualquiera de una serie de reacciones de transaminación (véase la Figura 8B). El 4-aminobutirato puede estar formado por la descarboxilación de glutamato (véase la Figura 8B) o de acetoacetil.CoA través de la ruta descrita en la Figura

9C. Acetoacetil.CoA se deriva de la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por medio de la enzima, la acetil-coenzima A acetiltransferasa, o equivalentemente, acetoacetil-coenzima A tiolasa. Homoserina es un intermedio en el metabolismo de treonina y metionina, formado a partir de ruta de oxaloacetato y aspartato. La conversión de oxaloacetato a homoserina requiere un NADH, dos NADPH y una ATP.

Las rutas distintas a las que se han ejemplificado anteriormente también se pueden emplear para generar la biosíntesis de BDO en organismos microbianos de origen no natural. En una modalidad, la biosíntesis se puede lograr utilizando una ruta de L-homoserina a BDO (ver Figura 13). Esta ruta tiene un rendimiento molar de 0.90 mol/mol de glucosa, que aparece restringida por la disponibilidad de equivalentes reductores. Una segunda ruta se sintetiza a partir de BDO acetoacetil-CoA y es capaz de lograr el rendimiento máximo teórico de 1.091 mol/mol de glucosa (véase Figura 9). La aplicación de cualquiera de las rutas se puede lograr mediante la introducción de dos enzimas exógenas en un organismo huésped tales como E. coli, y las dos rutas, además, puede complementar la producción de BDO a través de succinil-CoA. Las enzimas, la termodinámica, los rendimientos teóricos y la viabilidad general de la ruta se describen más adelante.

Una ruta de homoserina también puede ser diseñada para generar BDO productoras de organismos microbianos. La homoserina es un intermedio en el metabolismo de treonina y metionina, formado a partir de ruta de aspartato de oxaloacetato. La conversión de oxaloacetato a homoserina requiere un NADH, dos NADPH y un ATP (Figura 2). Una vez formada, la homoserina alimenta en rutas biosintéticas tanto la treonina como metionina. En la mayoría de los organismos, los altos niveles de retroalimentación treonina o metionina para reprimir la ruta de biosíntesis de homoserina (Caspi et al., Nucleic. Acids. Res. 34: D511-D516 (1990)).

La transformación de homoserina a 4-hidroxibutirato (4-HB) puede llevarse a cabo en dos etapas enzimáticas como se describe en la presente. El primer paso de esta ruta es la desaminación de homoserina por una amoniaco liasa putativa. En el paso 2, el producto de alqueno, 4-hidroxibut-2-enoato se reduce a 4-HB por una reductasa putativa a costa de un NADH. 4-HB se puede convertir a BDO.

Las enzimas disponibles para catalizar las transformaciones anteriores se describen en este documento. Por ejemplo, el amoníaco liasa en el paso 1 de la ruta se asemeja mucho a la química de aspartato amoníaco-liasa (aspartasa). La aspartasa es una enzima generalizada en los microorganismos y se ha caracterizado extensamente (Viola, RE, Mol. Biol. 74:295-341 (2008)). La estructura cristalina

de la aspartasa E. coli ha sido resuelta (Shi et al., Bioquímica 36:9136-9144 (1997)), por lo tanto, es posible diseñar directamente mutaciones en sitio activo de la enzima que altere su especificidad por el sustrato que incluirá homoserina. La oxidorreductasa en el paso 2 tiene química similar a varias enzimas bien caracterizadas incluyendo fumarato reductasa en el ciclo de E. coli TCA. Puesto que la termodinámica de esta reacción es muy favorable, una reductasa endógena con amplia especificidad de sustrato probablemente será capaz de reducir 4-hidroxibut-2-enoato. El rendimiento de esta ruta bajo condiciones anaeróbicas es de 0.9 moles de BDO por mol de glucosa.

La ruta de succinil-CoA se encontró que tenía un rendimiento más alto debido al hecho de que es más eficiente energéticamente. La conversión de la molécula de oxaloacetato una BDO a través de la ruta homoserina requiere el uso de 2 equivalentes de ATP. Debido a que la conversión de glucosa en dos moléculas de oxalacetato puede generar un máximo de 3 moléculas de ATP suponiendo PEP carboxicinasa ser reversible, la conversión global de glucosa a través de BDO homoserina tiene un rendimiento energético negativo. Como era de esperar, si se supone que la energía puede ser generada a través de la respiración, el rendimiento máximo de la ruta de homoserina aumentada a 1.05 mol/mol de glucosa que es el 96% del rendimiento ruta succinil-CoA. La ruta de succinil-CoA

puede canalizar parte del flujo de carbono a través de la piruvato deshidrogenasa y la ramificación oxidativa del ciclo de Krebs para generar tanto la reducción de equivalentes y succinil CoA-sin gasto energético. Por lo tanto, no se encuentra con las mismas dificultades energéticas como la ruta de homoserina porque no todo el flujo se canaliza a través de oxaloacetato a succinil-CoA a BDO. En general, la ruta de homoserina demuestra una ruta de alto rendimiento para BDO.

Una ruta acetoacetato también puede ser diseñada para generar BDO productores de organismos microbianos. El acetoacetato se puede formar a partir de acetil-CoA por las enzimas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos, incluyendo acetil-CoA acetiltransferasa y acetoacetil-CoA transferasa.

Las rutas biosintéticas a través de acetoacetato son también particularmente útiles en los organismos microbianos que pueden metabolizar compuestos simples de carbono, tales como monóxido de carbono, dióxido de carbono o metanol para formar acetil-CoA.

Una ruta de tres pasos de acetoacetil-CoA a 4-aminobutirato (véase la Figura 9C) se puede utilizar para sintetizar a través de BDO acetoacetil-CoA. 4-aminobutirato se puede convertir en semialdehído succínico como se muestra en la Figura 8B. Semialdehído succínico, que es una etapa de

reducción retirada de succinil-CoA o un paso descarboxilación retirado de a-cetoglutarato, se puede convertir en BDO después de tres pasos reducciones (Figura 1). En pocas palabras, el paso 1 de esta ruta implica la conversión de acetoacetil-CoA a acetoacetato, por ejemplo, la E. coli acetoacetil-CoA transferasa codificadas por los genes TANA y AtoD (Hanai et al., Appl. Environ. Microbiol. 73: 7814-7818 (2007)). Paso 2 de la bio-ruta acetoacetil-CoA implica la conversión de acetoacetato de 3-aminobutanoato por un ω-aminotransferasa. El ácido ω-amino: piruvato aminotransferasa (ω-APT) de Alcaligens denitrificans se sobreexpresa en E. coli y que tienen una alta actividad hacia 3-aminobutanoata in vitro (Yun et al., Appl. Environmental. Microbiol. 70:2529-2534 (2004)).

En el paso 2, una aminomutase putativo desplaza el grupo amino de la posición 3 a la 4 de la estructura de la base de carbono. No se ha caracterizado una aminomutasa que realiza esta función en 3-aminobutanoato, pero una enzima a partir de Clostridium sticklandii tiene un mecanismo muy similar. La enzima, D-lisina-5,6-aminomutasa, está implicada en la biosíntesis de la lisina.

La ruta sintética para BDO de acetoacetil.CoA pasa a través de 4-aminobutanoato, un metabolito de E. coli que normalmente se forma a partir de la descarboxilación del glutamato. Una vez formado, el 4-aminobutanoato se puede

convertir en semialdehído succínico por 4-aminobutanoato transaminasa (2.6.1.19), una enzima que se ha caracterizado bioquímicamente.

Una consideración para la selección de enzimas candidatas en esta ruta es la estereoselectividad de las enzimas involucradas en los pasos 2 y 3. El ω-ABT en Alcaligens denitrificans es específico de la L-estereoisómero de 3-aminobutanoato, mientras que D-lisina-5,6-aminomutasa probablemente requiere el D-estereoisómero. Si las enzimas con estereoselectividad complementaria no se encontró inicialmente o ingeniería, una tercera enzima se puede añadir a la ruta con la actividad racemasa que puede convertir el L-3-aminobutanoato a D-3-aminobutanoato. Mientras las racemasas aminoácidos están muy extendidas, no se sabe si estas enzimas pueden funcionar en ω-aminoácidos.

El máximo rendimiento teórico molar de esta ruta bajo condiciones anaeróbicas es 1.091 moles/mol de glucosa. Con el fin de generar flujo de acetoacetil-CoA a BDO que fue necesario suponer que es reversible la acetil-CoA: acetoacetil-CoA transferasa. La función de esta enzima en E. coli es de metabolizar de ácidos grasos de cadena corta por primera conversión a tioéster.

Si bien la operación de acetil-CoA: acetoacetil-CoA transferasa en la dirección de consumo de acetato no se ha demostrado experimentalmente en E. coli, los estudios sobre

las enzimas similares en otros organismos apoyan la hipótesis de que esta reacción es reversible. La enzima butiril-CoA: acetato: transferasa CoA en el intestino de los microbios Roseburia sp. y F. prasnitzii opera en la dirección acetato utilizando para producir butirato (Duncan et al., Appl. Environ. Microbiol 68:5186-5190 (2002)). Otra enzima muy similar, la acetil: succinato CoA-transferasa en Trypanosoma brucei, también opera en la dirección de acetato. Esta reacción tiene una $\Delta_{rxn}G$ cercana al equilibrio, las concentraciones tan altas de acetato probables puede conducir la reacción en la dirección de interés. A la máxima velocidad de producción de BDO teórico de 1.09 simulaciones de glucosa mol/mol predicen que la E. coli puede generar 1.098 mol de ATP por cada mol de glucosa, sin subproductos de la fermentación. Este rendimiento de ATP debe ser suficiente para el crecimiento, mantenimiento y producción celular. La bioruta acetoacetatil-CoA es una ruta de alto rendimiento de BDO a partir de acetil-CoA.

Por lo tanto, además de cualquiera de las diversas modificaciones ejemplificados anteriormente para el establecimiento de biosíntesis de 4-HB en un huésped seleccionada, los productores de BDO organismos microbianos pueden incluir cualquiera de las combinaciones anteriores y permutaciones de modificaciones de la ruta metabólica de 4-HB, así como cualquier combinación de expresión para aldehído

CoA-independiente deshidrogenasa, aldehído CoA- dependiente deshidrogenasa o un alcohol deshidrogenasa u otras enzimas descritas en este documento para generar rutas biosintéticas para GBL y/o BDO. Por lo tanto, los productores de BDO de la invención puede tener expresión exógena de, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o hasta que todas las enzimas que corresponden a cualquiera de la ruta de 4-HB y/o cualquiera de las enzimas de la ruta de BDO se describen en la presente.

El diseño y construcción de los organismos microbianos genéticamente modificados se llevan a cabo utilizando métodos bien conocidos en la técnica para conseguir cantidades suficientes de expresión para producir BDO. En particular, los organismos microbianos no presentes en la naturaleza de la invención pueden lograr la biosíntesis de BDO dando como rsultado concentraciones intracelulares entre aproximadamente 0.1-200 mM o más, tales como aproximadamente 0.1-25 mM o más, como se discutió anteriormente. Por ejemplo, la concentración intracelular de BDO está entre alrededor de 3-20mM, particularmente entre aproximadamente 5-15 mM y más particularmente entre aproximadamente 8-12 mM, incluyendo aproximadamente 10 mM o más. Las concentraciones intracelulares entre y por encima de cada uno de estos intervalos ilustrativaes también pueden lograrse a partir de los organismos microbianos no presentes

en la naturaleza de la invención. Al igual que con los productores de 4-HB, los productores de BDO también pueden ser sostenidos, cultivados o fermentados bajo condiciones anaeróbicas.

La invención proporciona además un método para la producción de 4-HB. El método incluye el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural que tiene un ácido 4-hidroxibutanoico (4-HB) ruta biosintética que comprende al menos un ácido nucleico que codifica 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa exógena, semialdehído succínico CoA-independiente deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico CoA - dependiente deshidrogenasa, glutamato: semialdehído succínico transaminasa, OC-cetoglutarato descarboxilasa, o glutamato descarboxilasa bajo sustancialmente las condiciones anaeróbicas durante un tiempo suficiente para producir monómero 4-hidroxibutanoico (4-MP). El método puede incluir adicionalmente, por ejemplo, la conversión química de 4-HB a GBL y BDO o THF.

Además se proporciona un método para la producción de 4-HB. El método incluye el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural que tiene un ácido 4-hidroxibutanoico (4-HB) ruta biosintética que incluye al menos un ácido nucleico que codifica exógeno 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, succínico semialdehído CoA-dependiente deshidrogenasa o α-

cetoglutarato descarboxilasa bajo sustancialmente las condiciones anaeróbicas durante un tiempo suficiente para producir monómero 4-hidroxibutanoico (4-MP). El producto de 4-HB puede ser secretado en el medio de cultivo.

Además se proporciona un método para la producción de BDO. El método incluye el cultivo microbiano u organismo microbiano de un origen no natural biocatalizador, que comprende un organismo microbiano que tiene rutas biosintéticas de ácido 4-hidroxibutanoico (4-HB) y 1,4-butanodiol (BDO), las rutas que incluyen al menos un ácido nucleico exógeno codificación de 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, Semialdehído succínico CoA-dependiente deshidrogenasa, 4-hidroxibutirato: CoA transferasa, 4-hidroxibutirato cinasa, fosfotranshidroxibutirilasa, α-cetoglutarato descarboxilasa, aldehído deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa o un aldehído deshidrogenasa/alcohol para un período de tiempo suficiente para producir 1,4-butanodiol (BDO). El producto BDO puede ser secretado en el medio de cultivo.

Adicionalmente se proporcionan métodos para producir BDO por cultivo de un organismo microbiano de origen no natural que tiene una ruta de BDO de la invención. La ruta de BDO puede comprender al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, bajo condiciones y

durante un período de tiempo suficiente para producir BDO, la ruta de BDO que comprende 4-aminobutirato transferasa CoA, 4 - deshidrogenasa aminobutiril-CoA hidrolasa, 4-aminobutirato-CoA ligasa, 4-aminobutiril-CoA oxidorreductasa (desaminante), 4-aminobutiril-CoA transaminasa, o 4-hidroxibutiril CoA- (véase el Ejemplo VII y Tabla 17).

Alternativamente, la ruta de BDO puede comprender al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO que se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, bajo condiciones y durante un período de tiempo suficiente para producir BDO, la ruta de BDO que comprende 4-aminobutirato CoA transferasa, 4-aminobutiril-CoA hidrolasa, 4-aminobutirato-CoA ligasa, 4-aminobutiril-CoA reductasa (formador de alcohol), 4-aminobutiril-CoA reductasa, deshidrogenasa 4-aminobutan-1-ol, 4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (desaminar) o 4-aminobutan-1-ol transaminasa (véase el Ejemplo VII y Tabla 18).

Además, la invención proporciona un método para producir BDO, que comprende cultivar un microorganismo microbiano de origen no natural que tiene una ruta de BDO, la ruta que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, bajo condiciones y durante un período de tiempo suficiente para producir BDO, la ruta de BDO que comprende 4-aminobutirato cinasa, 4-

aminobutiraldehído deshidrogenasa (Fosforilación), 4-deshidrogenasa aminobutan-1-ol, 4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (desaminante), 4-transaminasa aminobutan-1-ol, [(4-aminobutanolil) oxi] fosfónico oxidorreductasa (desaminante), ácido fosfónico [(4-aminobutanolil)oxi] transaminasa, 4-hidroxibutiril-fosfato deshidrogenasa, o 4-hidroxibutiraldehído deshidrogenasa (Fosforilación) (véase el Ejemplo VII y en la Tabla 19).

La invención proporciona además un método para producir BDO, que comprende cultivar un microorganismo microbiano de origen no natural que tiene una ruta de BDO, la ruta que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para producir BDO, la ruta de BDO que comprende alfa-cetoglutarato 5-cinasa, semialdehído 2,5-dioxopentanoico deshidrogenasa (fosforilación), ácido 2,5-dioxopentanoico reductasa, CoA alfa-cetoglutarato transferasa, alfa-cetoglutaril-CoA hidrolasa, alfa-cetoglutaril-CoA ligasa, alfa-cetoglutaril-CoA reductasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa, alfa-cetoglutaril-CoA reductasa (formador de alcohol), 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa del ácido, o 5 -hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación) (véase el Ejemplo VIII y en la Tabla 20).

La invención proporciona adicionalmente un método para producir BDO, que comprende cultivar un microorganismo microbiano de origen no natural que tiene una ruta de BDO, la ruta que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, bajo condiciones y durante un período de tiempo suficiente para producir BDO, la ruta de BDO que comprende glutamato CoA transferasa, glutamil-CoA hidrolasa, glutamil-CoA ligasa, glutamato 5-cinasa, glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa (fosforilación), glutamil-CoA reductasa, glutamato-5-semialdehído reductasa, glutamil-CoA reductasa (formador de alcohol), ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico oxidorreductasa (desaminante), transaminasa ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico, descarboxilasa del ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico, 5-hidroxi ácido-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación) (véase el Ejemplo IX y la Tabla 21).

La invención incluye adicionalmente un método para producir BDO, que comprende cultivar un microorganismo microbiano de origen no natural que tiene una ruta de BDO, la ruta que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, bajo condiciones y por un período de tiempo suficiente para producir BDO, la ruta que comprende 3-BDO hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, 3-

hidroxibutiril-CoA deshidratasa, vinilacetil Δ-CoA-isomerasa, o 4-CoA-hidroxibutiril deshidratasa (ver Ejemplo X y en la Tabla 22).

También se proporciona un método para producir BDO, que comprende cultivar un microorganismo microbiano de origen no natural que tiene una ruta de BDO, la ruta que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, bajo condiciones y durante un período de tiempo suficiente para producir BDO, la ruta de BDO que comprende desaminasa homoserina, homoserina CoA transferasa, homoserina-CoA hidrolasa, homoserina-CoA ligasa, homoserina-CoA-desaminasa, 4-hidroxibut-2-enoil-CoA transferasa, 4-hidroxibut-2-enoil-CoA hidrolasa, 4-hidroxibut-2-enoil-CoA ligasa, 4-hidroxibut-2-enoato reductasa, 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa, 4-hidroxibutiril-CoA ligasa, o 4-hidroxibut-2-enoil-CoA reductasa (véase el Ejemplo XI y la Tabla 23).

La invención proporciona adicionalmente un método para producir BDO, que comprende cultivar un microorganismo microbiano de origen no natural que tiene una ruta de BDO, la ruta que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, bajo condiciones y durante un período de tiempo suficiente para producir BDO, la

ruta de BDO que comprende succinil-CoA reductasa (formador de alcohol), 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa, 4-hidroxibutiril-CoA ligasa, 4-hidroxibutanal deshidrogenasa (fosforilación). Tal una ruta de BDO puede comprender además succinil-CoA reductasa, 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, 4-hidroxibutiril-CoA cinasa, 4-hidroxibutirato transferasa, fosfotrans-4-hidroxibutirilasa, 4- hidroxibutiril-CoA reductasa, 4- hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol), o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

También se proporciona un método para producir BDO, que comprende cultivar un microorganismo microbiano de origen no natural que tiene una ruta de BDO, la ruta que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO se expresa en una cantidad suficiente para producir BDO, bajo condiciones y durante un período de tiempo suficiente para producir BDO, la ruta de BDO que comprende glutamato deshidrogenasa, 4-aminobutirato oxidorreductasa (desaminante), 4-aminobutirato transaminasa, glutamato descarboxilasa, 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa, 4-hidroxibutiril-CoA ligasa, 4-hidroxibutanal deshidrogenasa (fosforilación).

La invención proporciona adicionalmente métodos para producir un producto deseado utilizando los organismos genéticamente modificados descritos en la presente que permiten mejorar la producción de un producto deseado, tal

como BDO aumentando o disminuyendo el producto subproductos inconvenientes. Así, la invención proporciona un método para producir 1,4-butanodiol (BDO), que comprende cultivar los microorganismos de origen no natural microbianas se describe en la presente en condiciones y durante un período de tiempo suficiente para producir BDO. En una modalidad, la invención proporciona un método para producir BDO utilizando un microorganismo microbiano de origen no natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una 1,4-butanodiol (BDO) ruta que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO. En una modalidad, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar exógeno succinil-CoA sintetasa (véase Ejemplo XII). Por ejemplo, la sintetasa succinil-CoA pueden ser codificados por los genes de Escherichia coli sucCD.

En otra modalidad, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar exógeno alfa-cetoglutarato descarboxilasa (véase el Ejemplo XIII). Por ejemplo, la descarboxilasa de alfa-cetoglutarato puede ser codificada por el gen Mycobacterium bovis sucA. En todavía otra modalidad, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar semialdehído succinato deshidrogenasa exógena y 4-hidroxibutirato deshidrogenasa y opcionalmente 4-hidroxibutiril-CoA/acetil-CoA transferasa

(véase el Ejemplo XIII). Por ejemplo, el semialdehído succinato deshidrogenasa (CoA-dependiente), 4-hidroxibutirato deshidrogenasa y 4-hidroxibutiril-CoA/acetil-CoA transferasa puede ser codificada por genes de Porphyromonas gingivalis W83. En una modalidad adicional, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar butirato cinasa exógeno y fosfotransbutirilasa (véase el Ejemplo XIII). Por ejemplo, la cinasa y butirato fosfotransbutirilasa pueden ser codificadas por el los genes buk1 Clostridium acetobutylicum y PTB.

En otra modalidad, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar 4-hidroxibutiril-CoA reductasa exógena (véase el Ejemplo XIII). Por ejemplo, el 4-hidroxibutiril-CoA reductasa puede ser codificada por el gen ald Clostridium beijerinckii. Además, en una modalidad de la invención, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar exógeno 4-hidroxibutanal reductasa (véase el Ejemplo XIII). Por ejemplo, 4-hidroxibutanal reductasa puede ser codificada por gen adhl de Geobacillus thermoglucosidasius. En otra modalidad, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar exógenas subunidades piruvato deshidrogenasa (véase el Ejemplo XIV). Por ejemplo, la piruvato deshidrogenasa exógeno puede ser NADH-independiente. La subunidad de la piruvato deshidrogenasa puede ser codificada por el gen de la

neumonía Klebsiella ipdA. En una modalidad particular, la subunidad del organismo microbiano de genes piruvato deshidrogenasa puede estar bajo el control de un promotor formiato piruvato liasa.

En todavía otra modalidad, el organismo microbiano está genéticamente modificado para interrumpir un gen que codifica un sistema regulador de control respiratorio aeróbico (véase Ejemplo XV). Por ejemplo, la interrupción puede ser del gen arcA. Tal un organismo puede comprender además la interrupción de una codificación de gen deshidrogenasa malato. En una modalidad adicional, el organismo microbiano está genéticamente modificado para expresar un exógeno sintasa NADH citrato insensible (véase Ejemplo XV). Por ejemplo, la sintasa NADH citrato insensible puede ser codificada por gltA, tal como una mutante de R163L gltA. En todavía otra modalidad, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar fosfoenolpiruvato carboxicinasa exógena (véase Ejemplo XVI). Por ejemplo, la fosfoenolpiruvato carboxicinasa puede ser codificada por un gen de Haemophilus influenza de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa. Se entiende que las cepas ejemplificadas en la presente mejoran la producción de BDO de manera similar se puede utilizar, con las modificaciones apropiadas, para producir otros productos deseados, por ejemplo, productos 4-

hidroxibutirato deseados o de otro tipo descrito en la presente.

La invención proporciona adicionalmente un método para producir 4-hidroxibutanal mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural, que comprende una ruta de 4-hidroxibutanal que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta 4-hidroxibutanal expresada en una cantidad suficiente para producir 4-hidroxibutanal, la ruta de 4-hidroxibutanal comprende succinil-CoA reductasa (formador de aldehído); 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, y 4-hidroxibutirato reductasa (véase la Figura 58, pasos A-C-D). La invención también proporciona un método para producir 4-hidroxibutanal mediante el cultivo de un organismo microbiana de origen no natural, que comprende una ruta de 4-hidroxibutanal que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta 4-hidroxibutanal expresada en una cantidad suficiente para producir 4 - hidroxibutanal, la ruta de 4-hidroxibutanal comprendienod alfa-cetoglutarato descarboxilasa; 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, y 4-hidroxibutirato reductasa (Figura 58, los pasos B-C-D).

La invención proporciona además un método para producir 4-hidroxibutanal mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural, que comprende una ruta de 4-hidroxibutanal que comprende al menos un ácido nucleico

exógeno que codifica un enzima de la ruta 4-hidroxibutanal expresada en una cantidad suficiente para producir 4 - hidroxibutanal, la ruta que comprende 4-hidroxibutanal succinato reductasa; 4-hidroxibutirato deshidrogenasa y 4- hidroxibutirato reductasa (véase la Figura 62, los pasos F-C-D). En otra modalidad, la invención proporciona un método para producir 4-hidroxibutanal mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural, que comprende una ruta de 4-hidroxibutanal que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta 4-hidroxibutanal expresada en una cantidad suficiente para producir 4-hidroxibutanal, la ruta de 4-hidroxibutanal que comprende alfa-cetoglutarato descarboxilasa, o glutamato deshidrogenasa o glutamato transaminasa y glutamato descarboxilasa y 4-aminobutirato transaminasa o 4-aminobutirato deshidrogenasa; 4-hidroxibutirato reductasa y 4 hidroxibutirato- deshidrogenasa (véase la Figura 62, B o pasos ((J o K)-L-(M o N))-CD).

La invención también proporciona un método para producir 4-hidroxibutanal mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural, que comprende una ruta de 4-hidroxibutanal que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta 4-hidroxibutanal expresado en una cantidad suficiente para producir 4 - hidroxibutanal, la ruta de 4-hidroxibutanal que comprende

alfa-cetoglutarato reductasa; 5-hidroxi-2-oxopentanoato deshidrogenasa; y 5-hidroxi-2-oxopentanoato-descarboxilasa (véase la Figura 62, los pasos X-Y-Z). Además la invención proporciona un método para producir 4-hidroxibutiril-CoA mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural, que comprende una ruta de 4-hidroxibutiril-CoA que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta 4-hidroxibutiril-CoA expresada en una cantidad suficiente para producir 4-hidroxibutiril-CoA, la ruta de 4-hidroxibutiril-CoA que comprende alfa-cetoglutarato reductasa; 5-hidroxi-2-oxopentanoato deshidrogenasa; y 5-hidroxi-2-oxopentanoato deshidrogenasa (descarboxilación) (véase la Figura 62, los pasos X-Y-AA).

La invención proporciona adicionalmente un método para producir putrescina mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural, que comprende una ruta de putrescina que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta putrescina expresada en una cantidad suficiente para producir putrescina, la ruta de putrescina comprende succinato reductasa; 4-aminobutirato transaminasa o 4-aminobutirato deshidrogenasa; 4-aminobutirato reductasa; y putrescina transaminasa o putrescina deshidrogenasa (véase la Figura 63, pasos de FM/ENT/E). En todavía otra modalidad, la invención proporciona un método para producir putrescina mediante el

cultivo de un organismo microbiano de origen no natural, que comprende una ruta de putrescina que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta putrescina expresada en una cantidad suficiente para producir putrescina, la ruta de putrescina que comprende alfa-cetoglutarato descarboxilasa, 4-aminobutirato deshidrogenasa o 4 aminobutirato-transaminasa, 4-reductasa aminobutirato y putrescina deshidrogenasa o putrescina transaminasas (véase la Figura 63, los pasos B-M/N-C-D/E). La invención proporciona adicionalmente un método para producir putrescina mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural, que comprende una ruta de putrescina que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta putrescina expresado en una cantidad suficiente para producir putrescina, la ruta de putrescina comprende glutamato deshidrogenasa o glutamato transaminasa, glutamato decarboxilasa, 4-aminobutirato reductasa y de las putrescina transaminasas o deshidrogenasa putrescina (véase la Figura 63, a pocos pasos de J/K-L-C-D/E).

La invención proporciona, en otra modalidad un método para producir putrescina mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural, que comprende una ruta de putrescina que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta putrescina expresada en una cantidad suficiente para producir

putrescina, la ruta de putrescina comprende alfa-cetoglutarato reductasa; 5-amino-2-oxopentanoato deshidrogenasa o 5-amino-2-oxopentanoato transaminasa; 5-amino-2-oxopentanoato descarboxilasa y transaminasa putrescina o putrescina deshidrogenasa (véase la Figura 63, pasos O-P/Q-R-D/E) . También se proporciona un método para producir putrescina mediante el cultivo de un origen no natural organismo microbiano, que comprende una ruta de putrescina que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un enzima de la ruta putrescina expresada en una cantidad suficiente para producir putrescina, la ruta de putrescina que comprende alfa-cetoglutarato reductasa; 5-amino-2-oxopentanoato deshidrogenasa o 5-amino-2-oxopentanoato transaminasa; ornitina deshidrogenasa u ornitina transaminasa y ornitina descarboxilasa (véase la Figura 63, pasos O-P/Q-S/U-T). Se entiende que un organismo microbiano que comprende cualquiera de las rutas descritas en la presente puede ser utilizada para producir un producto deseado o intermedio, incluyendo 4-HB, 4-HBal, BDO o putrescina.

Se entiende que, en los métodos de la invención, cualquiera de los uno o más ácidos nucleicos exógenos puede ser introducido en un organismo microbiano para producir un organismo microbiano no natural de la invención. Los ácidos nucleicos pueden ser introducidos con el fin de conferir, por

ejemplo, una ruta biosintética 4-HB, BDO, THF o GBL en el organismo microbiano. Alternativamente, los ácidos nucleicos que codifican pueden ser introducidos para producir un organismo microbiano intermedio que tiene la capacidad biosintética para catalizar algunas de las reacciones requeridas para conferir capacidad biosintética a 4-HB, BDO, THF o GBL. Por ejemplo, un organismo microbiano de origen no natural que tiene una ruta biosintética de 4-HB puede comprender al menos dos ácidos nucleicos que codifican enzimas exógenas deseadas, tales como la combinación de 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa y α-cetoglutarato descarboxilasa; 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa y semialdehído succínico CoA-independiente deshidrogenasa; 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa y semialdehído succínico CoA-dependiente deshidrogenasa; semialdehído succínico CoA-dependiente deshidrogenasa y succinil-CoA sintetasa; succinil-CoA sintetasa y glutamato descarboxilasa, y similares. De esta manera, se entiende que cualquier combinación de dos o más enzimas de una ruta biosintética se pueden incluir en un organismo microbiano de origen no natural de la invención. De manera similar, se entiende que cualquier combinación de tres o más enzimas de una ruta biosintética se pueden incluir en un organismo microbiano de origen no natural de la invención, por ejemplo, 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, descarboxilasa α-

cetoglutarato y semialdehído succínico CoA-dependiente deshidrogenasa; semialdehído succínico CoA-independiente deshidrogenasa y succinil-CoA sintetasa; 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, semialdehído succínico CoA- dependiente deshidrogenasa y glutamato: semialdehído succínico transaminasa y así sucesivamente, según se desee, siempre que la combinación de enzimas de la biosíntesis deseada de como resultado la ruta en la producción del producto deseado correspondiente.

De manera similar, por ejemplo, con respecto a uno o más ácidos nucleicos exógenos introducidos para conferir la producción de BDO, un organismo microbiano de origen no natural que tiene una ruta biosintética de BDO puede comprender al menos dos ácidos nucleicos que codifican enzimas exógenas deseadas, tales como la combinación de 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa y α-cetoglutarato descarboxilasa; 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa y 4-hidroxibutiril CoA:acetil-CoA transferasa y 4-hidroxibutiril CoA: acetil-CoA transferasa; 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa y butirato cinasa; 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa y fosfotransbutirilasa; 4-hidroxibutiril CoA: acetil-CoA transferasa y aldehído deshidrogenasa; 4-hidroxibutiril CoA: acetil-CoA transferasa y alcohol deshidrogenasa; 4-hidroxibutiril CoA: acetil-CoA transferasa y un aldehído/alcohol deshidrogenasa, 4-

aminobutirato-CoA transferasa y 4-aminobutiril-CoA transaminasa; 4-aminobutirato cinasa y 4-aminobutan-1-ol oxidoreductasa (desaminación) y similares. Por lo tanto, se entiende que cualquier combinación de dos o más enzimas de una ruta biosintética se pueden incluir en un organismo microbiano de origen no natural de la invención. De manera similar, se entiende que cualquier combinación de tres o más enzimas de una ruta biosintética se pueden incluir en un organismo microbiano de origen no natural de la invención, por ejemplo, 4- hidroxibutanoato deshidrogenasa, α-cetoglutarato descarboxilasa y CoA 4-hidroxibutiril: acetil-CoA transferasa, 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, butirato cinasa y fosfotransbutirilasa; 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, 4- hidroxibutiril CoA:acetil-CoA transferasa y aldehído deshidrogenasa; 4-hidroxibutiril CoA:acetil-CoA transferasa, aldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa; butirato cinasa, fosfotransbutirilasa y un aldehído/alcohol deshidrogenasa; 4-aminobutiril-CoA hidrolasa, 4-aminobutiril-CoA reductasa y 4-amino butan-1-ol transaminasa, 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxibutiril-CoA deshidratasa y 4-hidroxibutiril-CoA deshidaratasa y similares. De manera similar, cualquier combinación de cuatro, cinco o más enzimas de una ruta biosintética como se describe en este documento pueden ser incluidas en un organismo microbiano de origen no natural de

la invención, según se desee, siempre que la combinación de enzimas proporcione los resultados deseados de la ruta de biosíntesis en producción del producto deseado correspondiente.

Cualquiera de los organismos microbianos no presentes en la naturaleza descritos en la presente pueden ser cultivados para producir y/o secretar los productos biosintéticos de la invención. Por ejemplo, los productores de 4-HB pueden ser cultivados para la producción biosintética de 4-HB. El 4-HB puede ser aislado o ser tratado como se describe más adelante para generar GBL, THF y/o BDO. De manera similar, los productores de BDO pueden ser cultivados para la producción biosintética de BDO. El BDO se puede aislar o sometidos a tratamientos adicionales para la síntesis química de los compuestos de la familia de BDO, tal como se describe en la presente.

El medio de crecimiento puede incluir, por ejemplo, cualquier fuente de hidratos de carbono que puede suministrar una fuente de carbono para el microorganismo de origen no natural. Estas fuentes incluyen, por ejemplo, azúcares tales como glucosa, sacarosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa manosa, y almidón. Otras fuentes de hidratos de carbono incluyen, por ejemplo, materias primas renovables y la biomasa. Tipos ilustrativos de biomasas que pueden ser utilizados como materias primas en los métodos de la

invención incluyen la biomasa celulósica, biomasa semicelulósica y materias primas de lignina o porciones de las materias primas. Tales materiales de alimentación de biomasa contienen, por ejemplo, sustratos de carbohidratos útiles como fuentes de carbono tales como glucosa, sacarosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa, manosa y almidón. Dadas las enseñanzas y la guía proporcionada en este documento, los expertos en la técnica comprenderán que las materias primas renovables y la biomasa, distintos de los ejemplificados anteriormente también se pueden utilizar para el cultivo de los organismos microbianos de la invención para la producción de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina y otros compuestos de la invención.

En consecuencia, teniendo en cuenta las enseñanzas y orientación proporcionada en este documento, los expertos en la técnica comprenderán que un organismo microbiano de origen no natural se pueden producir los compuestos que segrega biosintetizados de la invención cuando se siembra en una fuente de carbono tal como un carbohidrato. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina y cualquiera de los metabolitos intermedios en las rutas de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina y/o la combinación de rutas de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina. Todo lo que se requiere es diseñar en una o más de las actividades enzimáticas se muestran en la Figura 1

para lograr la biosíntesis del compuesto deseado o intermedio, incluyendo, por ejemplo, la inclusión de algunos o todos de las rutas de biosíntesis de 4-HB, 4-HBal, 4 - HBCoA, BDO o putrescina. En consecuencia, la invención proporciona un organismo microbiano no natural que segrega 4-HB cuando se siembra en un carbohidrato, segrega BDO cuando se siembra en un hidrato de carbono y/o segrega cualquiera de los metabolitos intermedios se muestran en las Figuras 1, 8-13, 58, 62 o 63 cuando se siembra en un carbohidrato. Un BDO que produce organismos microbianos de la invención puede iniciar la síntesis de, por ejemplo, succinato, succinil-CoA, α-cetogluterato, semialdehído succínico, 4-HB, 4-hidroxibutirilfosfato, 4-hidroxibutiril-CoA (4-HB-CoA) y/o 4 hidroxibutiraldehído.

En algunas modalidades, las condiciones de cultivo incluyen el crecimiento anaerobio o anaeróbica o sustancialmente las condiciones de mantenimiento. Ejemplos de condiciones anaeróbicas se han descrito anteriormente y son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de condiciones anaeróbicas para los procesos de fermentación se describen a continuación en los Ejemplos. Cualquiera de estas condiciones se puede emplear con los organismos microbianos no presentes en la naturaleza, así como otras condiciones anaerobias bien conocidos en la técnica. Bajo tales condiciones anaerobias, los productores de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina

pueden sintetizar 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina monoméricos, respectivamente, a las concentraciones intracelulares de 5-10 mM o más, así como todos las demás concentraciones ejemplificadas anteriormente.

Un número de compuestos intermedios también pueden ser generados por 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina que producen organismos microbianos de origen no natural de la invención. Con respecto a 4-HB que producen organismos microbianos de la invención, existen 4-HB y GBL monoméricas en equilibrio en el medio de cultivo. La conversión de 4-HB a GBL puede ser lograda eficientemente, por ejemplo, el cultivo de los organismos microbianos en medio ácido del pH. Un pH menor o igual a 7.5, en particular en o por debajo de pH 5.5, convierte espontáneamente 4-HB a GBL.

El GBL resultante puede separarse de 4-HB y otros componentes en el cultivo utilizando una variedad de métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos de separación incluyen, por ejemplo, los procedimientos de extracción ejemplificados en los ejemplos así como los métodos que incluyen extracción líquido-líquido continua, pervaporación, filtración por membrana, separación por membrana, ósmosis inversa, electrodiálisis, destilación, cristalización, centrifugación, filtración de extracción, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de adsorción y ultrafiltración. Todos los

métodos anteriores son bien conocidos en la técnica. El GBL separado puede ser purificado adicionalmente mediante, por ejemplo, destilación.

Otro compuesto corriente abajo que puede ser producido a partir de 4-HB que produce organismos microbianos de origen no natural de la invención incluye, por ejemplo, BDO. Este compuesto se puede sintetizar, por ejemplo hidrogenación química, de GBL. Las reacciones químicas de hidrogenación son bien conocidas en la técnica. Un procedimiento ilustrativo incluye la reducción química de 4-HB y/o GBL o una mezcla de estos dos componentes se derivan de el cultivo utilizando un catalizador de hidrogenación heterogéneo u homogéneo, junto con hidrógeno, o un agente reductor d base-hidruros utilizados estequiométricamente o catalíticamente, para producir 1,4-butanodiol.

Otros procedimientos bien conocidos en la técnica son igualmente aplicables para la reacción química anterior e incluyen, por ejemplo, WO 82/03854 (Bradley et al.), Que describen la hidrogenolisis de gamma-butirolactona en fase de vapor sobre un catalizador de óxido de cobre y óxido de zinc. La patente británica No. 1.230.276, que describe la hidrogenación de gamma-butirolactona utilizando un catalizador de óxido cobre-óxido de cromo. La hidrogenación se lleva a cabo en la fase líquida. Las reacciones por lotes también se ejemplifican con altas presiones total del

reactor. Las presiones parciales de reactivos y productos en los reactores son muy superiores a los puntos respectivos de rocío. La patente británica. No. 1,314,126, que describe la hidrogenación de gamma-butirolactona en fase líquida sobre un catalizador de óxido de níquel-cobalto-torio. Las reacciones por lotes se ejemplifican por tener altas presiones totales y presiones parciales de los componentes muy por encima de los puntos respectivos de rocío de los componentes. La patente británica No. 1,344,557, que describe la hidrogenación de gamma-butirolactona en fase líquida sobre un catalizador de óxido de cobre-óxido de cromo. Una fase de vapor o vapor que contiene fase mixta se indica como adecuado en algunos casos. Un reactor de flujo tubular continuo se ejemplifica mediante altas presiones total del reactor. La patente británica No. 1,512,751, que describe la hidrogenación de gamma-butirolactona a 1,4-butanodiol en la fase líquida sobre un catalizador de óxido de cobre-óxido de cromo. Las reacciones por lotes se ejemplifican con el total de altas presiones del reactor y, cuando sea determinable, reactivos y productos presiones parciales muy por encima de los puntos de rocío respectivos. Patente de E.U.A. No. 4.301.077, que describe la hidrogenación de 1,4-butanodiol de gamma-butirolactona sobre un catalizador de Ru-Ni-Co-Zn. La reacción puede llevarse a cabo en la fase líquida o gaseosa o en una mezcla de líquido-gas de fase. El reactor de flujo continuo ejemplifica

reacciones en fase líquida a altas presiones totales del reactor y productividades relativamente bajas. La Patente de E.U.A. No. 4,048,196, que describe la producción de 1,4-butanodiol mediante la hidrogenación en fase líquida de la gamma-butirolactona sobre un catalizador de óxido de cobre-óxido de zinc. Además se ejemplifica un flujo continuo de operación del reactor tubular a altas presiones total del reactor y reactivos de alta y presiones parciales de productos. Y la Patente de E.U.A. No. 4,652,685, que describe la hidrogenación de lactonas a glicoles.

Otro compuesto intermedio que puede ser producido para formar el 4-HB que produce organismos microbianos de la invención incluye, por ejemplo, THF. Este compuesto se puede sintetizar, por ejemplo hidrogenación química, de GBL. Un procedimiento ilustrativa bien conocido en la técnica aplicable para la conversión de GBL a THF incluye, por ejemplo, la reducción química de 4-HB y/o GBL o una mezcla de estos dos componentes se derivan del cultivo utilizando un catalizador de hidrogenación heterogénea u homogénea, junto con hidrógeno, o un agente reductor basado en hidruro utilizado estequiométrica o catalíticamente, para producir tetrahidrofurano. Otros procedimientos bien conocidos en la técnica son igualmente aplicables para la reacción química anterior e incluyen, por ejemplo, la Patente de E.U.A. No. 6,686,310, que describe alta superficie de sol-gel de ruta

preparado catalizadores de hidrogenación. También se describen ios procesos para la reducción del ácido maleico a tetrahidrofurano (THF) y 1,4-butanodiol (BDO) y para la reducción de la gamma-butirolactona a tetrahidrofurano y 1,4-butanodiol.

Las condiciones de cultivo pueden incluir, por ejemplo, los procedimientos de cultivo líquidos, así como otros procedimientos de fermentación y de cultivo a gran escala. Como se describe más adelante en los ejemplos, los rendimientos particularmente útiles de los productos biosintéticos de la invención puede obtenerse bajo condiciones de cultivo anaeróbicas o sustancialmente anaeróbicas.

La purificación y/o pruebas adecuadas para producir 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina pueden realizarse usando métodos bien conocidos. Las repeticiones adecuadas tales como cultivos por triplicado se pueden cultivar para cada cepa de ingeniería que será probada. Por ejemplo, la formación de productos y subproductos en el huésped de producción de ingeniería puede ser monitoreada. El producto final y productos intermedios y otros compuestos orgánicos, pueden ser analizados por métodos tales como HPLC (Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento), GC-MS (Cromatografía de Gases-Espectroscopía de Masas) y LC-MS (cromatografía líquida-Espectroscopía de Masas) u otro tipo

de métodos analíticos adecuados que utilizan procedimientos de rutina bien conocidos en la técnica. La liberación del producto en el caldo de fermentación también puede ser probada con el sobrenadante del cultivo. Los derivados y glucosa residual pueden ser cuantificados por HPLC utilizando, por ejemplo, un detector de índice de refracción para la glucosa y alcoholes, y un detector de UV para los ácidos orgánicos (Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 90:775-779 (2005)), u otros métodos adecuados de análisis y detección bien conocidos en la técnica. Las actividades individuales de enzima o proteína de las secuencias de ADN exógeno también puede probarse utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

El producto de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina se puede separar de otros componentes en el cultivo utilizando una variedad de métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos de separación incluyen, por ejemplo, procedimientos de extracción, así como métodos que incluyen extracción líquido-líquido continua, pervaporación, filtración por membrana, separación por membrana, ósmosis inversa, electrodiálisis, destilación, cristalización, centrifugación, filtración de extracción, cromatografía de intercambio iónico, de exclusión por tamaño cromatografía, cromatografía de adsorción, y ultrafiltración. Todos los métodos anteriores son bien conocidos en la técnica.

La invención proporciona además un método de fabricación 4-HB. El método incluye la fermentación de un organismo microbiano de origen no natural que tiene una ruta biosintética de ácido 4-hidroxibutanoico (4-HB) que comprende al menos un ácido nucleico que codifica 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa exógena, semialdehído succínico CoA-independiente deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico CoA - dependiente deshidrogenasa, glutamato: semialdehído succínico transaminasa, α-cetoglutaratodescarboxilasa, o glutamato descarboxilasa en condiciones sustancialmente anaerobias durante un tiempo suficiente para producir monómero 4-hidroxibutanoico (4-HB), comprendiendo el proceso fermentación de alimentación por lotes y separación por lotes; fermentación de alimentación por lotes y separación continua, o fermentación continua y separación continua.

El cultivo e hidrogenaciones químicas descritas anteriormente también se puede aumentar y desarrollar de forma continua para la fabricación de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, GBL, BDO y/o THF o putrescina. Ejemplos de procedimientos de crecimiento incluyen, por ejemplo, fermentación de alimentación por lotes y separación por lotes; fermentación de alimentación por lotes y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Todos estos procesos son bien conocidos en la técnica. El uso de los

productores de 4-HB permite biosíntesis y conversión química simultánea de 4-HB a GBL, BDO y/o THF mediante el empleo de los procedimientos de hidrogenación anteriores simultáneamente con métodos de cultivos continuos tales como la fermentación. Otros procedimientos de hidrogenación también son bien conocidos en la técnica y pueden aplicarse igualmente a los métodos de la invención.

Los procedimientos de fermentación son particularmente útiles para la producción biosintética de cantidades comerciales de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina. En general, y como con los procedimientos de cultivo no continuos, la producción continua y/o casi continua de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina incluirá un cultivo de organismo productor de origen no natural 4-HB, 4 - HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina de la invención en suficientes nutrientes y medios para sostener y/o casi sostener el crecimiento en una fase exponencial. El cultivo continuo bajo tales condiciones se puede incluir, por ejemplo, en 1 día, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días o más. Además, el cultivo continuo puede incluir 1 semana, 2, 3, 4 o 5 semanas o más, y hasta varios meses. Alternativamente, los organismos de la invención pueden ser cultivados por hora, si es adecuado para una aplicación particular. Es de entender que las condiciones de cultivo continúo y/o casi continuo también puede incluir todos los intervalos de tiempo entre estos

períodos ilustrativos. Se entiende además que el tiempo de cultivo del organismo microbiano de la invención es durante un período de tiempo suficiente para producir una cantidad suficiente de producto para un propósito deseado.

Los procedimientos de fermentación son bien conocidos en la técnica. Brevemente, la fermentación para la producción biosintética de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina o de otro modo productos derivados de HB-4, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina, incluyendo productos intermedios, de la invención pueden ser utilizados en, por ejemplo, fermentación de alimentación por lotes y separación por lotes; fermentación de alimentación por lotes y separación continua, o continua fermentación y separación continua. Ejemplos de lotes y procedimientos continuos de fermentación bien conocidos en la técnica se ejemplifican más adelante en los Ejemplos.

Además de los procedimientos de fermentación anteriores utilizando los productores 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina de la invención para la producción continua de cantidades sustanciales de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina, incluyendo monómero 4-HB, respectivamente, los productores de 4-HB también pueden ser, por ejemplo, simultáneamente sometidos a procedimientos de síntesis química para convertir el producto en otros compuestos o productos como se ha descrito anteriormente para la

conversión química de monómero 4-HB, por ejemplo, GBL, BDO y/o THF. Los productores de BDO similares pueden ser, por ejemplo, simultáneamente sometidos a procedimientos de síntesis química como se describe anteriormente para la conversión química de BDO a, por ejemplo, THF, GBL, pirrolidonas y/u otros compuestos de la familia de BDO. Además, los productos de los productores 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina puede separarse a partir del cultivo de fermentación y secuencialmente sometidos a la conversión química para convertir el producto en otros compuestos, si se desea, como se describe en la presente.

En resumen, la hidrogenación de GBL en el caldo de fermentación puede realizarse como se describe por Frost et al, Progreso Biotecnología 18: 201-211 (2002). Otro procedimiento para la hidrogenación durante la fermentación se incluye, por ejemplo, los métodos descritos en, por ejemplo, la Patente de E.U.A. No. 5,478,952. Este método se ilustra en los siguientes ejemplos.

Por lo tanto, la invención proporciona adicionalmente un método de fabricación de γ-butirolactona (GBL), tetrahidrofurano (THF) o 1,4-butanodiol (BDO). El método incluye la fermentación de un organismo microbiano de origen no natural tener rutas biosintéticas de 4-hidroxibutanoico (4-HB) y/o 1,4-butanodiol (BDO), las rutas comprenden al menos un ácido nucleico que codifica exógeno 4-

hidroxibutanoato deshidrogenasa, semialdehído succínico CoA-independiente deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico CoA-dependiente deshidrogenasa, 4-hidroxibutirato: CoA transferasa, glutamato: semialdehído succínico transaminasa, α-cetoglutarato descarboxilasa, glutamato descarboxilasa, 4-hidroxibutanoato cinasa, fosfotransbutirilasa, 1,4-butanodiol semialdehído CoA-independiente deshidrogenasa, 1,4-butanodiol semialdehído CoA-dependientes deshidrogenasa, 1,4-butanodiol alcohol CoA-independiente deshidrogenasa o 1,4-butanodiol alcohol CoA-dependiente deshidrogenasa, bajo sustancialmente las condiciones anaeróbicas durante un tiempo suficiente para producir 1,4-butanodiol (BDO), GBL o THF, la fermentación que comprende fermentación de alimentación por lotes y separación por lotes; fermentación de alimentación por lotes y separación continua, o fermentación continua y la separación continua.

Además de la biosíntesis de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina y otros productos de la invención como se describe en la presente, los organismos microbianos no presentes en la naturaleza y los métodos de la invención también pueden utilizarse en varias combinaciones entre sí y con otros organismos microbianos y los métodos bien conocidos en la técnica para lograr la biosíntesis de producto por otras rutas. Por ejemplo, una alternativa para producir un

BDO diferente de los productores 4-HB y los pasos químicos u otros que el uso del productor BDO directamente es a través de la adición de otro organismo microbiano capaz de convertir 4-HB o un producto 4-HB ejemplificado en la presente a BDO.

Uno de tales procedimientos incluye, por ejemplo, la fermentación de un organismo microbiano que produce 4-HB de la invención para producir 4-HB, tal como se describe ntes y después. El 4-HB puede ser utilizado como un sustrato para un segundo organismo microbiano que convierte 4-HB, por ejemplo, BDO, GBL y/o THF. El 4-HB se puede añadir directamente a otro segundo cultivo del organismo o el cultivo original de productores 4-HB pueden ser agotados de estos organismos microbianos, por ejemplo, separación celular y luego la adición posterior del segundo organismo al caldo de fermentación puede utilizarse para producir el producto final sin etapas de purificación intermedias. Un segundo organismo ilustrativo tiene la capacidad para utilizar bioquímicamente 4-HB como un sustrato para la conversión a BDO, por ejemplo, es el Clostridium acetobutylicum (véase, por ejemplo, Jewell et al., Actual Microbiol., 13:215-19 (1986)).

Por lo tanto, dicho procedimiento incluye, por ejemplo, la fermentación de un organismo microbiano que produce una ruta intermedia de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina. La ruta intermedia de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO

o putrescina puede ser utilizada como un sustrato para un segundo organismo microbiano que convierte la ruta intermedia 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina a 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina. La ruta intermedia de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina se puede añadir directamente a otro cultivo del segundo organismo o el cultivo original de la ruta intermedia de productores 4-HB, 4-HBal, BDO, 4-HBCoA o putrescina se puede agotar de estos organismos microbianos, por ejemplo, por separación celular y luego adición posterior del segundo organismo al caldo de fermentación puede ser utilizada para producir el producto final sin etapas de purificación intermedias.

En otras modalidades, los organismos microbianos que no ocurren naturalmente y los métodos de la invención pueden ser ensamblados en una amplia variedad de subrutas para lograr la biosíntesis de, por ejemplo, 4-HB y/o BDO como se ha descrito. En estas modalidades, las rutas biosintéticas para un producto deseado de la invención pueden ser segregadas en diferentes organismos microbianos y los organismos microbianos diferentes pueden ser co-cultivados para producir el producto final. En tal sistema de biosíntesis, el producto de un organismo microbiano es el sustrato para un segundo organismo microbiano hasta que se sintetiza el producto final. Por ejemplo, la biosíntesis de BDO puede llevarse a cabo como se ha descrito anteriormente

mediante la construcción de un organismo microbiano que contiene rutas biosintéticas para la conversión de una ruta intermedia a otra ruta intermedia o el producto, por ejemplo, un sustrato tal como succinato endógeno a través de 4-HB el producto final de BDO. Alternativamente, también puede ser producido biosintéticamente BDO a partir de organismos microbianos mediante co-cultivo o co-fermentación usando dos organismos en el mismo recipiente. Un primer organismo microbiano ser un productor de genes 4-HB para producir 4-HB de ácido succínico y un segundo organismo microbiano ser un productor de BDO con genes para convertir 4-HB a BDO. Por ejemplo, la biosíntesis de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina puede lograrse mediante la creación de un organismo microbiano que contiene rutas biosintéticas para la conversión de una ruta intermedia a otra ruta intermedia o el producto. Alternativamente, 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina también puede ser producido biosintéticamente a partir de organismos microbianos mediante co-cultivo o co-fermentación usando dos organismos en el mismo recipiente, donde el organismo microbiano primero produce un intermedio de 4 - HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina y el segundo organismo microbiano convierte el intermedio a 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina.

Dadas las enseñanzas y la guía proporcionada en este documento, los expertos en la técnica comprenderán que

existe una amplia variedad de combinaciones y permutaciones para los organismos microbianos que no ocurren naturalmente y los métodos de la invención junto con otros organismos microbianos, con el co-cultivo de otros organismos microbianos no naturales que tienen subrutas y con combinaciones de otros productos químicos y/o procedimientos bioquímicos bien conocidos en la técnica para producir productos de 4-HB, BDO, GBL y THF de la invención.

Se entiende que, en los métodos de la invención, cualquiera de los uno o más ácidos nucleicos exógenos puede ser introducido en un organismo microbiano para producir un organismo microbiano de origen no natural de la invención. Los ácidos nucleicos pueden ser introducidos con el fin de conferir, por ejemplo, una ruta biosintética 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina en el organismo microbiano. Alternativamente, los ácidos nucleicos que codifican pueden ser introducidos para producir un organismo microbiano intermedio que tiene la capacidad biosintética para catalizar algunas de las reacciones requeridas para conferir capacidad biosintética a 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina. Por ejemplo, un organismo microbiano de origen no natural que tiene una ruta biosintética 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina puede comprender al menos dos ácidos nucleicos que codifican enzimas o proteínas exógenas deseadas, tales como la combinación de enzimas como describe en la presente (ver

Ejemplos y Figuras 1, 8-13, 58, 62 y 63) y similares. De esta manera, se entiende que cualquier combinación de dos o más enzimas o proteínas de una ruta biosintética se pueden incluir en un organismo microbiano de origen no natural de la invención. De manera similar, se entiende que cualquier combinación de tres o más enzimas o proteínas de una ruta biosintética se pueden incluir en un organismo microbiano de origen no natural de la invención, por ejemplo, y así sucesivamente, como se desea y se describe en la presente, por lo siempre que la combinación de enzimas y/o proteínas de los resultados deseados de la ruta de biosíntesis de la producción del producto deseado correspondiente. De manera similar, cualquier combinación de cuatro o más enzimas o proteínas de una ruta biosintética como se describe en este documento pueden ser incluidos en un organismo microbiano de origen no natural de la invención, según se desee, siempre que la combinación de enzimas y/o proteínas de la deseada Resultados biosintética en la producción del producto deseado correspondiente.

Para generar mejores productores, puede ser utilizado el modelado metabólico para optimizar las condiciones de crecimiento. El modelado también se puede utilizar para diseñar genes de eliminación que adicionalmente optimizan el uso de la ruta (véase, por ejemplo, las publicaciones de Patentes de E.U.A. 2002/0012939, E.U.A.

2003/0224363, E.U.A. 2004/0029149, E.U.A. 2004/0072723, E.U.A. 2003/0059792, E.U.A. 2002/0168654 y E.U.A. 2004 /0009466 y la Patente de E.U.A. No. 7,127,379). El análisis de modelos permite hacer predicciones fiables de los efectos sobre el crecimiento celular para cambiar el metabolismo hacia una producción más eficiente de los 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina.

Un método computacional para la identificación y el diseño de las 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 modelo metabólico y el programa de simulación que sugiere que la eliminación del gen o las estrategias de interrupción que dan lugar a microorganismos genéticamente estables que una sobreproducción del producto en cuestión. Específicamente, el marco examina la red metabólica y/o bioquímica completa de un microorganismo para sugerir manipulaciones genéticas que obligan a la bioquímica deseada para convertirse en un subproducto obligatorio de crecimiento celular. Mediante el acoplamiento de la producción de bioquímicos con el crecimiento celular a través de supresiones de genes ubicados estratégicamente u otra alteración funcional del gen, las presiones de selección de crecimiento impuestas a las cepas de ingeniería después de largos períodos de tiempo en una ventaja del biorreactor para

mejorar el rendimiento como consecuencia de la obligatoriedad del crecimiento, junto con producción bioquímica. Por último, cuando se construyen supresiones de genes hay una posibilidad insignificante de las cepas diseñadas volviendo a sus estados de tipo silvestre porque los genes seleccionados por OptKnock son para ser completamente eliminados a partir del genoma. Por lo tanto, esta metodología computacional puede ser utilizada para identificar cualquiera de las rutas alternativas que conducen a la biosíntesis de un producto deseado o utilizados en relación con los organismos microbianos de origen no natural para mayor optimización de la biosíntesis de un producto deseado.

Brevemente, OptKnock es un término usado en la presente para referirse a un método de cálculo y un sistema para modelar el metabolismo celular. El programa OptKnock se refiere a un marco de modelos y métodos que incorporan restricciones particulares en el análisis de balance de flujo (FBA) modelos. Estas limitaciones incluyen, por ejemplo, la información cualitativa cinética, la información cualitativa reguladora y/o microdisposiciones de datos experimentales de ADN. OptKnock también calcula soluciones a diversos problemas metabólicos, por ejemplo, el endurecimiento de los límites de flujo derivados a través de modelos de balance de flujo y, posteriormente, sondeando los límites de rendimiento de las redes metabólicas en presencia de adiciones o supresiones de

genes. La estructura computacional OptKnock permite la construcción de formulaciones de los modelos que permiten una consulta efectiva de los límites de rendimiento de las redes metabólicas y proporciona métodos para la solución de los problemas resultantes mixtos completos de programación lineal. Los métodos de modelización y simulación del metabolismo que se refiere el presente documento como OptKnock se describen, por ejemplo, en la publicación de E.U.A. 2002/0168654, presentada el 10 de enero 2002, en la patente internacional No.PCT/US02/00660, presentada el 10 de enero de 2002 y la publicación de los E.U.A. 2009/0047719, presentada el 10 de agosto 2007.

Otro método computacional para la identificación y el diseño de las alteraciones metabólicas que favorecen la producción de biosíntesis de un producto es un modelo metabólico y sistema de simulación denominado SimPheny®. Este método de cálculo y el sistema se describe en, por ejemplo, publicación de E.U.A. 2003/0233218, presentada el 14 de junio 2002 y en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US03/18838, presentada el 13 de junio 2003. SimPheny ® es un sistema computacional que se puede utilizar para producir un modelo de red en computadora y para simular el flujo de masa, energía o carga a través de las reacciones químicas de un sistema biológico para definir un espacio de la solución que contiene cualesquiera y todas las posibles

funcionalidades del reacciones químicas en el sistema, determinando así una gama de actividades permitidas por el sistema biológico. Este enfoque se conoce como limitaciones de modelado basado en que el espacio de la solución se define por las limitaciones tales como la estequiometría de las reacciones conocidas que incluyen, así como reacción termodinámica y las limitaciones de capacidad asociadas con los flujos máximos a través de las reacciones. El espacio definido por estas restricciones puede ser interrogado para determinar las capacidades fenotípicas y el comportamiento del sistema biológico, o de sus componentes bioquímicos.

Estos métodos de cálculo son consistentes con las realidades biológicas, porque los sistemas biológicos son flexibles y pueden llegar al mismo resultado de muchas maneras diferentes. Los sistemas biológicos están diseñados a través de mecanismos evolutivos que han sido restringidos por las limitaciones fundamentales que tienen que enfrentar todos los sistemas vivos. Por lo tanto, las limitaciones de la estrategia basada en el modelado abarcan estas realidades generales. Además, la capacidad de imponer restricciones adicionales continuamente en un modelo de red a través del endurecimiento de los resultados de las limitaciones en una reducción en el tamaño del espacio de soluciones, mejorando así la precisión con que puede ser el rendimiento fisiológico o fenotipo predicho.

Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionada en este documento, los expertos en la técnica serán capaces de aplicar varios marcos computacionales para el modelado metabólico y simulación para diseñar y aplicar la biosíntesis de un compuesto deseado en organismos microbianos huésped. Tales métodos metabólicos de modelado y simulación incluyen, por ejemplo, los sistemas de cómputo ejemplificados anteriormente como SimPheny® y OptKnock. Para ilustración de la invención, algunos métodos se describen en la presente con referencia a la estructura de cómputo OptKnock para el modelado y la simulación. Los expertos en la técnica sabrán cómo aplicar la identificación, formulación y aplicación de las alteraciones metabólicas utilizando OptKnock a cualquiera de estos modelos metabólico y otros marcos de simulación computacionales y métodos bien conocidos en la técnica.

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

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

Una vez identificado, el conjunto de reacciones que van a ser interrumpido con el fin de lograr la producción de un producto deseado se implementan en el organismo o célula diana por la interrupción funcional de al menos un gen que codifica cada reacción metabólica dentro del conjunto. Un medio particularmente útil para lograr la interrupción funcional del conjunto reacción es por la eliminación de cada gen que codifica. Sin embargo, en algunos casos, puede ser benéfico interrumpir la reacción por otras aberraciones genéticas que incluyen, por ejemplo, la mutación, supresión de regiones reguladoras, tales como promotores o cis sitios de unión para factores de regulación, o por truncamiento de la secuencia codificante en cualquiera de un número de localizaciones. Estas últimas aberraciones, dando como resultado menos supresión total del conjunto de genes que puede ser útil, por ejemplo, cuando las evaluaciones rápidas del acoplamiento de un producto deseado o cuando es menos probable que ocurra la inversión genética.

Para identificar otras soluciones productivas para el problema descrito anteriormente OptKnock de dos niveles

que dan lugar a nuevas series de reacciones de alteraciones o modificaciones metabólicas que pueden dar como resultado la biosíntesis, incluyendo el crecimiento de la biosíntesis de acoplamiento de un producto deseado, un método de optimización, denominados de cortes enteros, se puede ponerse en práctica. Este método procede de forma iterativa para resolver el problema OptKnock ejemplificado anteriormente con la incorporación de una restricción adicional a que se refiere como un número entero de corte en cada iteración. Restricciones enteras cortadas prevenir eficazmente el procedimiento de solución de elegir exactamente el mismo conjunto de reacciones identificadas en cualquier iteración anterior que obligatoriamente la biosíntesis de las parejas de productos para el crecimiento. Por ejemplo, si un crecimiento previamente identificado de acoplamiento de modificación metabólica especifica para reacciones 1, 2, y 3 de interrupción, a continuación, la siguiente restricción impide que las mismas reacciones sean consideradas simultáneamente en soluciones posteriores. El método de corte entero es bien conocido en la técnica y se puede encontrar descrito en, por ejemplo, Burgard et al., Biotechnol. Prog. 17:791-797 (2001). Como con todos los métodos descritos en la presente con referencia a su uso en combinación con la metodología de OptKnock computacional para el modelado metabólico y la simulación, el método de corte entero de

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

Los métodos ilustrados en la presente permiten la construcción de células y organismos que producen biosintéticamente un producto deseado, incluyendo el acoplamiento obligatorio de la producción de un producto bioquímico objetivo para el crecimiento de la célula u organismo diseñado para albergar las alteraciones genéticas identificadas. Por lo tanto, los métodos de cálculo descritos en este documento permiten la identificación e implementación de las modificaciones metabólicas que se identifican mediante un método de diseño en computadora seleccionado de OptKnock o SimPheny®. El conjunto de modificaciones metabólicas pueden incluir, por ejemplo, la adición de una o más enzimas biosintéticas de la ruta y/o interrupción funcionales de una o más reacciones metabólicas incluyendo, por ejemplo, la interrupción por eliminación de genes.

Como se mencionó anteriormente, la metodología OptKnock se desarrolló con la premisa de que las redes de mutantes microbianos pueden ser evolucionadas hacia sus fenotipos de crecimiento máximo previstos por computadora cuando se someten a largos períodos de selección de crecimiento. En otras palabras, el enfoque aprovecha la

capacidad de un organismo para optimizarse bajo presiones selectivas. La estructura OptKnock permite la enumeración exhaustiva de las combinaciones de eliminación del gen que obligan a un acoplamiento entre la producción bioquímica y el crecimiento celular sobre la base de la estequiometría de la red. La identificación de genes óptimos/eliminaciones de reacción requiere la solución de un problema de optimización de dos niveles que elige el conjunto de reacciones activos tales que una solución óptima para el crecimiento de la red resultante sobre produce la bioquímica de interés (Burgard y otros, Biotechnol. Bioeng. 84: 647-657 (2003)).

Un modelo en computadora estequiométrica del metabolismo de E. coli puede ser empleado para identificar genes esenciales para las rutas metabólicas como se ilustró anteriormente y descritos en, por ejemplo, las publicaciones de patente de E.U.A. 2002/0012939, E.U.A. 2003/0224363, E.U.A. 2004/0029149, E.U.A. 2004/0072723, E.U.A. 2003/0059792, E.U.A. 2002/0168654 y E.U.A. 2004/0009466, y en la Patente de E.U.A. No. 7,127,379. Como se describe en la presente, la estructura matemática OptKnock se puede aplicar para señalar supresiones de genes que conducen a la producción de crecimiento de acoplamiento de un producto deseado. Además, la solución del problema de OptKnock de dos niveles sólo proporciona un conjunto de supresiones. Para enumerar todas las soluciones significativas, es decir, todos

los conjuntos de orificios ciegos que conducen a la formación de crecimiento de la producción de acoplamiento se puede implementar una técnica de optimización, llamados de cortes enteros. Esto implica iterativamente la solución del problema OptKnock con la incorporación de una restricción adicional a que se refiere como un número entero de corte en cada iteración, como se discutió anteriormente.

Los métodos ejemplificados anteriormente e ilustrados adicionalmente en los siguientes ejemplos permiten la construcción de células y organismos que se producen biosintéticamente, incluyendo la producción del par obligatorio de un producto bioquímico objetivo para el crecimiento de la célula u organismo diseñado para albergar las alteraciones genéticas identificadas. En este sentido, se han identificado las alteraciones metabólicas dando como resultado la biosíntesis de 4-HB y 1,4-butanodiol. Las cepas de microorganismos construidos con las alteraciones metabólicas identificadas producen niveles elevados de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina en comparación con los organismos microbianos no modificados. Estas cepas pueden ser beneficiosamente utilizadas para la producción comercial de 4-HB, BDO, THF, GBL, 4-HBal, 4-HBCoA o putrescina, por ejemplo, en el proceso de fermentación continua sin estar sometidos a las presiones selectivas negativas.

Por lo tanto, los métodos de cálculo descritos en la presente permiten la identificación y la aplicación de las modificaciones metabólicas que son identificadas por un método en computadora seleccionado de OptKnock o SimPheny ®. El conjunto de modificaciones metabólicas pueden incluir, por ejemplo, la adición de una o más enzimas biosintéticas de la ruta y/o interrupción funcional de una o más reacciones metabólicas incluyendo, por ejemplo, la interrupción por eliminación del gen.

Se entiende que las modificaciones que no afecten sustancialmente la actividad de las diversas modalidades de esta invención también se incluyen dentro de la definición de la invención descrita en la presente. En consecuencia, los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no limitar la presente invención.

Cualquiera de los organismos microbianos no presentes en la naturaleza descritos en la presente pueden ser cultivados para producir y/o secretar los productos biosintéticos de la invención. Por ejemplo, los productores de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina pueden ser cultivadas para la producción biosintética de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina.

Para la producción de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina, las cepas recombinantes se siembran en un medio con fuente de carbono y otros nutrientes esenciales. Es

altamente conveniente mantener las condiciones anaeróbicas en el fermentador para reducir el costo del proceso global. Tales condiciones se pueden obtener, por ejemplo, por primer burbujeo del medio con nitrógeno y luego sellar los frascos con un septo y un cierre. Para las cepas donde el crecimiento no se observa anaeróbicamente, pueden ser aplicadas las condiciones microaerobias por la perforación del septo con un pequeño orificio para la aireación limitada. Los ejemplos de condiciones anaeróbicas se han descrito anteriormente y son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de condiciones aeróbicas y anaeróbicas se describen, por ejemplo, en publicación de E.U.A. 2009/0047719, presentada el 10 de agosto 2007. Las fermentaciones se pueden realizar en un lote, alimentación por lotes o de manera continua, como se describe en la presente.

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

Además de materias primas renovables tales como las ejemplificadas anteriormente, los productores de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina de organismos microbianos de la invención también pueden ser modificados para el crecimiento en gas de síntesis como su fuente de carbono. En esta modalidad específica, una o más proteínas o enzimas se expresan en los productores de organismos 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina para proporcionar una ruta metabólica para el uso de gas de síntesis u otra fuente de carbono gaseoso.

El gas de síntesis, también conocido como gas de síntesis o de gas productor, es el principal producto de la gasificación de carbón y de materiales carbonosos tales como materiales de biomasa, incluidos los cultivos y residuos agrícolas. El gas de síntesis es una mezcla principalmente de H_2 y CO y puede obtenerse a partir de la gasificación de cualquier material orgánico, incluyendo pero no limitado al carbón, aceite de carbón, gas natural, biomasa y residuos de materia orgánica. La gasificación se lleva a cabo generalmente bajo un combustible de alta proporción de oxígeno. Aunque en gran medida de H_2 y CO, el gas de síntesis también puede incluir CO_2 y otros gases en cantidades más pequeñas. De esta manera, el gas de síntesis proporciona una fuente rentable de carbono gaseoso tal como CO y, adicionalmente, el CO_2.

La ruta de Wood-Ljungdahl cataliza la conversión de CO y H_2 a acetil-CoA y otros productos tales como acetato. Los organismos capaces de utilizar CO y gas de síntesis también generalmente tienen la capacidad de utilizar CO_2 y mezclas de CO_2/H_2 a través del mismo conjunto básico de enzimas y transformaciones abarcados por la ruta de Wood-Ljungdahl, la conversión dependiente de H_2, de CO_2 a acetato por los microorganismos fue reconocida bastante antes de que se revelara que el CO también puede ser utilizado por los mismos organismos y que las mismas rutas que estaban involucradas. Se ha demostrado que muchos acetógenos se desarrollan en presencia de CO_2 y producen compuestos tales como acetato, siempre y cuando el hidrógeno está presente para suministrar los reductores equivalentes necesarios (véase, por ejemplo, Drake, Acetogénesis, págs. 3-60 Chapman y Hall, Nueva York, (1994)). Esto se puede resumir mediante la siguiente ecuación:

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

Por lo tanto, no microorganismos naturales que poseen la ruta de Wood-Ljungdahl pueden utilizar mezclas de CO_2 y H_2, así como para la producción de acetil-CoA y otros productos deseados.

La ruta de Wood-Ljungdahl es bien conocida en la técnica y consta de 12 reacciones que se pueden separar en

dos ramas: (1) ramificación de metilo y (2) ramificación de carbonilo. La ramificación de metilo se convierte gas de síntesis de metil-tetrahidrofolato (metil-THF), mientras que la ramificación de carbonilo convierte metil-THF a acetil-CoA. Las reacciones en la ramificación de metilo son catalizadas en orden por las siguientes enzimas o proteínas: ferredoxina oxidorreductasa, formiato deshidrogenasa, formiltetrahidrofolato sintetasa, meteniltetrahidrofolato ciclodehidratasa, metilentetrahidrofolato deshidrogenasa y metilentetrahidrofolato reductasa. Las reacciones en la ramificación de carbonilo son catalizadas en orden por las siguientes enzimas o proteínas: metiltetrahidrofolato: proteína corrinoide metiltransferasa (por ejemplo, ACSE), proteína corrinoide de hierro-azufre, proteína de ensamble de níquel-proteína (por ejemplo, AcsF), ferredoxina, acetilo - CoA sintasa, monóxido de carbono deshidrogenasa y proteína de ensamble de níquel-proteína (por ejemplo, CooC). Siguiendo las enseñanzas y la orientación proporcionada en este documento para la introducción de un número suficiente de ácidos nucleicos que se codifica para generar una ruta de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina, los expertos en la materia entenderán que el mismo diseño de ingeniería también puede llevarse a cabo con respecto a la introducción de al menos los ácidos nucleicos que codifican las enzimas de Wood-Ljungdahl o proteínas ausentes en el organismo huésped. Por

lo tanto, se introducen uno o más ácidos nucleicos que codifica en los organismos microbianos de la invención de tal manera que el organismo modificado contiene la ruta completa de Wood-Ljungdahl conferirá capacidad de uso de gas de síntesis.

Además, el ciclo reductor (inversa) del ácido tricarboxílico y/o actividades hidrogenasa también se pueden utilizar para la conversión de CO, CO_2 y/o H_2 a acetil-CoA y otros productos tales como acetato. Los organismos capaces de fijar carbono a través de la ruta de TCA reductiva puede utilizar una o más de las siguientes enzimas: ATP citrato-liasa, citrato liasa, aconitasa, isocitrato deshidrogenasa, alfa-cetoglutarato: ferredoxina oxidorreductasa, succinil-CoA sintetasa, succinil-CoA-transferasa, fumarato reductasa, fumarasa, la 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 la monóxido de carbono deshidrogenasa e hidrogenasa se utilizan para fijar CO_2 a través del ciclo reductivo TCA en acetil-CoA o acetato. Acetato puede ser convertido a acetil-CoA por enzimas tales como acetil-CoA transferasa, acetato sintetasa cinasa/fosfotransacetilase, y acetil-CoA. Acetil-CoA se puede convertir en precursores de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina, gliceraldehído-3-fosfato, fosfoenolpiruvato, y

piruvato, por piruvato: ferredoxina oxidorreductasa y las enzimas de la gluconeogénesis. Siguiendo las enseñanzas y la orientación proporcionada en este documento para la introducción de un número suficiente de ácidos nucleicos que se codifica para generar una ruta 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina, los expertos en la materia entenderán que el mismo diseño de ingeniería también puede llevarse a cabo con respecto a la introducción de al menos los ácidos nucleicos que codifican las enzimas reductoras de ruta de TCA o proteínas ausentes en el organismo huésped.

Por lo tanto, la introducción de uno o más ácidos nucleicos que codifica en los organismos microbianos de la invención de tal manera que el organismo modificado contiene la completa ruta TCA reductiva conferirá capacidad de usar gas de síntesis.

En consecuencia, teniendo en cuenta las enseñanzas y orientación proporcionadas en este documento, los expertos en la técnica comprenderán que un organismo microbiano de origen no natural se puede producir por la segregación de los compuestos biosintetizados de la invención cuando se siembran en una fuente de carbono tal como un carbohidrato. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina y cualquiera de los metabolitos intermedios en la ruta de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina. Todo lo que se requiere es diseñar en una o más de las actividades

requeridas de enzimas o proteínas para lograr la biosíntesis del compuesto deseado o intermedio, incluyendo, por ejemplo, la inclusión de algunas o todas las rutas o biosíntesis de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO de putrescina. En consecuencia, la invención proporciona un organismo microbiano no natural que produce y/o segrega 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina cuando se siembra en una fuente de carbono o de otro tipo carbohidrato y produce y/o segrega cualquiera de los metabolitos intermedios se muestra en la ruta 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina cuando se siembra en un carbohidrato o otra fuente de carbono. El 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina produce organismos microbianos de la invención lo cual puede iniciar la síntesis de un producto intermedio en una ruta 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina, como se describe en la presente .

Para generar mejores productores, el modelado metabólico puede ser utilizado para optimizar las condiciones de crecimiento. El modelado también se puede utilizar para diseñar genes de eliminación que adicionalmente optimizan el uso de la ruta (véase, por ejemplo, publicaciones de patente de E.U.A. 2002/0012939, E.U.A. 2003/0224363, E.U.A. 2004/0029149, E.U.A. 2004/0072723, E.U.A. 2003/0059792, E.U.A. 2002/0168654 y E.U.A. 2004/0009466 y la Patente de E.U.A. No. 7,127,379). El análisis de modelos permite hacer predicciones fiables de los efectos sobre el crecimiento

celular para cambiar el metabolismo hacia una producción más eficiente de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina.

Un método computacional para la identificación y el diseño de las alteraciones metabólicas que favorecen la biosíntesis de un producto deseado es la estructura computacional OptKnock (Burgard et al., Biotechnol. Bioeng. 84:647-657 (2003)). OptKnock es un modelo metabólico y el programa de simulación que sugiere que las estrategias de supresión de genes que dan lugar a microorganismos genéticamente estables que una sobreproducción del producto en cuestión. En concreto, la estructura examina el metabolismo completo y/o de la red bioquímica de un microorganismo con el fin de sugerir las manipulaciones genéticas que obligan a los cambios bioquímicos que se desee convertir en un subproducto obligatorio del crecimiento de la célula. Mediante el acoplamiento de la producción de bioquímicos con el crecimiento celular a través de supresiones de genes ubicados estratégicamente u otra alteración funcional del gen, las presiones de selección de crecimiento impuesto a las cepas de ingeniería después de largos períodos de tiempo en una ventaja de biorreactor para la mejora del rendimiento como resultado del crecimiento obligatorio acoplado para producción bioquímica. Por último, cuando se construyen supresiones de genes hay una posibilidad insignificante de las cepas diseñadas volviendo a sus estados

de tipo silvestre porque los genes seleccionados por OptKnock son para ser completamente eliminados a partir del genoma. Por lo tanto, esta metodología computacional puede ser utilizada para identificar cualquiera de las rutas alternativas que conducen a la biosíntesis de un producto deseado o utilizados en relación con los organismos microbianos de origen no natural para mayor optimización de la biosíntesis de un producto deseado.

Brevemente, OptKnock es un término usado en la presente para referirse a un método de cálculo y un sistema para modelar el metabolismo celular. El programa OptKnock se refiere a una estructura de modelos y métodos que incorporan restricciones particulares en el análisis de modelos de balance de flujo (FBA). Estas limitaciones incluyen, por ejemplo, la información cualitativa cinética, la información cualitativa reguladora, y/o datos de microdisposiciones de ADN experimentales. OptKnock también calcula soluciones a diversos problemas metabólicos, por ejemplo, el endurecimiento de los límites de flujo derivados a través de modelos de balance de flujo y, posteriormente, sondeando los límites de rendimiento de las redes metabólicas en presencia de adiciones o supresiones de genes. Marco OptKnock computacional permite la construcción de formulaciones de los modelos que permiten una consulta efectiva de los límites de rendimiento de las redes metabólicas y proporciona métodos

para la solución de los problemas resultantes mixtos enteros de programación lineal. Los métodos de modelo y simulación del metabolismo que se refiere el presente documento como OptKnock se describen, por ejemplo, E.U.A. publicación 2002/0168654, presentada el 10 de enero 2002, en la patente internacional No. PCT/US02/00660, presentada el 10 de enero 2002, y la publicación de E.U.A. 2009/0047719, presentada el 10 de agosto 2007.

Otro método computacional para la identificación y el diseño de las alteraciones metabólicas que favorecen la producción de biosíntesis de un producto es un modelo metabólico y sistema de simulación denominado SimPheny ®. Este método de cálculo y el sistema se describe en, por ejemplo, publicación de E.U.A. 2003/0233218, presentada el 14 de junio 2002, y en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US03/18838, presentada el 13 de junio 2003. SimPheny ® es un sistema computacional que se puede utilizar para producir un modelo de red en computadora y para simular el flujo de masa, energía o carga a través de las reacciones químicas de un sistema biológico para definir un espacio de la solución que contiene funcionalidades cualquiera y todas las posibles reacciones químicas en el sistema, determinando así una gama de actividades permitidas por el sistema biológico. Este enfoque se conoce como limitaciones de modelado basadas en el espacio de la solución se define por las limitaciones de

manera que la estequiometría de las reacciones conocidas incluyen la reacción termodinámica y las limitaciones de capacidad asociados con los flujos máximos a través de reacciones. El espacio definido por estas restricciones puede ser cuestionado para determinar las capacidades fenotípicas y el comportamiento del sistema biológico, o de sus componentes bioquímicos.

Estos métodos de cálculo son consistentes con las realidades biológicas, dado que los sistemas biológicos son flexibles y pueden llegar al mismo resultado de muchas maneras diferentes. Los sistemas biológicos están diseñados a través de mecanismos evolutivos que han sido restringidos por las limitaciones fundamentales que todos los sistemas vivos deben enfrentar. Por lo tanto, las limitaciones de la estrategia basada en el modelado abarcan estas realidades generales. Además, la capacidad de imponer restricciones adicionales continuamente en un modelo de red a través del endurecimiento de los resultados de las limitaciones en una reducción en el tamaño del espacio de soluciones, mejorando así la precisión con que puede ser el rendimiento fisiológico o fenotipo previsto.

Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionada en este documento, los expertos en la técnica serán capaces de aplicar varios marcos computacionales para el modelado metabólico y simulación para diseñar y aplicar la biosíntesis

de un compuesto deseado en organismos microbianos huésped. Tales métodos metabólicos de modelado y simulación incluyen, por ejemplo, los sistemas de cómputo son ejemplificados anteriormente como SimPheny ® y OptKnock. Para ilustración de la invención, algunos métodos se describen en la presente con referencia a la estructura de cómputo OptKnock para el modelado y la simulación. Los expertos en la técnica sabrán cómo aplicar la identificación, formulación y aplicación de las alteraciones metabólicas utilizando OptKnock a cualquiera de estos modelos metabólicos y otras estructuras de simulación computacionales y métodos bien conocidos en la técnica.

Los métodos descritos anteriormente proporcionan una serie de reacciones metabólicas que serán alteradas. La eliminación de cada reacción dentro del conjunto o modificación metabólica puede resultar en un producto deseado como un producto obligatoria durante la fase de crecimiento del organismo. Debido a que las reacciones son conocidas, una solución al problema OptKnock de dos niveles también proporcionará el gen 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 genes correspondientes que codifican las enzimas que participan en cada reacción es generalmente un proceso automatizado, logra a través de correlación de las reacciones

con una base de datos de reacción que tiene una relación entre las enzimas y los genes de codificación.

Una vez identificado, el conjunto de reacciones que va a ser interrumpido con el fin de lograr la producción de un producto deseado que se implementa en el organismo o célula objetivo por la interrupción funcional de al menos un gen que codifica cada reacción metabólica dentro del conjunto. Un medio particularmente útil para lograr la interrupción funcional del conjunto reacción es por la eliminación de cada gen que se codifica. Sin embargo, en algunos casos, puede ser benéfico interrumpir la reacción por otras aberraciones genéticas que incluyen, por ejemplo, mutación, supresión de regiones reguladoras, tales como promotores o sitios de unión cis para factores de regulación, o por truncamiento de la secuencia codificante en cualquiera de un número de ubicaciones. Estas últimas aberraciones, dando como resultado menos de supresión total del conjunto de genes que puede ser útil, por ejemplo, cuando que ocurran las evaluaciones rápidas del acoplamiento de un producto deseado o es menos probable la inversión genética.

Para identificar otras soluciones productivas para el problema descrito anteriormente OptKnock de dos niveles que dan lugar a nuevas series de reacciones que alteran o modificaciones metabólicas que pueden dar como resultado la biosíntesis, incluyendo el crecimiento de la biosíntesis de

acoplamiento de un producto deseado, un método de optimización, denominada cortes enteros, se puede ponerse en práctica. Este método procede de forma iterativa para resolver el problema de OptKnock ejemplificado anteriormente con la incorporación de una restricción adicional a que se refiere como un número entero de corte en cada iteración. Las restricciones enteras cortadas previenen eficazmente el procedimiento de solución de elegir exactamente el mismo conjunto de reacciones identificadas en cualquier iteración anterior que obligatoriamente realizan la biosíntesis de los pares de productos para el crecimiento. Por ejemplo, si un crecimiento de acoplamiento previamente identificado de modificación metabólica es especifico para la interrupción de reacciones 1, 2, y 3, a continuación, la siguiente restricción impide que las mismas reacciones de ser considerados simultáneamente en soluciones posteriores. El método de corte entero es bien conocido en la técnica y se puede encontrar descrito en, por ejemplo, Burgard et al., Biotechnol. Prog. 17:791-797 (2001). Como con todos los métodos descritos en la presente con referencia a su uso en combinación con la estructura computacional OptKnock para el modelado metabólico y la simulación, el método de corte entero de reducir la redundancia en iterativo análisis computacional también se puede aplicar con otros marcos

computacionales bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, SimPheny ®.

Los métodos ilustrados en la presente permiten la construcción de células y organismos que producen biosintéticamente un producto deseado, incluyendo el acoplamiento obligatorio de la producción de un producto bioquímico objetivo para el crecimiento de la célula u organismo diseñado para albergar las alteraciones genéticas identificadas. Por lo tanto, los métodos de cálculo descritos en este documento permiten la identificación e implementación de las modificaciones metabólicas que se identifican mediante un método en computadora seleccionado de OptKnock o SimPheny®. El conjunto de modificaciones metabólicas pueden incluir, por ejemplo, la adición de una o más enzimas biosintéticas de la ruta y/o interrupción funcional de una o más reacciones metabólicas incluyendo, por ejemplo, la interrupción por eliminación del gen.

Como se mencionó anteriormente, la metodología OptKnock se desarrolló en la premisa de que las redes de mutantes microbianos pueden ser evolucionado hacia sus computacionalmente predijo que el crecimiento de máxima fenotipos cuando se somete a largos períodos de selección de crecimiento. En otras palabras, el enfoque aprovecha la capacidad de un organismo para optimizar la auto-bajo presiones selectivas. El marco OptKnock permite la

enumeración exhaustiva de las combinaciones de eliminación del gen que obligan a un acoplamiento entre la producción bioquímica y el crecimiento celular sobre la base de la estequiometría de la red. La identificación de genes óptimos/de reacción de eliminación requiere la solución de un problema de optimización de dos niveles que elige el conjunto de reacciones activos tales que una solución óptima para el crecimiento de la red resultante sobre produce la bioquímica de interés (Burgard y otros, Biotechnol. Bioeng. 84: 647-657 (2003)).

Un modelo en computadora estequiométrica del metabolismo de E. coli puede ser empleado para identificar genes esenciales para las rutas metabólicas como se ilustra anteriormente y descritos en, por ejemplo, las publicaciones de patente de E.U.A. 2002/0012939, E.U.A. 2003/0224363, E.U.A. 2004/0029149, E.U.A. 2004/0072723, E.U.A. 2003/0059792, E.U.A. 2002/0168654 y E.U.A. 2004/0009466, y en la Patente de E.U.A. No. 7,127,379. Como se describe en la presente, el marco OptKnock matemático se puede aplicar para señalar supresiones de genes que conducen a la producción de crecimiento de acoplamiento de un producto deseado. Además, la solución del problema OptKnock de dos niveles sólo proporciona un conjunto de supresiones. Para enumerar todas las soluciones significativas, es decir, todos los conjuntos de puntos ciegos que conducen a la formación de crecimiento

de la producción de acoplamiento, una técnica de optimización, llamados cortes enteros, se puede implementar. Esto implica iterativamente la solución del problema OptKnock con la incorporación de una restricción adicional a la que se refiere como un número entero de corte en cada iteración, como se discutió anteriormente.

Como se describe en la presente, un ácido nucleico que codifica una actividad deseada de un 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o ruta putrescina puede ser introducido en un organismo huésped. En algunos casos, puede ser conveniente modificar una actividad de un 4-HB, 4-HBal, BDO 4-HBCoA o enzima o proteína putrescina ruta para aumentar la producción de 4-HB, 4-HBal, BDO 4-HBCoA o putrescina. Por ejemplo, las mutaciones conocidas que aumentan la actividad de una proteína o enzima puede ser introducido en una molécula de ácido nucleico que codifica. Además, los métodos de optimización se pueden aplicar para aumentar la actividad de una enzima o proteína y/o disminuir una actividad inhibitoria, por ejemplo, disminuir la actividad de un regulador negativo.

Un método de optimización de tales se dirige la evolución. Evolución dirigida es un método de gran alcance que consiste en la introducción de mutaciones dirigidas a un gen específico con el fin de mejorar y/o alterar las propiedades de una enzima. La mejora de las enzimas y/o

alterados pueden ser identificados a través de la elaboración y aplicación de ensayos sensibles de detección de alto rendimiento que permiten la detección automatizada de muchas variantes de la enzima (por ejemplo, $>10^4$). Las rondas Iterativas de mutagénesis y selección típicamente se realizan para producir una enzima con propiedades optimizadas. Los algoritmos computacionales que pueden ayudar a identificar las áreas del gen para la mutagénesis también se han desarrollado y pueden reducir significativamente el número de variantes de la enzima que necesitan ser generado y se tamiza. Se han desarrollado numerosas tecnologías dirigidas a la evolución (para revisiones, véase Hibbert y otros, Biomol.Eng 22: 11-19 (2005), Huisman y Lalonde, en Biocatálisis en las págs industrias farmacéuticas y de biotecnología. 717-742 (2007), Patel (ed.), CRC Press, Otten y Quax. Biomol. Eng 22: 1-9 (2005) y Sen et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 143:212-223 (2007)) para ser eficaces en la creación de diversas bibliotecas variantes y estos métodos se han aplicado con éxito a la mejora de una amplia gama de propiedades a través de muchas clases de enzimas. Las características de enzimas que han sido mejoradas y/o alteradas por las tecnologías de evolución dirigida incluyen, por ejemplo: selectividad/especificidad, para la conversión de sustratos no naturales; estabilidad de temperatura, para el trabajo pesado a altas temperaturas; estabilidad del pH,

para bioprocesamiento bajo pH inferior o superior las condiciones del sustrato, o la tolerancia del producto, de manera que se puede lograr títulaciones altas de productos; unión (K_m), incluida la ampliación de la unión del sustrato para incluir sustratos no naturales; inhibición (H_2), para eliminar la inhibición por productos, sustratos, o intermediarios clave; actividad (K_{cat}), para aumentar las velocidades de reacción enzimática para conseguir el flujo deseado; niveles de expresión, para aumentar los rendimientos de proteínas y de flujo ruta general; estabilidad de oxígeno, para el funcionamiento de las enzimas sensibles al aire en condiciones aerobias; y la actividad anaeróbica, para el funcionamiento de una enzima aeróbica en la ausencia de oxígeno.

Un número de métodos ilustrativos se han desarrollado para la mutagénesis y la diversificación de los genes para orientar las propiedades deseadas de enzimas específicas. Tales métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Cualquiera de estos puede ser utilizado para alterar y/o optimizar la actividad de una enzima o proteína de ruta de 4-HB, 4-HBal, 4-HBCoA, BDO o putrescina. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a EpPCR, que introduce mutaciones aleatorias de punto mediante la reducción de la fidelidad de la ADN polimerasa en las reacciones de PCR (Pritchard et al., J. Theor. Biol. 234:497-

509 (2005)); Amplificación del Circulo de Rodamiento Propenso a errores (epRCA), que es similar a epPCR excepto que un plásmido circular entero se utiliza como modelo y 6-mers aleatorias de los vínculos con exonucleasa tiofosfato resistentes a los 2 últimos nucleótidos se utilizan para amplificar el plásmido seguido por transformación en células en las que el plásmido es re-circularizado a las repeticiones aleatorias (Fujii et al., Nucleic. Acids Res. 32: e145 (2004), y Fujii et al., Nat. Protoc. 1:2493-2497 (2006)); ADN o de la Combinación familiar, que generalmente implica la digestión de dos o más genes variantes con nucleasas, tales como DNasaI o EndoV para generar un conjunto de fragmentos aleatorios que se reensamblaran por ciclos de recocido y la extensión en la presencia de la ADN polimerasa para crear una biblioteca de genes quiméricos (Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 91:10747-10751 (1994), y Stemmer, Nature 370:389-391 (1994)); extensión escalonada (StEP), lo que implica cebado de modelo seguido por ciclos repetidos de PCR de 2 pasos con la desnaturalización y la duración muy corta de recocido/extensión (tan corto como 5 segundos) (Zhao et al., Nat. Biotechnology 16:258-261 (1998)); recombinación de cebado aleatorio (RPR), en el que la secuencia de los cebadores aleatorios se utilizan para generar muchos fragmentos cortos de ADN complementarios a los diferentes

segmentos de la plantilla (Shao et al., Nucleic. Acids Res. 26:681-683 (1998)).

Los métodos adicionales incluyen recombinación heterodúplex, en el cual ADN de plásmido linealizado se utiliza para formar heterodúplex que se reparan por reparación de genes (Volkov et al., Nucleic. Acids Res. 27: EL8 (1999); y Volkov et al., Methods Enzymol. 328:456 -463 (2000)); Chimeragenesis aleatorio en plantillas de transitorios (RACHITT), que emplea a la fragmentación de ADNasa I y fraccionamiento de ADN de cadena sencilla (ssDNA) (Coco y otros, Nat. Biotechnology 19:354-359 (2001)); la extensión recombinada en plantillas truncadas (RETT), lo que implica plantilla de conmutación de hebras unidireccionalmente crecientes de cebadores en la presencia de fragmentos de ssDNA unidireccionales utilizados como una piscina de plantillas (Lee et al. J. Molec. Catalysis 26: 119-129 (2003)); oligonucleótido degenerado de intercambio de genes (DOGS), en los que cebadores degenerados se utilizan para controlar la recombinación entre las moléculas; (Bergquist y Gibbs, Methods Mol. 352: 191-204 (2007); Bergquist et al, Biomol. Eng. 22:63-72 (2005), Gibbs et al, Gene 271: 13-20 (2001)); el truncamiento incremental para la creación de enzimas híbridas (ITCHY), que crea una biblioteca combinatoria con la supresión de pares de bases de un gen o fragmento de gen de interés (Ostermeier et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. E.U.A. 96:3562-3567 (1999), y Ostermeier y otros, Nat Biotechnology 17: 1205-1209 (1999)), tio-incremental para el truncamiento de creación de enzimas híbridas (THIO-ITCHY), que es similar a ITCHY excepto que fosfotioato dNTPs se utiliza para generar truncamientos (Lutz et al., Nucleic Acids. Res. 29: E16 (2001)); SCRATCHY, que combina dos métodos de genes recombinantes, ITCHY y transposición de ADN (Lutz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 98: 11248 a 11253 (2001)); Mutagénesis de intercambio aleatorio (RNDM), en el que las mutaciones realizadas a través de epPCR van seguidas de detección/selección para las actividades de retención utilizables (Bergquist et al., Biomol. Ing. 22:63-72 (2005)); Mutagénesis de secuencias de saturación (SESAM), un método de mutagénesis aleatoria que genera un conjunto de fragmentos de longitud aleatoria mediante la incorporación aleatoria de un nucleótido fosfotioato y escisión, que se utiliza como una plantilla para extenderse en la presencia de bases "universales" tales como inosina y de replicación de un complemento de inosina que contiene la base da incorporación aleatoria y, en consecuencia, la mutagénesis (Wong et al., J. Biotechnol. 3:74-82 (2008), Wong et al., Nucleic. Acids Res. 32: e26 (2004), y Wong et al., Anal. Biochem. 341: 187-189 (2005)); Combinacion Sintética, que se utiliza superposición de oligonucleótidos diseñados para codificar "toda la diversidad genética en los objetivos" y permite una alta

diversidad de combinaciones de progenies (Ness et al., Nat. Biotechnology 20: 1251-1255 (2002)); Intercambio de Tecnología de nucleótidos y Escisión Siguiente, que explota una combinación de incorporación dUTP seguido de tratamiento con uracilo ADN glicosilasa y luego piperidina para realizar la fragmentación del ADN extremo (Muller et al., Nucleic Acids Res. 33: e117 (2005)).

Otros métodos incluyen homología de recombinación de proteínas independiente de la secuencia (SHIPREC), en el que se utiliza un entrelazador para facilitar la fusión entre dos genes lejanamente relacionados o no, y una serie de quimeras se genera entre los dos genes, dando como resultado en las bibliotecas de híbridos de un solo cruce (Sieber y col., Nat. Biotechnol. 19:456-460 (2001)); sitio Gene mutagénesis de saturación™ (GSSM™), en el que los materiales de partida incluyen un plásmido de ADN bicatenario superenrollado (dsDNA) que contiene un inserto y dos cebadores que se degeneran en el sitio deseado de mutaciones (Kretz et al., Methods Enzymol. 388:3-11 (2004)); Mutagénesis de Combinación de Casete (MCP), que implica el uso de casetes cortos de oligonucleótidos para reemplazar las regiones aleatorias limitadas con un gran número de posibles alteraciones de la secuencia de aminoácidos (Reidhaar-Olson et al-. Methods Enzymol 208:564-586 (1991); Y Reidhaar Olson- y otros, Science 241:53-57 (1988)); mutagénesis combinatoria

de múltiple casetes (CMCM), que es esencialmente similar al MCP y utiliza epPCR a una alta velocidad de mutación para identificar los puntos calientes y las regiones calientes y luego de la extensión por CMCM para cubrir una región definida del espacio de secuencias de proteínas (Reetz et al., Angew Chem. Int. Ed. Engl 40:3589-3591 (2001)); la técnica de mutación de cepas, en las que los plásmidos mutadores condicionales ts, utilizan el gen que codifica mutD5 una subunidad mutante de la ADN polimerasa III, para permitir un aumento de 20 a 4000-X en la frecuencia de mutación aleatoria y selección natural durante la acumulación y el bloque de mutaciones perjudiciales cuando no se requiere la selección (Selifonova et al., Appl. Environ. Microbiol. 67: 3645-3649 (2001)), Low et al, J. Mol. Biol. 260:359-3680 (1996)).

Otros métodos incluyen Mutagénesis de Visión (LTM), que es un método de mutagénesis multidimensional que evalúa y optimiza las mutaciones combinatorios de aminoácidos seleccionados (Rajpal et al., Proc. Natl. Acad. E.U.A. 102:8466-8471 (2005)); reensamble de genes, que es un método de combinación de ADN que se puede aplicar a múltiples genes en un tiempo o para crear una gran biblioteca de quimeras (mutaciones múltiples) de un solo gen (sintonizable GeneReassembly ™ (TGR™) Tecnología suministrada por Verenium Corporation), en la automatización de diseño en computadora

de Proteínas (PDA), que es un algoritmo de optimización que ancla el esqueleto de la proteína estructuralmente definido que tiene un pliegue en particular y el espacio búsquedas secuencia de sustituciones de aminoácidos que pueden estabilizar la energética de proteínas veces y, en general, y en general funciona con más eficacia en las proteínas conocidas con estructuras tridimensionales (Hayes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 99: 15926-15931 (2002)) y mutagénesis de saturación iterativa (ISM), que implica el uso de conocimiento de la estructura/función para elegir un sitio probable para la mejora de la enzima, la modalidad de mutagénesis de saturación en el sitio elegido mediante un método de mutagénesis como Stratagene QuikChange (Stratagene, San Diego, CA), la detección/selección de las propiedades deseadas, y, uso de clon mejorado, empezando de nuevo en otro sitio y seguir repitiendo hasta una actividad deseada (Reetz et al., Nat. Protoc. 2:891-903 (2007); y Reetz et al., Angew Chem. Int. Ed. Engl. 45:7745-7751 (2006)).

Cualquiera de los métodos antes mencionados para la mutagénesis puede ser utilizado solo o en cualquier combinación. Además, cualquiera o una combinación de los métodos dirigidos evolución pueden ser utilizados junto con las técnicas de evolución adaptativa, como se describe en la presente.

Se entiende que las modificaciones que no afecten sustancialmente a la actividad de las diversas modalidades de esta invención también se proporcionan en la definición de la invención como se describe en la presente. En consecuencia, los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no se limitan la presente invención.

EJEMPLO I

Biosíntesis de ácido 4-hidroxibutanoico

En este ejemplo se describen vías bioquímicas ilustrativas para la producción de 4-HB.

Los informes anteriores de síntesis de 4-HB en microbios se han centrado en este compuesto como un intermedio en la producción del plástico biodegradable de poli-hidroxialcanoato (PHA) (Patente de E.U.A. No. 6,117,658). El uso de copolímeros 4-HB/3-HB sobre polímero poli-3-hidroxibutirato (PHB) puede dar como resultado plástico que es menos frágil (Saito y Doi, Intl. J. Biol. Macromol. 16:99-104 (1994)). La producción de monómero 4-HB aquí descrita es un proceso fundamentalmente diferente por varias razones: (1) el producto es secretado, en oposición a PHA que se produce intracelularmente y se mantiene en la célula, (2) para los organismos que producen polímeros hidroxibutanoato, libre 4-HB no se produce, sino más bien la

coenzima Un derivado es utilizado por la polihidroxialcanoato sintasa; (3) en el caso del polímero, la formación de los cambios de productos granulares termodinámica, y (4) pH extracelular no es un problema para la producción del polímero, mientras que afectará si 4-HB está presente en el ácido libre o base conjugada y también el equilibrio entre 4-HB y GBL.

4-HB se puede producir en dos etapas de reducción enzimática de succinato, un metabolito central del ciclo de Krebs, con semialdehído succínico como el intermediario (Figura 1). La primera de estas enzimas, semialdehído succínico deshidrogenasa, es nativa de muchos organismos, incluyendo E. coli, en el que tanto las enzimas NADH-NADPH-dependiente, y se han encontrado (Donnelly y Cooper., Eur. J. Biochem. 113:555-561 (1981); Donnelly y Cooper J. Bacteriol 145: 1425-1427 (1981); Marek y Henson J. Bacteriol. 170:991-994 (1988)). También hay evidencia de actividad de apoyo succínico deshidrogenasa semialdehído en S. cerevisiae (Ramos et al., Eur. J. Biochem. 149:401-404 (1985)) y un gen putativo ha sido identificada por homología de secuencia. Sin embargo, la mayoría de los informes indican que esta enzima producto en la dirección de la síntesis de succinato, como se muestra en la Figura 1 (Donnelly y Cooper, supra; Lütke-Eversloh y Steinbüchel, FEMS Microbiol Lett. 181:63-71 (1999)), participando en la ruta de degradación de 4-HB y

gamma-aminobutirato. El semialdehído succínico también se produce naturalmente por ciertos organismos microbianos tales como E. coli a través del ciclo TCA intermedio un α-cetogluterato través de la acción de dos enzimas: glutamato: semialdehído succínico transaminasa y glutamato decarboxilasa. Una ruta alternativa, utilizado por el Clostridium kluyveri anaerobio obligado para degradar succinato, succinato activo a succinil-CoA, a continuación, convierte succinil-CoA a semialdehído succínico utilizando una alternativa de semialdehído succínico deshidrogenasa que se sabe que funciona en esta dirección (Sohling y Gottschalk, Eur. J. Biochem 212: 121-127 (1993)). Sin embargo, esta ruta tiene el costo energético del ATP necesario para convertir succinato a succinil-CoA.

La segunda enzima de la ruta, 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, no es nativo de E. coli o la levadura, pero se encuentra en varias bacterias como C. kluyveri y Ralstonia eutropha (Lütke-Eversloh y Steinbüchel, supra; Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996), Valentín y otros, Eur. J. Biochem. 227:43-60 (1995); Wolff y Kenealy, Proteína Expr Purif 6:206-212 (1995)). Estas enzimas son conocidas por ser dependientes de NADH, aunque también existen formas dependientes de NADPH. Una ruta adicional a 4-HB de alfa-cetoglutarato se demostró en E. coli como resultado la acumulación de poli ácido (4-hidroxibutírico)

(Song et al., Wei Sheng Wu Xue. Bao. 45:382-386 (2005)). La cepa recombinante requiere la sobreexpresión de tres genes heterólogos, PHA sintasa (R. eutropha), 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (R. eutropha) y 4-hidroxibutirato: CoA transferasa (C kluyveri), junto con dos genes nativos de E. coli: el glutamato semialdehído succínico transaminasa y glutamato decarboxilasa. Los pasos 4 y 5 en la Figura 1, alternativamente, pueden llevarse a cabo por una alfa-cetoglutarato descarboxilasa tales como el identificado en Euglena gracilis (Shigeoka y otros, Biochem. J. 282 (Pt2):319-323 (1992); Shigeoka y Nakano, Arch. Biochem Biophys 288:22-28 (1991). ; Shigeoka y Nakano, Biochem. J. 292 (Pt 2):463-467 (1993)). Sin embargo, esta enzima no ha sido previamente aplicada a impactar en la producción de 4-HB o polímeros relacionados en cualquier organismo.

Las capacidades de producción microbiana de 4-hidroxibutirato fueron exploradas en dos microbios, Escherichia coli y Saccharomyces cerevisiae, utilizando modelos de computadora metabólicos de cada organismo. Las rutas posibles para que 4-HB proceda a través de un succinato, succinil-CoA, o intermedio alfa-cetoglutarato como se muestra en la Figura 1.

Un primer paso en la ruta de producción de 4-HB de succinato implica la conversión de succinato a semialdehído succínico a través de una semialdehído succínico NADH- o NADPH-dependiente deshidrogenasa. En E. coli, gabD es un semialdehído succínico dependiente de NADP deshidrogenasa y es parte de un grupo de genes implicados en absorción y degradación de 4-aminobutirato (Niegemann et al., Arch. Microbiol. 160:454-460 (1993); Schneider et al., J. Bacteriol. 184:6976-6986 (2002)). Se cree que *sad* codifica la enzima para actividad de semialdehído succínico NAD-dependiente deshidrogenasa (Marek y Henson, supra). S. cerevisiae contiene sólo el semialdehído succínico dependiente de NADPH deshidrogenasa, supuestamente asignado a UGA2, que se localiza en el citosol (Huh et al., Nature 425:686-691 (2003)). Los cálculos de rendimiento máximo, asumiendo la ruta del succinato a 4-HB en E. coli y S. cerevisiae sólo requiere la suposición de que se ha añadido un 4-HB-deshidrogenasa a sus redes metabólicas no nativas.

La ruta de succinil-CoA a 4-hidroxibutirato fue descrita en la Patente de E.U.A. No. 6,117,658 como parte de un proceso para formar polihidroxialcanoatos que comprenden unidades monoméricas de 4-hidroxibutirato. Clostridium kluyveri es un organismo ilustrativo, se sabe que posee actividad de semialdehído succínico CoA-dependiente deshidrogenasa (Sohling y Gottschalk, supra; Sohling y

Gottschalk, supra). En este estudio, se supone que esta enzima, de C. kluyveri u otro organismo, se expresa en E. coli o S. cerevisiae junto con un 4-HB-deshidrogenasa no nativo o heterólogo para completar la ruta de succinil-CoA a 4-HB. La ruta de alfa-cetoglutarato a 4-HB se demostró en E. coli como resultado la acumulación de poli (4-hidroxibutírico) al 30% del peso seco celular (Song et al., Supra). Dado que E. coli y S. cerevisiae nativos o endógenos poseen tanto glutamato: semialdehído succínico transaminasa y glutamato descarboxilasa (Coleman et al., J. Biol. Chem. 276:244-250 (2001)), la ruta de AKG a 4-HB se puede completar en ambos organismos asumiendo que sólo uno 4-HB deshidrogenasa no nativo está presente.

Ejemplo II

Biosíntesis de 1,4-butanodiol y succinato de alfa-cetoglutarato

Este ejemplo ilustra la construcción de la producción y biosíntesis de 4-HB y BDO a partir de organismos microbianos. Las rutas de 4-HB y BDO se describen en este documento.

Hay varias enzimas alternativas que pueden ser utilizadas en la ruta descrita anteriormente. La enzima nativa o endógena para la conversión de succinato a succinil-CoA (Paso 1 en la Figura 1) puede ser sustituida por una

transferasa, como la codificada por el gen cat1 de C. kluyveri (Sohling y Gottschalk, Eur. J. Biochem. 212 CoA: 121-127 (1993)), que funciona de una manera similar a la del Paso 9. Sin embargo, la producción de acetato por esta enzima puede no ser óptima, como podría ser secretada en lugar de ser convertida de nuevo a acetil-CoA. A este respecto, también puede ser benéfico para eliminar la formación de acetato en el Paso 9. Como una alternativa a esta CoA transferasa, un mecanismo puede ser empleado en el cual 4-HB se fosforila primero por ATP y luego se convierte en el derivado CoA, similar a la ruta de acetato quinasa/fosfotransacetilasa en E. coli para la conversión de acetato a acetil-CoA. El costo neto de esta ruta es un ATP, que es el mismo que se requiere para regenerar acetil-CoA a partir de acetato. Las enzimas fosfotransbutirilasa (ptb) y el butirato cinasa (BK) son conocidas por llevar a cabo estos pasos en las moléculas no hidroxiladas para la producción de butirato en C. acetobutylicum (Cary et al., Appl. Environ. Microbiol. 56:1576-1583 (1990), San Valentín, RC y RS Wolfe, J. Biol. Chem. 235: 1948-1952 (I960)). Estas enzimas son reversibles, permitiendo que proceda la síntesis en la dirección de 4-HB.

BDO también puede producirse mediante α-cetoglutarato, además de o en lugar de a través de succinato. Como es descrito anteriormente y ejemplificado más adelante,

una ruta para llevar a cabo la biosíntesis de producto se encuentra con la producción de semialdehído succínico través α-cetoglutarato utilizando las enzimas endógenas (Figura 1, Pasos 4-5). Una alternativa es utilizar una α-cetoglutarato descarboxilasa que puede realizar esta conversión en un paso (Figura 1, Etapa 8; Tian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102. 10670-10675 (2005)).

Para la construcción de diferentes cepas de BDO productores de organismos microbianos, una lista de genes aplicables se ensambló para la corroboración. En pocas palabras, uno o más genes dentro de la ruta de 4-HB y/o BDO biosintéticas se identificaron para cada paso de la ruta completa de BDO productor que se muestra en la Figura 1, utilizando los recursos disponibles en la literatura, la base de datos de genética de NCBI y búsquedas de homología. Los genes clonados y evaluados en este estudio se presentan a continuación en la Tabla 6, junto con las referencias y citas apropiadas de URL a la secuencia del polipéptido. Como se discute más adelante, algunos genes se sintetizaron para la optimización de codón, mientras que otros fueron clonados mediante PCR a partir del ADN genómico del organismo nativo o de tipo silvestre. Para algunos genes se han aplicado ambos métodos y en este caso los genes nativos están indicados por un sufijo "n" en el número de identificación del gen cuando

se utiliza en un experimento. Nótese que sólo las secuencias de ADN son diferentes; las proteínas son idénticas.

Tabla 6. Genes expresados en organismos microbianos productores de BDO huésped

No. de ID de genes	Núm. de Reacción (Fig. 1)	Nombre de Gen	Organismo fuente	Nombre de enzima	Enlace a secuencia de proteína	Referencia
0001	9	Cat2	*Clostridium kluyveri* DSM 555	4-hidroxibutirato coenzima A transferasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=1228100	1
0002	12/13	adhE	*Clostridium acetobutylicu m* ATCC 824	Aldehído/ alcohol deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=15004739	2
0003	12/13	adhE2	*Clostridium acetobutylicu m* ATCC 824	Aldehído/ alcohol deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_149325.1	2
0004	1	Catl	*Clostridium kluyveri* DSM 555	Succinato coenzima A transferasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=1228100	1
0008	6	sueD	*Clostridium kluyveri* DSM 555	Semialdehído succínico deshidrogenasa (CoA-dependiente)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=1228100	1
0009	7	4-HBd	*Ralstonia eutropha* H16	4-hydrox ybutyrate deshidrogenasa (NAD-dependiente)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=YP_726053.1	2
0010	7	4-HBd	*Clostridium kluyveri* DSM 555	4-hydrox ybutyrate deshidrogenasa (NAD-dependiente)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=1228100	1
0011	12/13	adhE	*E. coli*	Aldehído/ alcohol deshidrogenasa	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/genes.List.DetailAction.do?fromListFlag=true&featureType=l&orfld=l219	
0012	12/13	yqhD	*E. coli*	Aldehído/ alcohol deshidrogenasa	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/genes.List.DetailAction.do	
0013	13	bdhB	*Clostridium acetobutylicu m* ATCC 824	Butanol deshidrogenasa II	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_349891.1	2
0020	11	ptb	*Clostridium acetobutylicu m* ATCC 824	Fosfo- transbutirilasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=15896327	2
0021	10	bukl	*Clostridium acetobutylicu m* ATCC 824	Butirato cinasa I	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=20137334	2
0022	10	buk2	*Clostridium acetobutylicu m* ATCC 824	Butirato cinasa II	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=20137415	2

0023	13	adhEm	Aislado de metabanco de consorcio microbiano digestor de residuos anaerobios	Alcohol deshidrogenasa		(37)d]
0024	13	adhE	*Clostridium thermocellum*	Alcohol deshidrogenasa	www.genome.jp/dbget-bin/www bget?cth:Cthe 0423	
0025	13	ald	*Clostridium beijerinckii*	Coenzima A-acilación de Aldehído	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=49036681	(3l)d]
0026	13	bdhA	*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824	Butanol deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_349892.1	2
0027	12	bld	*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*	Butiraldehído deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=31075383	4
0028	13	bdh	*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*	Butanol deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=124221917	4
0029	12/13	adhE	*Clostridium tetani*	Aldehído/ alcohol deshidrogenasa	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ctc:CTCO1366	
0030	12/13	adhE	*Clostridium perfringens*	Aldehído/ alcohol deshidrogenasa	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cpe:CPE2531	
0031	12/13	adhE	*Clostridium difficile*	Aldehído/ alcohol deshidrogenasa	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cdf:CD2966	
0032	8	sueA	*Mycobacterium bovis* BCG, Pasteur	a-cetoglutarato decarboxilasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=YP_977400.1	5
0033	9	cat2	*Clostridium aminobutyricurn*	4-hydrox ybutyrate coenzima A transferasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=6249316	
0034	9	cat2	*Porphyromonas gingiva/is* W83	4-hidroxibutirato coenzima A transferasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=34541558	
0035	6	sueD	*Porphyromonas gingiva/is* W83	Semialdehído succinicodeshidrogenasa (CoA-dependiente)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_904963.1	
0036	7	4-HBd	*Porphyromonas gingiva/is* W83	NAD-dependiente 4-hidroxibutirato deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_904964.1	
0037	7	gbd	Bacterias no cultivadas	4-hidroxibutirato deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=5916168	6
0038	1	sueCD	*E. coli*	Succinil-CoA sintetasa	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/genes.List.DetailAction.do	

[1]Sohling and Gottschalk, *Eur. J. Biachem.* 212:121-127 (1993); Sohling and Gottschalk, *J. Bacterial.* 178:871-880 (1996)

[2]Nolling et al., J., *J. Bacterial.* 183:4823-4838 (2001)

[3]Pohlmann et al., *Nat. Biatechnal.* 24:1257-1262 (2006)

[4]Kosaka et al., *Biasci. Biatechnal. Biachem.* 71:58-68 (2007)

[5]Brosch et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:5596-5601 (2007)

[6]Henne et al., *Appl. Environ. Microbial.* 65:3901-3907 (1999)

La construcción del vector de expresión de ruta de BDO. La estructura de la base de vectores y cepas se obtuvieron algunas a partir Dr. Rolf Lutz de Expressys (www.expressys.de/). Los vectores y cepas se basan en el sistema de expresión pZ desarrollado por el Dr. Rolf Lutz y Prof. Hermann Bujard (Lutz, R. y H. Bujard, Nucleic Acids Res. 25: 1203-1210 (1997)). Los vectores obtenidos fueron pZE131uc, pZA331uc, pZS* 131uc y pZE221uc y que contuvieron el gen de luciferasa como un fragmento de inserto. Para reemplazar el fragmento empleado de luciferasa con un fragmento de lacZ-alfa flanqueado por sitios de enzimas de

restricción apropiadas, el fragmento empleado de luciferasa se separó primero de cada vector por digestión con EcoRI y XbaI. El fragmento lacZ-alfa fue amplificado por PCR a partir de pUC19 con los siguientes cebadores:

lacZalfa-RI

5'GACGAATTCGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGTCCAATTCACTGGCCGTCGTTTTAC3'

lacZalfa 3'BB

5'-GACCCTAGGAAGCTTTCTAGAGTCGACCTATGCGGCATCAGAGCAGA-3'

Esto generó un fragmento con un extremo 5' del sitio EcoRI, sitio Nhel, un sitio de unión ribosómico, un sitio de SalI y el codón de iniciación. En el extremo 3' del fragmento contuvo el codón de tope, XbaI, HindIII y los sitios Avrll. El producto de PCR se digirió con EcoRI y Avrll y se ligó en los vectores base digeridos con EcoRI y XbaI (XbaI y Avrll tienen extremos compatibles y generar un no ensitio). Debido a que los sitios de enzimas de restricción Nhel y XbaI generan extremos compatibles que pueden ligarse juntos (pero generan una Nhel/XbaI no en sitio que no es digerido por cualquiera enzima), los genes clonados en los vectores podría ser "Biotapiados" juntos (Http://openwetware.org/wiki/Synthetic Biology: BioBricks). En resumen, este método permite unirse a un número ilimitado de genes en el vector usando los mismos 2 sitios de restricción (siempre y cuando los sitios no aparezcan dentro

de los genes), porque los sitios entre los genes son destruidos después de cada adición.

Todos los vectores tienen la designación pZ seguida por letras y números de la indicación del origen de replicación, marcador de resistencia a antibióticos y el promotor/unidad reguladora. El origen de replicacción es la segunda letra y se denota por E para orígenes basados en ColE1, A para p15A y S para pSC101. El primer número representa el marcdor de resistencia a antibióticos (1 para ampicilina, 2 para canamicina, 3 para cloranfenicol, 4 para espectinomicina y 5 para Tetraciclina). El número final define el promotor que reguló el gen de interés (1 para $P_{Ltet\ 0-1}$, 2 para $P_{Llac0-1}$, 3 para $P_{LHac0-1}$ y 4 para $P_{lac/ara-1}$). MCS y el gen de interés se meustra en seguida. Para el trabajo tratado en la presente se emplearon dos vectors de base, pZA33 y pZE13, modificados para los insertos de biotabiques como se trató antes. Una vez que los genes de intres se han clonado en ellos, los plásmidos resultantes se indican usando los códigos de genes de cuatro dígitos dados en la Tabla 6; por ejemplo, pZA33-XXXX-YYYY-...

Construcción de Cepa Huésped. La cepa madre en todos los estudios aquí descritos es E. coli K-12 cepa MG1655. Cepas de supresión sin marcador en adhE, gabD y aldA fueron construidos bajo contrato de servicio por un tercero utilizando el método de redET (Datsenko, K.A. y Wanner B.L.,

Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 97:6640-6645 (2000)). Las cepas posteriores se construyeron a través de la transducción mediada por bacteriófagos PI (Miller, J. Los experimentos en genética molecular, Laboratorios Cold Spring Harbor, Nueva York (1973)). La Cepa C600Z1 (laci^{q}, PN25-tetR, Sp^{R}, lacYl, leuB6, mcrB+, supE44, thi-1, thr-1, tonA21) se obtuvo de Expressys y se utilizó como una fuente de un alelo lac1^{q} para la transducción de PI. El Bacteriófago Plvir se cultivó en E. coli cepa C600Z1, que tiene el gen de resistencia a la espectinomicina ligada a la lac1^{q}. El lisado PI desarrollado en C600Z1 se utilizó para infectar MG1655 con selección para && la resistencia a la espectinomicina. Las colonias resistentes a la espectinomicina se seleccionaron entonces para la laclq vinculado mediante la determinación de la capacidad de los transductantes para reprimir la expresión de un gen relacionado con un promotor $PA_{IIac0-1}$. La cepa resultante se designó MG1655 lac1^{q}. Un procedimiento similar se utilizó para introducir lacI^{Q} en las cepas de supresión.

Producción de 4-HB de Succinato. Para la construcción de un productor de succinato de 4-HB, los genes que codifican los pasos de succinato de 4-HB y 4-HB-CoA (1, 6, 7, y 9 en la Figura 1) se montan en los vectores pZA33 y pZE13 como se describen a continuación. Varias combinaciones de genes fueron evaluados, así como construcciones que llevan las rutas incompletas como controles (Tablas 7 y 8). Los

plásmidos se transformaron entonces en cepas huésped que contienen lacI^{Q}, que permiten la expresión inducible por adición de isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG). Tanto de tipo silvestre y los anfitriones con supresiones en los genes que codifican la deshidrogenasa nativa semialdehído succínico (paso 2 en la Figura 1) fueron probadas.

La actividad de las enzimas heterólogas se probaron en ensayos in vitro, utilizando la cepa MG1655 lacI^{Q} como huésped de las construcciones de plásmidos que contienen los genes de la ruta. Las células se cultivaron aeróbicamente en medio LB (Difco) que contiene los antibióticos apropiados para cada construcción, e inducida por adición de IPTG a 1 mM cuando la densidad óptica (OD600) alcanzó aproximadamente 0.5. Las células se recogieron a las 6 horas y los ensayos enzimáticos llevados a cabo como se discute a continuación.

Ensayos enzimáticos in vitro. Para obtener extractos crudos para ensayos de actividad, las células fueron cosechadas por centrifugación a 4,500 rpm (Beckman-Coulter, Allegera X-15R) durante 10 min. Los sedimentos se resuspendieron en 0.3 ml BugBuster (Novagen) reactivo con benzonasa y la lisozima y la lisis procedió durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. El lisado libre de células se obtuvo por centrifugación a 14,000 rpm (centrífuga Eppendorf 5402) durante 30 min a 4°C. Proteína de la célula en la muestra se determinó utilizando el método de

Bradford et al., Anal. Biochem. 72:248-254 (1976) y los ensayos enzimáticos específicos se llevaron a cabo como se describe a continuación. Las actividades se informaron en unidades/mg de proteína, donde se define una unidad de actividad como la cantidad de enzima requerida para convertir 1 μmol de sustrato en 1 min. a temperatura ambiente. En general, los valores reportados son medias de al menos 3 ensayos duplicados.

Succinil-CoA transferasa (cat1) se determinó la actividad mediante el control de la formación de acetil-CoA a partir de succinil-CoA y acetato, siguiendo un procedimiento previamente descrito Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996). Succinil-CoA sintetasa (SucCD) se determinó la actividad siguiendo la formación de succinil-CoA de succinato y CoA en presencia de ATP. El experimento siguió un procedimiento descrito por Cha y los parques, J. Biol. Chem. 239: 1961-1967 (1964). El succinato semialdehído CoA-dependiente deshidrogenasa (SucD) se determinó la actividad siguiendo la conversión de NAD a NADH a 340 nm en la presencia de succinato semialdehído y CoA (Sohling y Gottschalk, Eur. J. Biochem. 212: 121-127 (1993)). 4-HB-deshidrogenasa (4-HBD) la actividad enzimática se determinó mediante el control de la oxidación del NADH en NAD a 340 nm en la presencia de succinato semialdehído. El experimento siguió un procedimiento publicado Gerhardt et al., Arch.

Microbiol. 174: 189-199 (2000). 4-HB-CoA transferasa (cat2) actividad se determinó utilizando un procedimiento modificado de Scherf y Buckel, Appl. Medio Ambiente. Microbiol. 57:2699-2702 (1991). La formación de la formación de 4-HB-CoA o butirilo-CoA a partir de acetil-CoA y HB-4 o butirato se determinó utilizando HPLC.

El alcohol (ADH) y aldehído (ALD) deshidrogenasa se ensayaron en la dirección reductora usando un procedimiento adaptado de varias fuentes bibliográficas (Dürre et al, FEMS Microbiol Rev. 17:251-262 (1995);.. Palosaari y Rogers, J. Bacteriol. 170:2971-2976 (1988) y Welch et al., Arch Biochem Biophys. 273:309-318 (1989). La oxidación del NADH es seguida por la lectura de la absorbancia a 340 nM cada cuatro segundos para un total de 240 segundos a temperatura ambiente Los ensayos se realizaron en reductivos 100 mM MOPS (ajustado a pH 7.5 con KOH), 0.4 mM de NADH, y 1 a 50 μl de extracto celular La reacción se inició mediante la adición de los reactivos siguientes: 100 μl de 100 mM de acetaldehído o butiraldehído para ADH, o 100 μl de 1 mM de acetil-CoA o butirilo-CoA para ALD. El espectrofotómetro se blanqueó rápidamente y luego la lectura se inicia cinética. La pendiente resultante de la reducción en la absorbancia a 340 nm por minuto, junto con el coeficiente de extinción molar de NAD (P) H a 340 nm (6000) y la concentración del extracto de

proteína, se puede utilizar para determinar la actividad específica.

La actividad enzimática de ptb se mide en la dirección de butirilo-CoA a butiril-fosfato, como se describe en Cary et al., J. Bacteriol. 170:4613-4618 (1988). Se proporciona fosfato inorgánico para la conversión y sigue el aumento de CoA libre con el reactivo de 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico), o DTNB. El DTNB reacciona rápidamente con los grupos tiol, tales como CoA libre para liberar el color amarillo de ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico (TNB), que absorbe a 412 nm con un coeficiente de extinción molar de 14.140 cm M^{-1}. La solución reguladora de ensayo contuvo 150 mM de fosfato de potasio a pH 7.4, 0.1 mM de DTNB y 0.2 mM de butirilo-CoA y la reacción se inició mediante la adición de 2 a 50 µl de extracto celular. La actividad enzimática de BK se mide en la dirección de butirato de butirilo-fosfato formación a expensas de ATP. El procedimiento es similar al ensayo de acetato quinasa descrito previamente Rose et al., J. Biol. Chem. 211:737-756 (1954). Sin embargo, hemos encontrado otro protocolo de ensayo de enzima acetato quinasa proporcionado por Sigma es más útil y sensible. Esta conversión de enlaces de ensayo de ATP en ADP por acetato quinasa para la conversión de ADP y fosfoenol piruvato (PEP) ligado para ATP y piruvato por la piruvato quinasa, seguido por la conversión de piruvato y NADH a lactato y NAD+ por la

deshidrogenasa láctica. La sustitución de butirato de acetato es la única modificación importante para permitir el ensayo para evaluar la actividad de enzima BK. La mezcla de ensayo contuvo 80 mM de solución reguladora de trietanolamina a pH 7.6, 200 mM butirato sódico, 10 mM $MgCl_2$, 0.1 mM de NADH, 6.6 mM ATP, 1.8 mM de fosfoenolpiruvato. El piruvato quinasa, lactato deshidrogenasa y miocinasa se añadieron según las instrucciones del fabricante. La reacción se inició mediante la adición de 2 a 50 µl ·de extracto celular y la reacción se controló con base en la disminución de absorbancia a 340 nm, indicando la oxidación del NADH.

Análisis de Derivados de CoA por HPLC. Un ensayo basado en HPLC fue desarrollado para controlar las reacciones enzimáticas que implican coenzima A (CoA) de transferencia. El método desarrollado permite la caracterización actividad de la enzima por determinación cuantitativa de CoA, acetil-CoA (AcCoA), butirilo CoA (BuCoA) y 4-hidroxibutirato CoA (4-HBCoA) presentes en las mezclas de reacción in vitro. Se logró la sensibilidad descendente para µM baja, así como una excelente resolución de todos los derivados de CoA de interés.

La preparación química y la muestra se realizaron como sigue. En pocas palabras, CoA, AcCoA, BuCoA y todas las otras sustancias químicas, se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Los disolventes, metanol y acetonitrilo, fueron de grado de

HPLC. Las curvas de calibración de calibración mostraron una excelente linealidad en el rango de concentración de 0.01 lmg/ml. Las mezclas enzimáticas de reacción contuvo 100mM Tris HCl (pH 7), se tomaron alícuotas a diferentes puntos de tiempo, se extinguió con ácido fórmico (0.04% de concentración final) y directamente analizaron por HPLC.

El análisis por HPLC se realizó utilizando un sistema de HPLC Agilent 1100 equipado con una bomba binaria, desgasificador, inyector automático regulable y un compartimento de columna y detector de diodos (DAD), se utilizó para el análisis. Una columna de fase inversa, 100 5um C18 Kromasil, 4.6x150mM (Peeke Científica), fue empleado. Fosfato de potasio 25 mM (pH 7) y metanol o acetonitrilo, fueron utilizados como disolventes acuosos y orgánicos en régimen de flujo 1 ml/min. Dos métodos se desarrollaron: una un corto con un gradiente más rápido para el análisis de bien resueltas CoA, AcCoA y BuCoA, y un método para distinguir por elución más estrecha entre AcCoA y 4-HBCoA. El método corto empleado por gradiente de acetonitrilo (0 min-5%, 6 min-30%, 6.5 min-5%, 10 min-5%) y dio lugar a los tiempos de retención 2.7, 4.1 y 5.5 min de CoA, AcCoA y BuCoA, respectivamente. En el método de metanol largo se utilizó con el siguiente gradiente lineal: 0 min-5%, 20 min-35%, 20.5 min-5%, 25 minutos-5%. Los tiempos de retención en el COA, AcCoA, 4 HBCoA y BuCoA fueron 5.8, 8.4, 9.2 y 16.0 min,

respectivamente. El volumen de inyección fue 5μL, temperatura de la columna de 30°C absorbancia y UV fue controlada a 260 nm.

Los resultados demostraron actividad de cada uno de los cuatro pasos de la ruta (Tabla 7), aunque la actividad depende claramente de la fuente del gen, la posición del gen en el vector, y el contexto de otros genes con las que se expresa. Por ejemplo, el gen codifica una deshidrogenasa 0035 semialdehído succínico que es más activo que la codificada por 0008, y 0036 y 0010n son más activos genes deshidrogenasa de 4-HB de 0009. También parece ser mejor la actividad de deshidrogenasa de 4-HB cuando hay otro gen que le precede en el mismo operón.

Tabla 7. Actividades de enzima In vitro en extractores celulares de MG1655 $lacI^Q$ que contienen los plásmidos que expresan genes en la ruta 4-HB-CoA. Las actividades han reportado en Unidades/mg de proteína, en donde una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para convertir 1 μmol de sustrato en 1 minuto a temperatura ambiente.

Muestra#	pZE13 (a)	pZA33 (b)	00600	Cell Prot (c)	Catl	SueD	4HBd
1	eatl (0004)		2.71	6.43	1.232	0.00	
2	eatl (0004)-sueD		2.03	5.00	0.761	2.57	
3	eatl (0004)-sueD (0008)		1.04	3.01	0.783	0.01	
4	sueD (0035)		2.31	6.94		2.32	
5	sueD (0008)		1.10	4.16		0.05	
6		4hbd (0009)	2.81	7.94	0.003		0.25
7		4hbd (0036)	2.63	7.84			3.31
8		4hbd (0010n)	2.00	5.08			2.57
9	eatl (0004)-sueD (0035)	4hbd (0009)	2.07	5.04	0.600	1.85	0.01
10	eatl (0004)-sueD (0035)	4hbd (0036)	2.08	5.40	0.694	1.73	0.41
11	eatl (0004)-sueD (0035)	4hbd (0010n)	2.44	4.73	0.679	2.28	0.37
12	eatl (0004)-sueD	4hbd (0009)	1.08	3.99	0.572	-0.01	0.02
13	eatl (0004)-sueD	4hbd (0036)	0.77	2.60	0.898	-0.01	0.04
14	eatl (0004)-sueD	4hbd (0010n)	0.63	2.47	0.776	0.00	0.00
15		eat2 (0034)	2.56	7.86			
16		eat2(0034)-4hbd(0036)	3.13	8.04			24.86
17		eat2(0034)-4hbd(0010n)	2.38	7.03			7.45
18		4hbd(0036)-eat2(0034)	2.69	8.26			2.15
19		4hbd(0010n)-eat2(0034)	2.44	6.59			0.59

Los genes expresados de Plac en pZE13, un plásmido de copia alta con origen de colE1 y resistencia a ampicilina.

Los números de identificación de genes se dan en la Tabla 6. Los genes expresados de Plac en pZA33, un plásmido de copia de medio con origen de pACYC y resistencia a cloranfenicol.

(c) Proteína de células dadas como mg de proteína por ml de extracto.

Las cepas recombinantes que contienen genes en la ruta 4-HB se evaluaron luego por la capacidad para producir 4-HB en vivo a partir de intermediarios metabólicos

centrales. Las células se cultivaron anaeróbicamente en medio LB a OD600 de aproximadamente 0.4, a continuación, inducen con IPTG 1 mM. Una horas más tarde, succinato de sodio se añadió a 10 mM y se tomaron muestras para su análisis después de un período adicional de 24 y 48 horas. 4-HB en el caldo de cultivo se analizó por GC-MS, como se describe a continuación. Los resultados indican que la cepa recombinante puede producir más de 2 mM de 4-HB después de 24 horas, en comparación con esencialmente cero en la cepa de control (Tabla 8).

Tabla 8. Producción de 4-HB de succinato en cepas E. coli que alojan plásmidos que expresan varias combinaciones de genes de ruta 4-HB.

				24 Horas			48 Horas		
Muestra	Cepa huésped	pZE13	OD	00600	4HB,I1M	4HB norm. (a)	00600	4HB,I1M	4HB norm. (a)
1	MG1655 laclq	cal 1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	0.47	487	1036	1.04	1780	1711
2	MG1655	cal 1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0027)	0.41	111	270	0.99	214	217
3	MG1655	cal 1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	0.47	863	1835	0.48	2152	4484
4	MG1655	cal 1 (0004)-sucD (0035)	4hbd	0.46	956	2078	0.49	2221	4533
5	MG1655	cal 1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	0.38	493	1296	0.37	1338	3616
6	MG1655	cal 1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0027)	0.32	26	81	0.27	87	323
7	MG1655	cal 1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0.24	506	2108	0.31	1448	4672
8	MG1655	cal 1 (0004)-sucD (0008)	4hbd	0.24	78	324	0.56	233	416
9	MG1655 laclq gabD	cal 1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	0.53	656	1237	1.03	1643	1595
10	MG1655 laclq gabD	cal 1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0027)	0.44	92	209	0.98	214	218
11	MG1655 laclq gabD	cal 1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	0.51	1072	2102	0.97	2358	2431
12	MG1655 laclq gabD	cal 1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	0.51	981	1924	0.97	2121	2186
13	MG1655 laclq gabD	cal 1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	0.35	407	1162	0.77	1178	1530
14	MG1655 laclq gabD	cal 1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0027)	0.51	19	36	1.07	50	47
15	MG1655 laclq gabD	cal 1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0.35	584	1669	0.78	1350	1731
16	MG1655 laclq gabD	cal 1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0.32	74	232	0.82	232	283
17	MG1655 laclq	solo vector	solo vector	0.8	1	2	1.44	3	2
18	MG1655 laclq gabD	solo vector	solo vector	0.89	1	2	1.41	7	5

(a) Concentración de 4-HB normalizada, µM/OD600 unidades

Una alternativa al uso de un CoA transferasa (cat1) para producir succinil-CoA de succinato es utilizar los

nativos de E. coli sucCD genes, que codifica succinil-CoA sintetasa. Este grupo de genes fue clonado en pZE13 junto con genes candidatos para el resto de los pasos a 4-HB para crear pZE13-0038-0035-0036.

Producción de 4-HB de glucosa. Aunque los experimentos anteriores demuestran una ruta funcional a 4-HB de un intermediario metabólico central (succinato), un proceso industrial requeriría la producción de productos químicos de materias primas de carbohidratos de bajo costo tales como glucosa o sacarosa. Por lo tanto, la siguiente serie de experimentos busca determinar si la succinato endógeno producido por las células durante el crecimiento de la glucosa podría alimentar la ruta de 4-HB. Las células se cultivaron anaeróbicamente en medio mínimo M9 (6.78 g/l Na_2HPO_4, 3.0 g/l KH_2PO_4, 0.5 g/l de NaCl, 1.0 g/l NH_4C1, 1 mM de $MgSO_4$, 0.1 mM de $CaCl_2$) suplementado con 20 g/L de glucosa, 100 mM de 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) para mejorar la capacidad amortiguadora, 10 µg/ml de tiamina y los antibióticos apropiados. 0.25 mM IPTG se añadió al OD600 alcanzó aproximadamente 0.2, y las muestras tomadas para el 4-HB análisis de cada 24 horas Después de la inducción. En todos los casos 4-HB estabilizado a las 24 horas, con un máximo de aproximadamente 1 mM en las mejores cepas (Figura 3a), mientras que la concentración de succinato continuó

aumentando (Figura 3b). Esto indica que el suministro de succinato a la ruta es probable que no limitativo, y que el cuello de botella puede estar en la actividad de las propias enzimas o en la disponibilidad de NADH. 0035 y 0036 son claramente los mejores candidatos de genes en el COA, dependiente de semialdehído succínico deshidrogenasa y deshidrogenasa 4-HB, respectivamente. La eliminación de una o ambas de los genes que codifican conocidos (gabD) o supuestas (aldA) deshidrogenasas nativos semialdehído succínico tuvo poco efecto en el rendimiento. Finalmente, cabe señalar que las células crecieron a una mucho menor OD en las cepas 4-HB-productoras que en los controles (Figura 3c).

Una ruta alternativa para la producción de 4-HB partir de la glucosa es a través de α-cetoglutarato. Hemos explorado el uso de una descarboxilasa α-cetoglutarato de Mycobacterium tuberculosis Tian et al., Proc. Natl. Acad. Ciencia. E.U.A. 102: 10.670-10.675 (2005) para producir semialdehído succínico directamente de α-cetoglutarato (paso 8 en la Figura 1). Para demostrar que este gen (0032) era funcional in vivo, lo expresado en pZE13 en el mismo host como 4-HB-deshidrogenasa (gen 0036) en la pZA33. Esta cepa fue capaz de producir más de 1.0 mM de 4-HB dentro de las 24 horas después de la inducción con IPTG 1 mM (Figura 4). Dado que esta cepa no expresa una Semialdehído succínico CoA-dependiente deshidrogenasa, se eliminó la posibilidad de

producción semialdehído succínico través succinil-CoA. También es posible que los genes nativos responsables de producir semialdehído succínico podría funcionar en esta ruta (pasos 4 y 5 en la Figura 1), sin embargo, la cantidad de 4-HB produce cuando el plásmido pZE13-0032 fue dejado fuera del huésped se la insignificante.

La producción de BDO partir de 4-HB. La producción de BDO a partir del 4-HB requiere dos pasos de reducción catalizadas por deshidrogenasas. Deshidrogenasas alcohol y aldehído (ADH y ALD, respectivamente) son NAD+/H y/o NADP+/H enzimas dependientes que juntos pueden reducir un grupo de ácido carboxílico en una molécula a un grupo alcohol, o en sentido inverso, se puede realizar la oxidación de un alcohol a un ácido carboxílico. Esta biotransformación se ha demostrado en el medio silvestre de tipo Clostridium acetobutylicum (Jewell et al., Actual Microbiology, 13:215-19 (1986)), pero ni las enzimas responsables ni los genes responsables fueron identificados. Además, no se sabe si la activación de 4-HB-CoA se requiere primero (paso 9 en la Figura 1), o si el aldehído deshidrogenasa (paso 12) puede actuar directamente sobre 4-HB. Hemos desarrollado una lista de candidatos de las enzimas C. acetobutylicum y organismos relacionados basados en la actividad conocida con los análogos no hidroxilados a 4-HB y productos intermedios de la ruta, o por la similitud de estos genes caracterizados (Tabla

6). Dado que algunos de los candidatos son deshidrogenasas multifuncionales, que podría catalizar tanto el NAD (P) H-dependiente reducción del ácido (o derivado CoA) en el aldehído, y del aldehído al alcohol. Antes de comenzar el trabajo con estos genes en E. coli, primero validado el resultado mencionado anteriormente utilizando C. acetobutylicum ATCC 824. Las células fueron cultivadas en caldo Schaedler (Accumedia, Lansing, MI) suplementado con 10 mM de 4-HB, en una atmósfera anaeróbica de 10% de CO_2, N_2 10% de H_2, y el 80% a 30°C. Muestras periódicas de cultivo se tomaron, se centrifugó, y el caldo analizado para BDO por GC-MS, como se describe a continuación. BDO concentraciones de 0.1 mM, 0.9 mM, y 1.5 mM se detectaron después de 1 día, 2 días, y 7 días de incubación, respectivamente. Ningún BDO se detectó en cultivo crecido sin 4-HB adición. Para demostrar que el BDO producido se deriva de glucosa, que creció mejor la cepa productora de BDO MG1655 $lacI^Q$ pZE13-0004-0035-0002 pZA33-0034-0036 en medio mínimo M9 suplementado con 4 g/L uniformemente marcado ^{13}C-glucosa. Las células fueron inducidas a OD de 0.67 con 1 mM de IPTG, y una muestra tomada después de 24 horas. Análisis del sobrenadante del cultivo se realizó mediante espectrometría de masas.

Los genes candidatos para el 4-HB a BDO ruta conversión se ensayaron para la actividad siguiente cuando se expresa en el huésped E. coli MG1655 $lacI^Q$. Cepas

recombinantes que contienen cada candidato gen expresado en pZA33 se cultivaron en presencia de 0.25 mM de IPTG durante cuatro horas a 37°C para inducir la expresión completamente de la enzima. Cuatro horas después de la inducción, las células se cosecharon y se ensayaron para la actividad de ADH y ALD como se describió anteriormente. Desde 4-HB-CoA y 4-hidroxibutiraldehído no están disponibles comercialmente, los ensayos se realizaron utilizando los sustratos no hidroxilados (Tabla 9). La relación de la actividad entre 4-2-carbono y carbono sustratos para C. acetobutylicum adhE2 (0002) y E. coli adhesivo (0011) fueron similares a los publicados en la literatura una Atsumi et al., Biochim. Biophys. Acta. 1207: 1-11 (1994).

Tabla 9. Las actividades de enzimas in vitro en extractos de células de MG1655 lacI^{Q} que contiene pZA33 que expresa candidatos de genes para aldehído y alcolol deshidrogenasas. Se expresaron actividades en µmol min^{-1} mg proteína^{-1} celular. N.D., no determinado.

	Aldehido deshidrogenasa		Alcohol deshidrogenasa	
Gen | Substrato	Butiril-CoA	Acetil-CoA	Butiraldehido	Acetaldehido
0002	0.0076	0.0046	0.0264	0.0247
0003n	0.0060	0.0072	0.0080	0.0075
0011	0.0069	0.0095	0.0265	0.0093
0013	N.D.	N.D.	0.0130	0.0142
0023	0.0089	0.0137	0.0178	0.0235
0025	0	0.0001	N.D.	N.D.
0026	0	0.0005	0.0024	0.0008

Para los experimentos de producción de BDO, cat2 de Porphyromonas gingivalis W83 (gen 0034) se incluyó en pZA33 para la conversión de 4-HB, 4-HB-CoA, mientras que los genes deshidrogenasa candidatos se expresaron en pZE13. La cepa huésped fue MG1655 lacI^{Q}. Junto con el alcohol y los candidatos aldehído deshidrogenasa, también a prueba la capacidad de Semialdehído succínico CoA-dependiente deshidrogenasa (sucD) para funcionar en este paso, debido a la similitud de los sustratos. Las células fueron cultivadas a una OD de aproximadamente 0.5 en medio LB suplementado con 10 mM de 4-HB, inducidos con IPTG 1 mM y las muestras de cultivo de caldo tomadas después de 24 horas y fue analizado para BDO como se describe a continuación. La mejor producción de BDO se produjo con adhE2 de C. acetobutylicum, sucD de C. kluyveri o sucD de P. gingivalis (Figura 5). De manera interesante, la cantidad absoluta de BDO producido fue mayor en condiciones aeróbicas; sin embargo, esto se debe principalmente a la densidad celular más baja alcanzada en cultivos anaeróbicos. Cuando normalizada a la celda OD, la producción de BDO por unidad de biomasa es mayor en condiciones anaerobias (Tabla 10).

Gen expresado	Condiciones	BDO (μM)	OD (600nm)	BDO/OD
none	Aerobico	0	13.4	0
none	Microaerobico	0.5	6.7	0.09
none	Anaerobico	2.2	1.26	1.75
0002	Aerobico	138.3	9.12	15.2
0002	Microaerobico	48.2	5.52	8.73
0002	Anaerobico	54.7	1.35	40.5
0008n	Aerobico	255.8	5.37	47.6
0008n	Microaerobico	127.9	3.05	41.9
0008n	Anaerobico	60.8	0.62	98.1
0035	Aerobico	21.3	14.0	1.52
0035	Microaerobico	13.1	4.14	3.16
0035	Anaerobico	21.3	1.06	20.1

Como se discutió anteriormente, puede ser ventajoso utilizar una ruta para la conversión de 4-HB 4-HB-CoA que no genere acetato como un subproducto. Con este objetivo, hemos probado el uso de fosfotransbutirilasa (ptb) y butirato quinasa (BK) de C. acetobutylicum para llevar a cabo esta conversión a través de los pasos 10 y 11 en la Figura 1. El ptb/bk operón nativo de C. acetobutylicum (0020 y 0021 genes) fue clonado y expresado en pZA33. Los extractos de células que contienen la construcción resultante se tomaron y se ensayaron para las dos actividades enzimáticas como se describe en la presente. La actividad específica de BK fue de aproximadamente 65 U/mg, mientras que la actividad específica de ptb fue de aproximadamente 5 U/mg. Una unidad (U) de

actividad se define como la conversión de sustrato μM 1 en 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, la construcción se ensayó para la participación en la conversión de 4-HB a BDO. Las cepas huésped se transformaron con la construcción de pZA33-0020-0021 descrita y pZE13-0002 y en comparación con el uso de cat2 en la producción de BDO utilizando el procedimiento aeróbico utilizado anteriormente en la Figura 5. La cepa BK/ptb produjo 1 mM de BDO, en comparación con 2 mM cuando utilizando cat2 (Cuadro 11). Interesantemente, los resultados dependieron de si la cepa huésped contuvo una supresión en el gen nativo adhesivo.

Tabla 11. Concentraciones de BDO absolutas y normalizadas de cultivos de céluals que expresan adhE2 de C. acetobutylicum en pZE13 junot6o con cat2 de P. gingivalis (0034) o los genes ptb/BK de C. acetobutylicum en pZA33. Las cepas huésped fueron MG1655 $lacI^Q$ o MG1655 ΔadhE$lacI^Q$.

Genes	Cepa huésped	BDO (μM)	OD (600nm)	BDO/OD
0034	MG1655 $lacI^Q$	0.827	19.9	0.042
0020+0021	MG1655 $lacI^Q$	0.007	9.8	0.0007
0034	MG1655 ΔadhE $lacI^Q$	2.084	12.5	0.166
0020+0021	MG1655 ΔadhE $lacI^Q$	0.975	18.8	0.052

Producción de BDO de glucosa. El paso final de corroboración ruta consiste en expresar tanto el 4-HB y BDO segmentos de la ruta en E. coli y demostrar la producción de BDO en medio mínimo de glucosa. Se construyeron nuevos plásmidos de manera que todos los genes requeridos caben en dos plamidos. En general, los genes cat1, adhE y sucD se expresan de pZE13 y cat2 y 4-HBs se expresaron en pZA33. Varias combinaciones de fuente del gen y el orden de genes fueron probadas en el fondo MG1655 $lacI^{Q}$. Las células se cultivaron anaeróbicamente en medio mínimo M9 (6.78 g/l Na_2HPO_4, 3.0 g/l KH_2PO_4, 0.5 g/l de NaCl, 1.0 g/l NH_4C1, 1 mM de $MgSO_4$, 0.1 mM de $CaCl_2$) suplementado con 20 g/L de glucosa, 100 mM 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) para mejorar la capacidad amortiguadora, 10 µg/ml de tiamina, y los antibióticos apropiados. 0.25 mM IPTG se añadió aproximadamente 15 horas después de la inoculación y muestras de sobrenadante de cultivo tomada para BDO, HB-4 y el análisis de succinato 24 y 48 horas después de la inducción. La producción de BDO parecía mostrar una dependencia de orden de los genes (Cuadro 12). La máxima producción de BDO, más de 0.5 mM, se obtuvo con cat2 expresado en primer lugar, seguido por 4-HBD en pZA33, y catl seguido por P. gingivalis sucD en pZE13. La adición de C. acetobutylicum adhE2 en la última posición en la pZE13 dio lugar a una ligera mejora. 4-HB y succinato se produjeron también en concentraciones más altas.

Tabla 2. Producción de BDO, 4-HB y succinato en cepas de E. coli recombinantes que expresan combinaciones de genes de ruta de BDO, desarrolladas en medio mínimo suplementado con 20 g/l glucosa. Las concentraciones se dan en mM.

				24 Horas				48 Horas			
Muestra	pZE13	pZA33	Inducción OD	00600nm	5u	4HB	BDO	OD600nm	5µ	4HB	BDO
1	eatl(0004)-sueD(0035)	4hbd (0036)-eat2(0034)	0.92	1.29	5.44	1.37	0.240	1.24	6.42	1.49	0.280
2	eatl(0004)-sueD(0008N)	4hbd (0036)-eat2(0034)	0.36	1.11	6.90	1.24	0.011	1.06	7.63	1.33	0.011
3	adhE(0002)-eatl(0004)-sueD(0035)	4hbd (0036)-eat2(0034)	0.20	0.44	0.34	1.84	0.050	0.60	1.93	2.67	0.119
4	eatl (0004)-sueD(0035)-adhE(0002)	4hbd (0036)-eat2(0034)	1.31	1.90	9.02	0.73	0.073	1.95	9.73	0.82	0.077
5	adhE(0002)-eatl(0004)-sueD(0008N)	4hbd (0036)-eat2(0034)	0.17	0.45	1.04	1.04	0.008	0.94	7.13	1.02	0.017
6	eatl(0004)-sueD(0008N)-adhE(0002)	4hbd (0036)-eat2(0034)	1.30	1.77	10.47	0.25	0.004	1.80	11.49	0.28	0.003
7	eatl(0004)-sueD(0035)	eat2(0034)-4hbd(0036)	1.09	1.29	5.63	2.15	0.461	1.38	6.66	2.30	0.520
8	eatl(0004)-sueD(0008N)	eat2(0034)-4hbd(0036)	1.81	2.01	11.28	0.02	0.000	2.24	11.13	0.02	0.000
9	adhE(0002)-eatl(0004)-sueD(0035)	eat2(0034)-4hbd(0036)	0.24	1.99	2.02	2.32	0.106	0.89	4.85	2.41	0.186
10	eatl(0004)-sueD(0035)-adhE(0002)	eat2(0034)-4hbd(0036)	0.98	1.17	5.30	2.08	0.569	1.33	6.15	2.14	0.640
11	adhE(0002)-eatl(0004)-sueD(0008N)	eat2(0034)-4hbd(0036)	0.20	0.53	1.38	2.30	0.019	0.91	8.10	1.49	0.034
12	eatl(0004)-sueD(0008N)-adhE(0002)	eat2(0034)-4hbd(0036)	2.14	2.73	12.07	0.16	0.000	3.10	11.79	0.17	0.002
13	Solo vector	Solo vector	2.11	2.62	9.03	0.01	0.000	3.00	12.05	0.01	0.000

Análisis de BDO, HB-4 y succinato por GCMS. BDO, HB-4 y succinato en la fermentación y las muestras de cultivo de células se derivatizaron por sililación y se analizaron cuantitativamente por GCMS utilizando métodos adaptados de informes en la literatura ((Simonov et al., J. Anal Chem. 59:965-971 (2004)). El método desarrollado demostró una buena sensibilidad hacia abajo para 1µM, linealidad hasta al menos 25 mM, así como excelente selectividad y reproducibilidad.

La preparación de la muestra se realizó de la siguiente manera: muestras de 100µl filtradas (0.2µm o 0.45µm filtros de jeringa), por ejemplo, caldo de fermentación, el cultivo de células o soluciones estándar, se secaron en un

concentrador Speed Vac (Savant VCS-100H) durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente, seguido por la adición de 20µl de solución de ciclohexanol 10mM, como un patrón interno, en dimetilformamida. Las mezclas se agitaron y se sonicaron en un baño de agua (Branson 3510) durante 15 minutos para asegurar la homogeneidad. 100 µl de reactivo de sililación de derivatización, N,O-bis (trimetilsilil)-triflouro acetimida (BSTFA) con 1% trimetilclorosilano, se añadió y la mezcla se incubó a 70°C durante 30 min. Las muestras derivatizadas se centrifugaron durante 5 min y las soluciones transparentes se inyectan directamente en GCMS. Todos los productos químicos y reactivos eran de Sigma-Aldrich, con la excepción de BDO que se adquirió de J.T. Baker.

GCMS se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N, conectado a un detector de masas selectivo (TME) 5973N operado en modo ionización por impacto electrónico (EI) se ha utilizado para el análisis. Se utilizó una columna capilar DB-5MS (J & W Scientific, Agilent Technologies), 30m x 0.25 mM ID x 0.25 µm espesor de la película. El GC fue operado en un modo de inyección dividido que introduce lµL de la muestra a una relación de separación de 20:1. La temperatura del puerto de inyección fue de 250°C. Se utilizó helio como gas portador y el régimen de flujo se mantuvo a 1.0 ml/min. Un programa de gradiente de temperatura se ha optimizado para

asegurar una buena resolución de los analitos de interés y la interferencia de la matriz mínima. El horneado se llevó a cabo inicialmente en el 80°C de 1 min y eleva al 120°C en 2°C/min, seguido por un rápido aumento gradual a 320°C a 100°C/min y se mantuvo finalmente 6 min a 320°C. La interfaz de línea de transferencia de MS se mantuvo a 280°C. Los datos fueron adquiridos utilizando la 'masa inferior' MS que sintoniza la configuración de MS y 30-400 m/z de escaneo de rango de masa. El tiempo total de análisis fue de 29 minutos incluido el plazo de 3 min del solvente. Los tiempos de retención corresponden a 5.2 min, 10.5, 14.0 y 18.2 de ciclohexanol BSTFA derivatizado, BDO, 4-HB y succinato, respectivamente. Para el análisis cuantitativo, los siguientes fragmentos específicos de masas fueron seleccionados (extraído iones cromatogramas): m/z 157 para patrón interno ciclohexanol, 116 para BDO y 147 para 4-HB y succinato. Las curvas de calibración estándar se construyeron utilizando soluciones de analito en el cultivo celular correspondiente o medio de fermentación para que coincida con matriz de muestra tan cerca como sea posible. Los datos GCMS se procesaron mediante software de análisis de datos ambientales ChemStation (Agilent Technologies).

Los resultados indicaron que la mayor parte de la 4-HB y BDO producida fueron marcadas con 13C (Figura 6, lado derecho). Los espectros de masas de un cultivo desarrollado

en paralelo glucosa no marcado se muestran para comparación (Figura 6, lado izquierdo). Nótese que los picos observados son fragmentos de la molécula derivatizada que contiene diferentes números de átomos de carbono entre el metabolito. El reactivo de derivación contribuye también algunos átomos de carbono y silicio que ocurren naturalmente de distribución de etiquetas, por lo que los resultados no son estrictamente cuantitativos.

La producción de BDO partir de 4-HB utilizando rutas alternativas. Las rutas alternativas diferentes también se ensayaron para la producción de BDO. Esto incluye el uso de la enzima de E. coli nativa SucCD para convertir succinato a succinil-CoA (cuadro 13, filas 2-3), el uso de α-cetoglutarato descarboxilasa en la ruta de α-cetoglutarato (Tabla 13, fila 4), y el uso de ptb/BK como un medio alternativo para generar la CoA-derivado de 4HB (Tabla 13, hilera 1). Las cepas fueron construidos contiene plásmidos que expresan los genes indicados en la Tabla 13, que comprenden estas variantes. Los resultados muestran que en todos los casos, la producción de 4-HB y BDO se produjo (Tabla 13).

Tabla 13. Producción de BDO, 4-HB, y succinato en genes de cepas de E. coli recombinante para diferentes variantes de rutas de BDO, desarrolladas anaeróbicamente en

medio mínimo suplementado con 20 g/l glucosa y colectadas 24 horas después de inducción con 0.1 nM IPTG. Las concentraciones se dan en mM.

Genes en pZE13	Genes en pZA33	Succinato	4-HB	BDO
0002+0004+0035	0020n-0021n-0036	0.336	2.91	0.230
0038+0035	0034-0036	0.814	2.81	0.126
0038+0035	0036-0034	0.741	2.57	0.114
0035+0032	0034-0036	5.01	0.538	0.154

Ejemplo III

Biosíntesis de 4-hidroxibutanoico, γ-butirolactona y 1,4-butanodiol

Este ejemplo describe la producción biosintética de 4-hidroxibutanoico, γ-butirolactona y 1,4-butanodiol mediante fermentación y otros bioprocesos.

Los métodos para la integración de la etapa de fermentación 4-HB en un proceso completo para la producción de GBL purificado, 1,4-butanodiol (BDO) y tetrahidrofurano (THF) se describen a continuación. Desde 4-HB y GBL están en equilibrio, el caldo de fermentación contendrá ambos compuestos. A pH bajo este equilibrio se desplaza a favorecer GBL. Por lo tanto, la fermentación puede operar a un pH de 7.5 o menos, generalmente un pH de 5.5 o menos. Después de la eliminación de la biomasa, la corriente de producto entra en

un paso de separación en la que GBL se retira y el flujo restante enriquecido en 4-HB se recicla. Finalmente, el GBL se destila para eliminar cualquier impureza. El proceso funciona en uno de tres formas: 1) fermentación de alimentación por lotes y separación por lotes, 2) fermentación de alimentación por lotes y separación continúa; 3) fermentación continúa y la separación continua. Los dos primeros de estos modos se muestran esquemáticamente en la Figura 7. Los procedimientos de fermentación integrados descritos a continuación también se utilizan para las células productoras de BDO de la invención para la biosíntesis de BDO y subsiguientes productos de la familia de BDO.

Protocolo de fermentación para producir 4-HB/GBL (lote): El organismo de producción se cultiva en un biorreactor 10L se roció con una mezcla N_2/CO_2, utilizando 5 caldo L que contuvo 5 g/L de fosfato potásico, 2.5 g/l de cloruro de amonio, 0.5 g/l de sulfato de magnesio, y 30 g/l de licor de maceración de maíz, y una concentración inicial de glucosa de 20 g/L. A medida que las células crecen y utilizan la glucosa, la glucosa adicional 70% se alimenta en el biorreactor a una velocidad de aproximadamente equilibrar el consumo de glucosa. La temperatura del biorreactor se mantiene a 30 grados C. El crecimiento se prolonga durante aproximadamente 24 horas, hasta 4-HB alcanza una

concentración de entre 20-200 g/l, con la densidad celular es entre 5 y 10 g/L. El pH no se controla y típicamente se reducirá a pH 3-6 por el final de la carrera. Una vez finalizado el período de cultivo, el contenido del fermentador se pasa a través de una unidad de separación de células (por ejemplo, de centrifugación) para eliminar las células y restos celulares y el caldo de fermentación se transfiere a una unidad de separación de producto. El aislamiento de 4-HB y/o GBL tendría lugar mediante procedimientos de separación estándar empleados en la técnica para separar los productos orgánicos de soluciones acuosas diluidas, tales como extracción líquido-líquido utilizando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una solución orgánica de 4-HB/GBL. La solución resultante se somete luego a los métodos de destilación estándar para eliminar y reciclar el disolvente orgánico y para proporcionar GBL (punto de ebullición 204-205°C) que se aisló como un líquido purificado.

Protocolo de fermentación para producir 4-HB/GBL (totalmente continua): El organismo de producción se desarrolla primero en modo por lotes usando el aparato y la composición del medio descrito anteriormente, excepto que la concentración de glucosa inicial es 30-50 g/L. Cuando la glucosa se agota, se alimentan medio de la misma composición

se suministra continuamente a una velocidad entre 0.5 l/hr y 1 l/h, y el líquido se retira a la misma velocidad. La concentración de 4-HB en el biorreactor se mantiene constante a 30-40 g/l, y la densidad celular se mantiene constante entre 3-5 g/L. La temperatura se mantuvo a 30 grados C, y el pH se mantiene a 4.5 utilizando NaOH concentrado y HCl, según sea necesario. El biorreactor es operado continuamente durante un mes, con muestras tomadas cada día para asegurar la consistencia de concentración de 4-HB. En el modo continuo, se suministra el contenido del fermentador se elimina constantemente como medio nuevo de alimentación. La corriente de salida, las células que la contienen, medios y productos 4-HB y/o GBL, se someten entonces a un procedimiento continuo de separación de producto, con o sin eliminación de las células y restos celulares y se llevaría a cabo por métodos estándar de separación continua empleada en la técnica para separar los productos orgánicos de soluciones acuosas diluidas, tales como extracción continua líquido-líquido utilizando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una solución orgánica de 4-HB/GBL. La solución resultante se somete posteriormente a métodos estándar de destilación continua para eliminar y reciclar el disolvente orgánico y para proporcionar GBL (punto de ebullición 204-205°C) que se aisló como un líquido purificado.

Protocolo de Reducción de GBL: Una vez GBL es aislado y purificado como se ha descrito anteriormente, a continuación, se sometió a los protocolos de reducción tales como aquellos bien conocidos en la técnica (referencias citadas) para producir 1,4-butanodiol o tetrahidrofurano (THF) o una mezcla de los mismos. Los catalizadores de hidrogenación heterogéneos u homogéneos combinados con GBL bajo presión de hidrógeno son bien conocidos para proporcionar los productos de 1,4-butanodiol o tetrahidrofurano (THF) o una mezcla de los mismos. Es importante señalar que la mezcla de productos 4-HB/GBL que se separa del caldo de fermentación, como se ha descrito anteriormente, puede ser sometida directamente, antes de su aislamiento y purificación GBL, a estos protocolos de reducción de la misma para proporcionar los productos 1,4-butanodiol o tetrahidrofurano o una mezcla de los mismos. Los productos resultantes, 1,4-butanodiol y THF son luego aislados y purificados por procedimientos bien conocidos en la técnica.

Fermentación y el protocolo de hidrogenación para producir BDO o THF directamente (por lotes): Las células se cultivan en un biorreactor 10L se roció con una mezcla N_2/CO_2, utilizando 5 caldo L que contuvo 5 g/L de fosfato potásico, 2.5 g/L de cloruro de amonio, 0.5 g/l de sulfato de magnesio

y 30 g/l de licor de maceración de maíz y una concentración inicial de glucosa de 20 g/L. Como las células crecen y utilizar la glucosa, la glucosa adicional 70% se alimenta en el biorreactor a una velocidad para equilibrar aproximadamente el consumo de glucosa. La temperatura del biorreactor se mantiene a 30 grados C. El crecimiento se prolonga durante aproximadamente 24 horas, hasta que 4-HB alcanza una concentración entre 20-200 g/l, con la densidad celular entre 5 y 10 g/L. El pH no se controla y típicamente se reducirá a pH 3-6 por el final del proceso. Una vez finalizado el período de cultivo, el contenido del fermentador se pasan a través de una unidad de separación de células (por ejemplo, de centrifugación) para eliminar las células y restos celulares y el caldo de fermentación se transfiere a una unidad de reducción (por ejemplo, recipiente de hidrogenación), donde la mezcla de 4-HB/GBL se reduce directamente a cualquiera de 1,4-butanodiol o THF o una mezcla de los mismos. Después de terminar el procedimiento de reducción, el contenido del reactor se transfiere a una unidad de separación de productos. El aislamiento de 1,4-butanodiol y/o THF se llevaría a cabo por procedimientos de separación estándar empleados en la técnica para separar los productos orgánicos de soluciones acuosas diluidas, tales como extracción líquido-líquido utilizando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para

proporcionar una solución orgánica de 1,4-butanodiol y/o THF. La solución resultante se somete luego a los métodos de destilación estándar para eliminar y reciclar el disolvente orgánico y para proporcionar 1,4-butanodiol y/o THF que se aisló como un líquido purificado.

Fermentación y protocolo de hidrogenación para producir BDO o THF directamente (totalmente continua): Las células se desarrollan primero en modo por lotes usando el aparato y la composición del medio descrito anteriormente, excepto que la concentración de glucosa inicial es 30-50 g/L. Cuando la glucosa se agota, se alimentan medio de la misma composición y se suministra continuamente a una velocidad entre 0.5 l/hr y 1 l/h, y el líquido se retira a la misma velocidad. La concentración de 4-HB en el biorreactor se mantiene constante a 30-40 g/l, y la densidad celular se mantiene constante entre 3-5 g/L. La temperatura se mantuvo a 30 grados C, y el pH se mantiene a 4.5 utilizando NaOH concentrado y HCl, según sea necesario. El biorreactor es operado continuamente durante un mes, con muestras tomadas cada día para asegurar la consistencia de concentración de 4-HB. En el modo continuo, el contenido del fermentador se elimina constantemente a medida que se suministra nuevo medio de alimentación. La corriente de salida, las células que contienen, medianos y productos 4-HB y/o GBL, se pasa

entonces a través de una unidad de separación de células (por ejemplo, de centrifugación) para eliminar las células y restos celulares y el caldo de fermentación se transfiere a una unidad de reducción continua (por ejemplo, recipiente de hidrogenación), donde el 4-HB/GBL mezcla se reduce directamente a cualquiera de 1,4-butanodiol o THF o una mezcla de los mismos. Después de la finalización del procedimiento de reducción, el contenido del reactor se transfiere a un producto continuo unidad separaciones. Aislamiento de 1,4-butanodiol y/o THF se llevaría a cabo por los procedimientos estándar de separaciones continuas empleadas en la técnica para separar los productos orgánicos de soluciones acuosas diluidas, tales como extracción líquido-líquido utilizando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una solución orgánica de 1,4-butanodiol y/o THF. La solución resultante se somete luego a los métodos estándar de destilación continua para eliminar y reciclar el disolvente orgánico y para proporcionar 1,4-butanodiol y/o THF que se aisló como un líquido purificado.

Protocolo de fermentación para producir BDO directamente (por lotes): El organismo de producción se cultiva en un biorreactor 10L roció con una mezcla N_2/CO_2, utilizando 5 caldo L que contuvo 5 g/L de fosfato potásico,

2.5 g/l de cloruro de amonio, 0.5 g/l sulfato de magnesio, y 30 g/l de licor de maceración de maíz, y una concentración inicial de glucosa de 20 g/L. A medida que crecen las células y utilizan glucosa, se alimenta 70% adicional de glucosa en el biorreactor a una velocidad de aproximadamente equilibrar el consumo de glucosa. La temperatura del biorreactor se mantiene a 30 grados C. El crecimiento se prolonga durante aproximadamente 24 horas, hasta que BDO alcanza una concentración de entre 20-200 g/l, con la densidad celular siendo generalmente entre 5 y 10 g/L. Una vez finalizado el período de cultivo, el contenido del fermentador se pasan a través de una unidad de separación de células (por ejemplo, de centrifugación) para eliminar las células y restos celulares y el caldo de fermentación se transfiere a una unidad de separación del producto. El aislamiento de BDO se llevaría a cabo por procedimientos de separación estándar empleados en la técnica para separar los productos orgánicos de soluciones acuosas diluidas, tales como extracción líquido-líquido utilizando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una solución orgánica de BDO. La solución resultante se somete luego a los métodos de destilación estándar para eliminar y reciclar el disolvente orgánico y para proporcionar BDO (punto de ebullición 228-229°C) que se aisló como un líquido purificado.

Protocolo de fermentación para producir BDO directamente (totalmente continua): El organismo de producción se primera crecido en modo por lotes usando el aparato y la composición del medio descrito anteriormente, excepto que la concentración de glucosa inicial es 30-50 g/L. Cuando la glucosa se agota, se alimentan medio de la misma composición se suministra continuamente a una velocidad entre 0.5 l/hr y 1 l/h y el líquido se retira a la misma velocidad. La concentración de BDO en el biorreactor se mantiene constante a 30-40 g/l y la densidad celular se mantiene constante entre 3-5 g/L. La temperatura se mantuvo a 30 grados C, y el pH se mantiene a 4.5 utilizando NaOH concentrado y HCl, según sea necesario. El biorreactor es operado continuamente durante un mes, con muestras tomadas cada día para asegurar la consistencia de la concentración de BDO. En el modo continuo, el contenido del fermentador se elimina constantemente a medida que se se suministra nuevo medio de alimentación. La corriente de salida, que contiene las células, medio y el producto de BDO, se somete entonces a un procedimiento de separación continua de producto, con o sin eliminación de las células y restos celulares, y se llevaría a cabo por métodos estándar de separaciones continuas empleadas en la técnica para separar los productos orgánicos a partir de soluciones acuosas diluidas, tales como extracción continua líquido-líquido utilizando un disolvente

orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una solución orgánica de BDO. La solución resultante se somete posteriormente a métodos estándar de destilación continua para eliminar y reciclar el disolvente orgánico y para proporcionar BDO (punto de ebullición 228-229°C) que se aisló como un líquido purificado (MPT 20°C).

Ejemplo IV

Ejemplos de Caminos de BDO

Este ejemplo describe las enzimas y los genes correspondientes ilustrativos para rutas sintéticas de 1,4-butanodiol (BDO).

Ejemplos de rutas de BDO sintéticos se muestran en las Figuras 8-13. Las rutas representadas en las Figuras 8-13 son comunes a partir de los intermediarios metabólicos centrales de 1,4-butanodiol. Todas las transformaciones se representa en las Figuras 8-13 se dividen en las 18 categorías generales de las transformaciones mostradas en la Tabla 14. A continuación se describe una serie de genes candidatos bioquímicamente caracterizados en cada categoría. Específicamente enumerados son los genes que pueden ser aplicados para catalizar las transformaciones adecuadas en las Figuras 9-13 cuando clonado y expresado en un organismo huésped. Los tres genes ilustrativos para cada uno de los pasos clave en las Figuras 9-13 se proporcionan en las Tablas

15-23 (ver más abajo). Ejemplos de genes fueron proporcionados por las rutas descritas en la Figura 8 se describen en este documento.

Tabla 14. Tipos de enzima requeridos para convertir intermediarios metabólicos centrales en 1,4-butanodiol. Los primeros tres dígitos de cada etiqueta corresponden a los tres primeros dígitos de números que denotan el tipo general de transformación independiente de especificad de sustratos.

Etiqueta	Función
1.1.1.a	Oxidoreductasa (cetona a hidroxilo o aldehído a alcohol)
1.1.1.c	Oxidoreductasa (2 pasos, acil-CoA a alcohol)
1.2.1.b	Oxidoreductasa (acil-CoA a aldehido)
1.2.1.c	Oxidoreductasa (ácido 2-oxo a acil-CoA, descarboxilación)
1.2.1.d	Oxidoreductasa (fosforilación/desfosforilación)
1.3.1.a	Oxidoreductasa operación en donadores CH-CH
1.4.1.a	Oxidoreductasa operación en aminoácidos
2.3.1.a	Aciltrasferasa (grupo de transferencia de fosfato)
2.6.1.a	Aminotransferasa
2.7.2.a	Fosfotransferasa, aceptor de grupos carboxilo
2.8.3.a	Coenzima-A transferasa
3.1.2.a	Tiolester hidrolasa (CoA específica)
4.1.1.a	Carboxi-liasa
4.2.1.a	Hidro-liasa
4.3.1.a	Amonia-liasa
5.3.3.a	Isomerasa
5.4.3.a	Aminomutasa
6.2.1.a	Acido tioligasa

l.l.l.a - Oxidorreductasa (aldehído o cetona al alcohol para hidroxilo)

Aldehído a alcohol. Los genes ilustrativos que codifican enzimas que catalizan la conversión de un aldehído con el alcohol, es decir, la alcohol deshidrogenasa o equivalentemente reductasa aldehído, incluyen alrA que codifica un alcohol deshidrogenasa de cadena media para C2-C14 (Tani et al., Appl. Environ. Microbiol. 66:5231-5235 (2000)), ADH2 de Saccharomyces cerevisiae (Atsumi et al., Nature 451:86-89 (2008)), yqhD a partir de E. coli que tiene preferencia por moléculas ya que C(3) (Sulzenbacher et al., Journal of Molecular Biology 342:489-502 (2004)) y el BDH I y II de C. BDH C. acetobutylicum que convierte butirialdehido en butanol (Walter et al., Journal of Bacteriology 174:7149-7158 (1992)). Las secuencias de proteínas de cada uno de estos productos de los genes ilustrativas, si está disponible, se puede encontrar con los siguientes números de GenBank:

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
alrA	BAB12273.1	9967138	*Acinetobacter* sp. Strain M-1
ADH2	NP_014032.1	6323961	*Saccharymyces cerevisiae*
yqhD	NP_417484.1	16130909	*Escherichia coli*
bdh I	NP_349892.1	15896543	*Clostridium acetobutylicum*
bdh II	NP_349891.1	15896542	*Clostridium acetobutylicum*

Las enzimas que exhiben actividad de 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (EC 1.1.1.61) también entran en esta categoría. Estas enzimas se han caracterizado en Ralstonia eutropha (Bravo et al., J. Forensic Sci. 49:379-387 (2004), Clostridium kluyveri (Wolff et al., Protein. Expr. Purif. 6:206-212 (1995)) y Arabidopsis thaliana (Breitkreuz J. Biol. Chem. et al., 278: 41552-41556 (2003)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
4hbd	YP_726053.1	113867564	*Ralstonia eutropha* H16
4hbd	L21902.1	146348486	*Clostridium kluyveri* DSM 555
4hbd	Q94B07	75249805	*Arabidopsis thaliana*

Otra enzima ilustrativa es 3-hidroxi-isobutirato deshidrogenasa que cataliza la oxidación reversible de 3-hidroxi-isobutirato de metilo a semialdehído metilmalonato. Esta enzima participa en la degradación de valina, leucina e isoleucina y ha sido identificada en bacterias, de eucariotes y mamíferos. La enzima codificada por P84067 de Thermus thermophilus HB8 se ha caracterizado estructuralmente (Lokanath et al., J. Mol. Biol. 352:905-17 (2005)). La reversibilidad de la 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa humana se demostró usando sustrato isotópicamente marcado con (Manning et al., Biochem. J. 231:481-484 (1985)). Los genes adicionales que codifican esta enzima incluyen *3hidh* en el

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 dat en Pseudomonas putida (Aberhart J et al., 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)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
P84067	P84067	75345323	*Thermus thermophilus*
mmsb	P28811.1	127211	*Pseudomonas aeruginosa*
dhat	Q59477.1	2842618	*Pseudomonas putida*
3hidh	P31937.2	12643395	*Homo sapiens*
3hidh	P32185.1	416872	*Oryctolagus cuniculus*

Varias enzimas de 3-hidroxiisobutirato de deshidrogenasa también se han mostrado para convertir semialdehído malónico a ácido hidroxipropionico 3-(3-HP). Tres genes candidatos que presentan esta actividad son MMSB de Pseudomonas aeruginosa PA01 (62), MMSB de Pseudomonas putida KT2440 (Liao et al., La publicación en E.U.A. 2005/0221466) y MMSB de Pseudomonas putida E23 (Chowdhury et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 60:2043-2047 (1996)). Una enzima con actividad deshidrogenasa 3-hidroxibutirato en Alcaligenes faecalis M3A también ha sido identificada (Gokam

et al, Patente de E.U.A. No. 7,393,676; Liao et al., E.U.A. Publicación No. 2005/0221466). Los candidatos adicionales de genes de otros organismos, incluyendo Rhodobacter spaeroides puede ser inferida por la similitud de secuencias.

Gen	Acceso No.	GI No.	Organismo
mmsB	AAA25892.1	151363	*Pseudomonas aeruginosa*
mmsB	NP_252259.1	15598765	*Pseudomonas aeruginosa* PAO1
mmsB	NP_746775.1	26991350	*Pseudomonas putida* KT2440
mmsB	JC7926	60729613	*Pseudomonas putida* E23
orfB1	AAL26884	16588720	*Rhodobacter spaeroides*

La conversión de semialdehído malónico a 3-HP también puede llevarse a cabo por otras dos enzimas: dependiente de NADH 3-hidroxipropionato deshidrogenasa y malonato semialdehído NADPH-dependiente reductasa. Un 3-hidroxipropionato dependiente de NADH deshidrogenasa se cree que participa en la biosíntesis de las rutas de la beta-alanina a partir del propionato en bacterias y plantas (Rathinasabapathi, B. Journal of Plant Pathology 159:671-674 (2002); Stadtman, ERJAm Chem.Soc. 77:5765-5766 (1955)). Esta enzima no se ha asociado con un gen en cualquier organismo hasta la fecha. NADPH-dependiente malonato semialdehído reductasa cataliza la reacción inversa en la fijación autotrófica C02-bacterias. Aunque se ha detectado la

actividad de la enzima en Metallosphaera Sedula, la identidad del gen no se conoce (Alber y col. J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006)).

Cetona para hidroxilo. Existen varias alcohol deshidrogenasas ilustrativas que convierten una cetona a un grupo funcional hidroxilo. Dos de estas enzimas de E. coli son codificadas por la malato deshidrogenasa (MDH) y lactato deshidrogenasa (idhA). Además, lactato deshidrogenasa de Ralstonia eutropha se ha demostrado que demuestran las actividades de alta sobre sustratos de varias longitudes de cadena tales como lactato, 2-oxobutirato, 2-oxopentanoato y 2-oxoglutarato (Steinbüchel y Schlegel, Eur. J. Biochem 130: 329-334 (1983)). La conversión de la alfa-cetoadipato en alfa-hidroxiadipato puede ser catalizada por 2-cetoadipato reductasa, una enzima informó que se encuentran en ratas y en placenta humana (Suda et al., Arch. Biochem. Biophys. 176:610-620 (1976); Suda et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 77:586-591 (1977)). Un candidato adicional para esta etapa es la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa (BDH) mitocondrial del corazón humano que ha sido clonada y caracterizada (Marks et al., J. Biol. Chem. 267: 15.459-15463 (1992)). Esta enzima es una deshidrogenasa que opera en un ácido 3-hidroxi. Otro ejemplo de la alcohol deshidrogenasa convierte acetona a isopropanol como se muestra en C. beijerinckii (Ismaiel et al., J. Bacteriol. 175:5097-5105

(1993)) y T. brockii (Lamed y col., Biochem. J. 195:.. 183-190 (1981); Peretz y Burstein Biochemistry 28:6549-6555 (1989)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
mdh	AAC76268.1	1789632	*Escherichia coli*
ldhA	NP_415898.1	16129341	*Escherichia coli*
ldh	YP_725182.1	113866693	*Ralstonia eutropha*
bdh	AAA58352.1	177198	*Homo sapiens*
adh	AAA23199.2	60592974	*Clostridium beijerinckii* NRRL B593
adh	P14941.1	113443	*Thermoanaerobacter brockii* HTD4

Las 3-hidroxi acilo deshidrogenasas ilustrativas que se convierten acetoacetil-CoA a 3-hidroxibutiril-CoA incluyen HBD de C. acetobutylicum (Boynton et al., Journal of Bacteriology 178:3015-3024 (1996)), HBD de C. beijerinckii (Colby et al., Appl Environ. Microbiol 58:3297-3302 (1992)), y un número de enzimas similares de Metallosphaera Sedula (Berg et al., Archaea Ciencia 318: 1782-1786 (2007)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
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*

l.l.l.c - Oxidoredutasa (2 paso, acil-CoA al alcohol)

Las oxidorreductasas ilustrativas del paso 2 que convierten una acil-CoA a alcohol incluyen aquellos que transforman sustratos tales como acetil-CoA a etanol (por ejemplo, adhesivos a partir de E. coli (Kessler et al., FEBS. Lett. 281:59-63 (1991)) y butiril CoA-butanol a (por ejemplo, adhE2 de C. acetobutylicum (Fontaine et al., J. Bacteriol. 184:821-830 (2002)). Además de la reducción de acetil-CoA a etanol, la enzima codificada por adhesivo en Leuconostoc mesenteroides se ha demostrado que el óxido de isobutiraldehído cadena ramificada compuesto a isobutiril-CoA (Kazahaya et al., J. GenAppl. Microbiol. 18:43-55 (1972); Koo et al., Biotechnol Lett. 27:505-510 (2005)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
adhE	NP_415757.1	16129202	*Escherichia coli*
adhE2	AAK09379.1	12958626	*Clostridium acetobutylicum*
adhE	AAV66076.1	55818563	*Leuconostoc mesenteroides*

Otra enzima ilustrativa puede convertir malonil-CoA a 3 HP. Una enzima NADPH-dependiente, con esta actividad se ha caracterizado Chloroflexus aurantiacus donde participa en el ciclo de 3-hidroxipropionato (Hugler et al., J. Bacteriol 184:2404-2410 (2002); Strauss y Fuchs, Eur. J. Biochem.

215:633-643 (1993)). Esta enzima, con una masa de 300 kDa, es altamente específica del sustrato y muestra similitud de secuencia poco a otras oxidorreductasas conocidos (Hugler et al., J. Bacteriol. 184:2404-2410 (2002)). No se ha comprobado que haya enzimas en otros organismos que catalicen esta reacción específica, sin embargo hay evidencia bioinformática que otros organismos pueden tener rutas similares (Klatt et al., Environ. Microbiol. 9:2067-2078 (2007)). Los candidatos de la enzima en otros organismos, incluyendo Roseiflexus castenholzii, Erythrobacter sp. NAP1 y proteobacteria marina gamma HTCC2080 puede ser inferida por la similitud de secuencias.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
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

Se pueden reducir las cadenas largas de moléculas de acil-CoA por enzimas tales como de jojoba {SimMondsia chinensis) FAR que codifica un alcohol graso formador de acil-CoA reductasa. Su sobreexpresión en E. coli como resultado de la actividad FAR y la acumulación de alcohol graso (Metz et al., Plant Physiology 122:635-644) 2000)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
FAR	AAD38039.1	5020215	*Simmondsia chinensis*

1.2.1.b - Oxidorreductasa (acil-CoA a aldehído)

Varios de acil-CoA deshidrogenasas son capaces de reducir un acil-CoA a su correspondiente aldehído. Ejemplos de genes que codifican estas enzimas incluyen la Acinetobacter calcoaceticus ACRL que codifica una acil-CoA reductasa (Reiser y Somerville, J. Bacteriol. 179:2969 - 2.975 (1997)), el Acinetobacter sp. M-L acil-CoA reductasa (Ishige et al., Appl. Environ. Microbiol. 68: 1192-1195 (2002)) y un semialdehído succinato CoA- y NADP- dependiente deshidrogenasa codificada por el gen sucD en Clostridium kluyveri (Sohling y Gottschalk J. Bacteriol 178:871-80 (1996); Sohling y Gottschalk J. Bacteriol. 178:871-880 (1996)). SucD de P. gingivalis es otro deshidrogenasa semialdehído succinato (Takahashi et al., J. Bacteriol. 182:4704-4710 (2000)). La enzima deshidrogenasa acilante acetaldehído en Pseudomonas sp, codificada por bphG, es otro como se ha demostrado para oxidar y acilar acetaldehído, propionaldehído, butirato aldehído, isobutiraldehído y formaldehído (Powlowski et al., J. Bacteriol. 175:377-385 (1993)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
acr1	YP_047869.1	50086359	*Acinetobacter calcoaceticus*
acr1	AAC45217	1684886	*Acinetobacter baylyi*
acr1	BAB85476.1	18857901	*Acinetobacter* sp. Strain M-1
sucD	P38947.1	730847	*Clostridium kluyveri*
sucD	NP_904963.1	34540484	*Porphyromonas gingivalis*
bphG	BAA03892.1	425213	*Pseudomonas sp*

Un tipo de enzima adicional que convierte una acil-CoA a su correspondiente aldehído es malonil-CoA reductasa que transforma la malonil-CoA a malónico semialdehído. Malonil-CoA reductasa es una enzima clave en la fijación autotrófica de carbono a través del ciclo de 3 hidroxipropionato en bacterias archael termoacidofílicas (Berg y otros, Science 318: 1782-1786 (2007); Thauer, RK Ciencia 318: 1732-1733 (2007)). La enzima utiliza NADPH como cofactor y se ha caracterizado en Metallosphaera y Suljolobus spp (Alber y otros J. Bacteriol 188:8551-8559 (2006); Hugler y otros J. Bacteriol 184:2404-2410 (2002)). La enzima es codificada por Msed_0709 en Metallosphaera Sedula (Alber y otros J. Bacteriol 188:8551-8559 (2006), Berg y otros, Science 318: 1782-1786 (2007)). Un gen que codifica una malonil-CoA reductasa de Suljolobus tokodaii fue clonado y heteróloga expresada en E. coli (Alber y col. J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006)). Aunque la funcionalidad aldehído deshidrogenasa de estas enzimas es similar a la deshidrogenasa bifuncional de Chloroflexus aurantiacus,

existe una similitud de secuencia poco. Los dos candidatos de malonil-CoA reductasa, la enzima tiene alta similitud de secuencia de deshidrogenasa-aspartato semialdehído, una enzima que cataliza la reducción y defosforilación concurrente de aspartil-4-fosfato a aspartato semialdehído. Candidatos adicionales de genes se pueden encontrar por homología de secuencia a las proteínas en otros organismos, incluyendo Suljolobus soljataricus y Suljolobus acidocaldarius.

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

1.2.1.c - Oxidorreductasa (2-oxo ácido de la acil-CoA, descarboxilación)

Las enzimas de esta familia incluyen: 1) 2-ceto-ácido de cadena ramificada deshidrogenasa, 2) alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, y 3) el complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (PDHC). Estas enzimas son complejos multi-enzimaticos que catalizan una serie de reacciones parciales que resultan en acilante de descarboxilación oxidativa de 2-ceto-ácidos. Cada uno de los

complejos deshidrogenasa 2-ceto-ácido ocupa posiciones clave en el metabolismo intermediario y la actividad enzimática es típicamente estrechamente regulada (Fries et al., Biochemistry 42:6996-7002 (2003)). Las enzimas comparten una estructura compleja, pero el compuesto común de múltiples copias de tres componentes catalíticos: alfa-cetoácido descarboxilasa (El), deshidrogenasa dihidrolipoamida aciltransferasa (E2) y dihidrolipoamida (E3). El componente E3 es compartida entre todos los complejos deshidrogenasa 2-ceto-ácidos en un organismo, mientras que los componentes El y E2 están codificadas por diferentes genes. Los componentes enzimáticos están presentes en numerosas copias en el complejo y utilizan múltiples cofactores para catalizar una secuencia dirigida a través de la canalización de las reacciones de sustrato. El tamaño total de estos complejos deshidrogenasa es muy grande, con masas moleculares entre 4 y 10 millones de Da (es decir, más grande que un ribosoma).

La actividad de las enzimas de la familia deshidrogenasa 2-ceto-ácido es normalmente bajo o limitado bajo condiciones anaeróbicas en E. coli. Aumento de la producción de NADH (o NADPH) podría conducir a un desequilibrio redox, y NADH sí sirve como un inhibidor de la función enzimática. Los esfuerzos de ingeniería han aumentado la actividad anaeróbica del complejo piruvato deshidrogenasa de E. coli (Kim et al., Appl. Environ. Microbiol. 73: 1766-

1771 (2007), Kim et al., J. Bacteriol. 190:3851-3858) 2008); Zhou et al., Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008)). Por ejemplo, el efecto inhibidor de NADH puede ser superado por ingeniería una mutación H322Y en el componente E3 (Kim et al., J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008)). Los estudios estructurales de los componentes individuales y cómo trabajan juntos en el complejo de dar una idea de los mecanismos catalíticos y la arquitectura de las enzimas de esta familia (Aevarsson et al., Nat. Struct. Biol. 6:785-792 (1999); Zhou et al., Proc. Natl. Acad. Sci E.U.A. 98: 14,802 hasta 14,807 (2001)). La especificidad de sustrato de los complejos deshidrogenasa varía en diferentes organismos, pero generalmente de cadena ramificada de ácidos ceto-deshidrogenasas tienen el rango más amplio sustrato.

Alfa-cetoglutarato deshidrogenasa (AKGD) se convierte en el alfa-cetoglutarato a succinil-CoA y es el sitio primario de control de flujo metabólico a través del ciclo de Krebs (Hansford, RG Curr. Top.Bioenerg. 10:217-278 (1980)). Codificadas por los genes Suca, sucB y los DPI en E. coli, la expresión de genes AKGD es desregulada bajo condiciones anaeróbicas y durante el crecimiento de la glucosa (Park et al., Mol. Microbiol. 15:473-482 (1995)). Aunque la gama de sustrato AKGD es estrecha, estudios estructurales del núcleo catalítico del componente E2 identificar residuos específicos responsables de la

especificidad por el sustrato (Knapp y cols. J. Mol. 280:655-668 (1998)). Los Bacillus subtilis AKGD, codificadas por odhAB (El y E2) y pdhD (E3, dominio compartido), está regulada a nivel transcripcional y depende de la fuente de carbono y fase de crecimiento del organismo (Resnekov et al., Mol. Gen. Genet. 234:285-296 (1992)). En la levadura, el gen que codifica el componente LPD1 E3 está regulada a nivel transcripcional por la glucosa (Roy y Dawes J. Gen. Microbiol. 133:925-933 (1987)). El componente de E1, codificada por KGDl, también está regulado por la glucosa y se activa por los productos de HAP2 y HAP3 (Cell Biol. Repetto y Mol Tzagoloff. 9:2695-2705 (1989)). El complejo enzimático AKGD, inhibido por los productos de NADH y succinil-CoA, está bien estudiado en los sistemas de mamíferos, como deterioro de la función de se ha relacionado con varias enfermedades neurológicas y de la presa-Tretter Vizi Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 360:2335-2345 (2005)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
sucA	NP_415254.1	16128701	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
sucB	NP_415255.1	16128702	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
lpd	NP_414658.1	16128109	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
odhA	P23129.2	51704265	*Bacillus subtilis*
odhB	P16263.1	129041	*Bacillus subtilis*
pdhD	P21880.1	118672	*Bacillus subtilis*
KGD1	NP_012141.1	6322066	*Saccharomyces cerevisiae*
KGD2	NP_010432.1	6320352	*Saccharomyces cerevisiae*
LPD1	NP_116635.1	14318501	*Saccharomyces cerevisiae*

De cadena ramificada 2-ceto-ácido complejo deshidrogenasa (BCKAD), también conocida como 2-oxoisovalerato deshidrogenasa, participa en cadena ramificada rutas de degradación de aminoácidos, la conversión de 2-ceto ácidos derivados de valina, leucina e isoleucina a sus derivados acil-CoA y CO_2. El complejo ha sido estudiado en muchos organismos incluyendo Bacillus subtilis (Wang et al., Eur. J. Biochem. 213: 1091-1099 (1993)), Rattus norvegicus (Namba et al., J. Biol. Chem. 244:4437-4447 (1969)) y Pseudomonas putida (Sokatch J. Bacteriol. 148:647-652 (1981)). En Bacillus subtilis la enzima está codificado por los genes pdhD (componente E3), bfmBB (componente E2) bfmBAA y bfmBAB (componente E1) (Wang et al., Eur. J. Biochem 213: 1091-1099 (1993)). En los mamíferos, el complejo está regulado por la fosforilación de las fosfatasas específicas y las proteínas quinasas. El complejo ha sido estudiado en

hepatocitos de rata (Chicco et al., J. Biol. Chem. 269: 19427 a 19434 (1994)) y está codificado por los genes Bckdha (El alfa), Bckdhb (El beta), DBT (E2) y Did (E3). E1 y E3 de los componentes del E3 del complejo de Pseudomonas putida BCKAD se han cristalizado (Aevarsson et al., Nat. Struct. Biol 6:785-792 (1999); Mattevi Ciencia 255: 1544-1550 (1992)) y tiene el complejo enzimático ha estudiado (Sokatch et al., J. Bacteriol. 148:647-652 (1981)). La transcripción de los genes de P. putida BCKAD es activado por el producto del gen de bkdR (Hester et al., Eur. J. Biochem. 233:828-836 (1995)). En algunos organismos incluyendo Rattus norvegicus (Paxton et al., Biochem. 234:295-303 (1986)) y Saccharomyces cerevisiae (Sinclair et al., Biochem. Mol. Biol. Eng. 31:911-922 (1993)), Este complejo se ha demostrado que tienen una amplia gama sustrato que incluye lineales oxo-ácidos tales como 2-oxobutanoato y alfa-cetoglutarato, además de los precursores de ácidos de cadena ramificada aminoácidos. El sitio activo de la BCKAD bovina fue diseñado para favorecer sustrato alternativo acetil-CoA (Meng y Chuang, Biochemistry 33: 12879 hasta 12885 (1994)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
bfmBB	NP_390283.1	16079459	*Bacillus subtilis*
bfmBAA	NP_390285.1	16079461	*Bacillus subtilis*
bfmBAB	NP_390284.1	16079460	*Bacillus subtilis*
pdhD	P21880.1	118672	*Bacillus subtilis*
lpdV	P09063.1	118677	*Pseudomonas putida*
bkdB	P09062.1	129044	*Pseudomonas putida*
bkdA1	NP_746515.1	26991090	*Pseudomonas putida*
bkdA2	NP_746516.1	26991091	*Pseudomonas putida*
Bckdha	NP_036914.1	77736548	*Rattus norvegicus*
Bckdhb	NP_062140.1	158749538	*Rattus norvegicus*
Dbt	NP_445764.1	158749632	*Rattus norvegicus*
Dld	NP_955417.1	40786469	*Rattus norvegicus*

El complejo de la piruvato deshidrogenasa, que cataliza la conversión de piruvato a acetil-CoA, también ha sido ampliamente estudiado. En la enzima de E. coli, los residuos específicos en el componente de E1 son responsables de la especificidad de sustrato (Bisswanger, H. J. Biol. Chem. 256:815-822 (1981); Bremer, J. Biochem. Eur. J. 8:535-540. (1969); Gong et al., J. Biol. Chem. 275: 13645-13.653 (2000)). Como se mencionó anteriormente, los esfuerzos de la enzima de ingeniería han mejorado la E. coli PDH actividad de la enzima en condiciones anaeróbicas (Kim et al., Appl. Environ. Microbiol 73: 1766-1771 (2007); Kim J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008); Zhou et al., Biotechnol. Lett 30:335-342 (2008)). En contraste con la PDH E. coli, el complejo de

B. subtilis es activa y necesaria para el crecimiento en condiciones anaerobias (Nakano J. Bacteriol. 179:6749-6755 (1997)). La Klebsiella pneumoniae PDH, que se caracteriza durante el crecimiento en glicerol, también está activo en condiciones anaeróbicas (Menzel et al., J. Biotechnol 56: 135-142 (1997)). Las estructuras cristalinas del complejo enzima de riñón bovino (Zhou et al., Proc. E.U.A. 98: 14802-14807 (2001)) y el dominio catalítico de E2 Azotobacter vinelandii están disponibles (Mattevi y otros, Science 255: 1544-1550 (1992)). Algunas enzimas de mamíferos PDH complejos pueden reaccionar sobre sustratos alternativos tales como 2-oxobutanoato, aunque la cinética comparativas de Rattus norvegicus PDH y BCKAD indican que BCKAD tiene mayor actividad en 2-oxobutanoato como un sustrato (Paxton et al., Biochem. J. 234:295-303 (1986)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
aceE	NP_414656.1	16128107	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
aceF	NP_414657.1	16128108	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
lpd	NP_414658.1	16128109	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
pdhA	P21881.1	3123238	*Bacillus subtilis*
pdhB	P21882.1	129068	*Bacillus subtilis*
pdhC	P21883.2	129054	*Bacillus subtilis*

pdhD	P21880.1	118672	*Bacillus subtilis*
aceE	YP_001333808.1	152968699	*Klebsiella pneumonia MGH78578*
aceF	YP_001333809.1	152968700	*Klebsiella pneumonia MGH78578*
lpdA	YP_001333810.1	152968701	*Klebsiella pneumonia MGH78578*
Pdha1	NP_001004072.2	124430510	*Rattus norvegicus*
Pdha2	NP_446446.1	16758900	*Rattus norvegicus*
Dlat	NP_112287.1	78365255	*Rattus norvegicus*
Dld	NP_955417.1	40786469	*Rattus norvegicus*

Como una alternativa a los complejos grandes multienzimáticos de 2-ceto-ácido deshidrogenasa descritos anteriormente, algunos organismos anaerobios utilizan enzimas de la familia 2-cetoácido oxidorreductasa (OFOR) para catalizar el acilante de descarboxilación oxidativa de 2-ceto-ácidos. A diferencia de los complejos deshidrogenasa, estas enzimas contienen hierro-azufre, utilizan diferentes cofactores y utilizan ferredoxina o flavodixina como aceptores de electrones en lugar de NAD(P)H. Aunque la mayoría de las enzimas de esta familia son específicas de piruvato como sustrato (POR) se ha demostrado que algunas 2-ceto-ácido: ferredoxina oxidorreductasas aceptan una amplia gama de 2-cetoácidos como sustratos, incluyendo alfa-cetoglutarato y 2-oxobutanoato (Fukuda y Wakagi, Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002); Zhang et al., J. Biochem. 120:587-599 (1996)). Una de estas enzimas OFOR de la arqueda termoacidofílica Sulfolobus tokodaii 7, que contiene una subunidad alfa y beta codificada por el gen ST2300 (Fukuda y

Wakagi, Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002); Zhang et al., J. Biochem. 120:587-599 (1996)). Un sistema de expresión basado en plásmidos se ha desarrollado para expresar eficazmente esta proteína en E. coli (Fukuda et al., Eur. J. Biochem. 268:5639-5646 (2001)) y los residuos implicados en la especificidad del sustrato se determinaron (Fukuda y Wakagi Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002)). Dos OFOR de Aeropyrum pernix str. Kl también han sido recientemente clonados en E. coli, que se caracteriza y se encontró que reaccionan con una amplia gama de 2-oxoácidos (Nishizawa et al., FEBS Lett. 579:2319-2322 (2005)). Las secuencias de genes de estos candidatos OFOR están disponibles, aunque no tienen identificadores GenBank asignados hasta la fecha. Hay evidencia de que las enzimas bioinformático similares están presentes en todas las bacterias anaerobias arqueas y algunas amitocondrias eucariotas (Fukuda y Wakagi, Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2005)). Esta clase de enzima también es interesante desde un punto de vista energético, como ferredoxina reducida podría ser utilizado para generar NADH por ferredoxina-NAD reductasa (Petitdemange et al., Biochim. Biophys. Acta 421:334-337 (1976)). También, puesto que la mayoría de las enzimas están diseñados para funcionar bajo condiciones anaeróbicas, menos ingeniería enzima puede ser requerido en relación con las enzimas de la familia

deshidrogenasa 2-ceto-ácido complejo para la actividad en un ambiente anaerobio.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
ST2300	NP_378302.1	15922633	*Sulfolobus tokodaii 7*

1.2.1.d. - Oxidorreductasa (fosforilación/ desfosforilación)

Ejemplos de enzimas en esta clase incluyen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa que convierte gliceraldehído-3-fosfato en D-glicerato 1,3-bifosfato (por ejemplo, E. coli gapA (Branlant y Eur. J. Biochem Branlant. 150:61-66 (1985)), aspartato-semialdehído deshidrogenasa que convierte la L-aspartato-4-semialdehído en L-4-aspartil-fosfato (por ejemplo, E. coli asd (Biellmann et al., Eur.J.Biochem. 104:53-58 (1980)), N-acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa que convierte la N-acetil-L-glutamato-5-semialdehído en N-acetil-L-glutamil-5-fosfato (por ejemplo, E. coli argC (Parsot et al., Gene 68:275-283 (1988)), y el glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa que convierte la L-glutamato-5-semialdehído en L-glutamil-5-fosfato (por ejemplo, E. coli Pro A (Smith et col. J. Bacteriol. 157:545-551 (1984)).

Gen	Acceso No.	GI No.	Organismo
gapA	P0A9B2.2	71159358	*Escherichia coli*
asd	NP_417891.1	16131307	*Escherichia coli*
argC	NP_418393.1	16131796	*Escherichia coli*
proA	NP_414778.1	16128229	*Escherichia coli*

1.3.1.a - Oxidorreductasa que opera sobre donadores CH-CH

Una enoil-CoA reductasa ilustrativa es el producto del gen de la cama de C. acetobutylicum (Atsumi et al., Metab. Eng. (2007); Boynton et al., Journal of Bacteriology 178:3015-3024 (1996), que, naturalmente, cataliza la reducción de actividad crotonilo-CoA a butiril-CoA de esta enzima puede ser mejorada mediante la expresión cama en conjunción con la expresión de los genes C. acetobutylicum etfAB, que codifican una flavoproteína de transferencia de electrones. Un candidato adicional para el paso enoil-CoA reductasa es el enoil-CoA mitocondrial reductasa de E. gracilis (Hoffmeister et al., Journal of Biological Chemistry 280:4329-4338 (2005)). Una construcción derivada de la secuencia después de la eliminación de su secuencia mitocondrial líder de la orientación fue clonado en E. coli que resulta en una enzima activa (Hoffmeister y col., supra, (2005)). Este enfoque es bien conocido por los expertos en la técnica de expresar los genes eucarióticos, particularmente

aquellos con secuencias líder que pueden atacar el producto del gen para un compartimento intracelular específica, en procariotas organismos. Un homólogo estrecho de este gen, TDE0597, del procariote Treponema denticola representa un tercer enoil-CoA reductasa, que ha sido clonado y expresado en E. coli (Tucci y Martin FEBS Letters 581: 1561-1566 (2007)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
bcd	NP_349317.1	15895968	*Clostridium acetobutylicum*
etfA	NP_349315.1	15895966	*Clostridium acetobutylicum*
etfB	NP_349316.1	15895967	*Clostridium acetobutylicum*
TER	Q5EU90.1	62287512	*Euglena gracilis*
TDE0597	NP_971211.1	42526113	*Treponema denticola*

Las enzimas 2-enoato reductasa ilustrativas (EC 1.3.1.31) se conocen por catalizar la reducción dependiente de NADH de una amplia variedad de α,β-ácidos carboxílicos insaturados y aldehídos (Rohdich et al., J. Biol. Chem. 276:5779-5787 (2001)). 2-enoato reductasa es codificada por el ENR en varias especies de clostridios (Giesel y Simon Arch y Microbiology 135 (1): P 51-57 (2001), incluyendo C. tyrobutyricum y C. thermoaceticum (ahora llamado Moorella thermoaceticum) (Rohdich. y col., supra, (2001)). En la secuencia del genoma recientemente publicada de C. kluyveri, se han reportado 9 secuencias codificadas para enoato

reductasas, fuera de las cuales una se ha caracterizado (Seedorf y col. Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 105 (6):2128-33 (2008)). Los genes Enr tanto de C. tyrobutyricum y C. thermoaceticum Se han clonado y secuenciado y muestran 59% de identidad entre sí. También se encontró que el gen anterior tiene similitud de aproximadamente al 75% del gen caracterizado en C. kluyveri (Giesel y Simon Arch. Microbiol. 135 (l):51-57 (1983)). Se ha informado sobre la base de estos resultados que la secuencia de ENR que es muy similar a la dienoil-CoA reductasa en E. coli (fadH) (163 Rohdich et al., supra (2001)). El gen ENR de C. thermoaceticum También se ha expresado en una forma enzimáticamente activa en E. coli (163 Rohdich et al., Supra (2001)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
fadH	NP_417552.1	16130976	*Escherichia coli*
enr	ACA54153.1	169405742	*Clostridium botulinum A3 str*
enr	CAA71086.1	2765041	*Clostridium tyrobutyricum*
enr	CAA76083.1	3402834	*Clostridium kluyveri*
enr	YP_430895.1	83590886	*Moorella thermoacetica*

1.4.1.a- Oxidorreductasa que opera en aminoácidos

La mayoría de oxidorreductasas que operan en aminoácidos catalizar la desaminación oxidativa de alfa-aminoácidos con NAD + o NADP + como aceptor. Las oxidoreductasas ilustrativas que operan en los aminoácidos

incluyen glutamato deshidrogenasa (desaminar), codificada por gdhA, leucina deshidrogenasa (desaminante), codificada por el ldh y aspartato deshidrogenasa (desaminante), codificada por nadX. El producto del gen gdhA de Escherichia coli (Korber et al., J. Mol. 234:1270-1273 (1993); McPherson y Nucleic Acids Res. 11:5257-5266 Wootton (1983)), GDH de Thermotoga maritima (Kort y col. extremófilos 1:52-60 (1997); Lebbink, et al. J. Mol. 280:287-296 (1998)); Lebbink et al., J. Mol. 289:357-369 (1999)) y gdhAl de Halobacterium salinarum (Ingoldsby et al., Gene 349:237-244 (2005)) catalizan la interconversión reversible de glutamato a 2-oxoglutarato y amoníaco, favoreciendo al mismo tiempo NADP (H), NAD (H), o ambos, respectivamente. El gen Idh de Bacillus cereus codifica la proteína LeuDH que tiene una variedad de gama de substratos incluyendo leucina, isoleucina, valina y 2-aminobutanoato (Ansorge y Kula Biotechnol Bioeng 68:557-562 (2000); Stoyan et al., J. Biotechnol. 54:77-80 (1997)). El gen que codifica nadX de Thermotoga marítima para la deshidrogenasa aspartato está implicado en la biosíntesis de NAD (Yang et al., J. Biol. Chem. 278:8804-8808 (2003)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
gdhA	P00370	118547	*Escherichia coli*
gdh	P96110.4	6226595	*Thermotoga maritima*
gdhA1	NP_279651.1	15789827	*Halobacterium salinarum*
ldh	P0A393	61222614	*Bacillus cereus*
nadX	NP_229443.1	15644391	*Thermotoga maritima*

La lisina 6-deshidrogenasa (desaminante), codificada por el gen lysDH, catalizan la desaminación oxidativa del grupo ε-amino de L-lisina para formar 2-aminoadipato-6-semialdehído, que a su vez no enzimáticamente se cicla para formar Δl-piperideina-6-carboxilato (Misono y Nagasaki J. Bacteriol. 150:398-401 (1982)). El gen de lysDH Geobacillus stearothermophilus codifica un termófilo NAD-dependiente lisina 6-deshidrogenasa (Heydari et al., Appl. Environ. Microbiol 70:937-942 (2004)). Además, el gen lysDH de la Aeropyrum pernix Kl se identifica a través de los proyectos de homología del genoma.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
lysDH	AB052732	13429872	*Geobacillus stearothermophilus*
lysDH	NP_147035.1	14602185	*Aeropyrum pernix K1*
ldh	P0A393	61222614	*Bacillus cereus*

2.3.1.a Aciltransferasa (grupo de transferencia de fosfato)

Las aciltransferasas de transferencia de fosfato ilustrativas incluyen fosfotransacetilasa codificada por pta y la fosfotransbutirilsa, codificada por ptb. El gen pta de E. coli codifica una enzima que puede convertir acetil-CoA en acetil-fosfato, y viceversa (Suzuki, T. Biochim. Biophys. Acta 191:559-569 (1969)). Esta enzima también puede utilizar propionil-CoA en lugar de acetil-CoA formando propionato en el proceso (Hesslinger et al., Mol. Microbiol 27:477-492 (1998)). De manera similar, el gen ptb de C. acetobutylicum codifica una enzima que puede convertir butiril-CoA en butirilo-fosfato (Walter et al., Gene 134 (1): P 107-11 (1993)); Huang et al., J. Mol. Microbiol. Biotechnol 2 (1): pág. 33-38 (2000). Genes adicionales ptb puede ser encontrado en butirato bacteria productora de L2-50 (Louis et al., J. Bacteriol. 186:2099-2106 (2004)) y Bacillus megaterium (Vázquez et al., Curr. Microbiol 42:345-349 (2001)).

Gen	Acceso No.	GI No.	Organismo
pta	NP_416800.1	16130232	*Escherichia coli*
ptb	NP_349676	15896327	*Clostridium acetobutylicum*
ptb	AAR19757.1	38425288	butyrate-producing bacterium L2-50
ptb	CAC07932.1	10046659	*Bacillus megaterium*

2.6.1.a Aminotransferasa

Las transferencias de aspartato aminotransferasa un grupo amino del aspartato al alfa-cetoglutarato, formando el glutamato y oxalacetato. Esta conversión es catalizada por, por ejemplo, los productos génicos de 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 (48, 108, 225 48 de la et al. Plant J. 46:414-425 (2006); Kwok y Hanson J. Exp. Bot. 55:595-604 (2004); Wilkie y Warren, Protein. Expr. Purif. 12:381-389 (1998)). La valina aminotransferasa cataliza la conversión de valina y piruvato a 2-cetoisovalerato y alanina. El gen de E. coli, AvtA, codifica dicha enzima (Whalen y Berg J. Bacteriol. 150:739-746 (1982)). Este producto génico también cataliza la aminación de α-cetobutirato para generar α-aminobutirato, aunque no se ha identificado el donante de amina en esta reacción (Whalen y Berg J. Bacteriol. 158:571-574 (1984)). El producto del gen serC de la E. coli cataliza dos reacciones, fosfoserina aminotransferasa y

fosfohidroxitreonina aminotransferasa (Lam y Winkler J. Bacteriol. 172:6518-6528 (1990)) y la actividad en los sustratos no fosforilados no puede ser detectada (Drewke col FEBS. Lett 390: 179-182 (1996)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
aspC	NP_415448.1	16128895	*Escherichia coli*
AAT2	P23542.3	1703040	*Saccharomyces cerevisiae*
ASP5	P46248.2	20532373	*Arabidopsis thaliana*
avtA	YP_026231.1	49176374	*Escherichia coli*
serC	NP_415427.1	16128874	*Escherichia coli*

Cargill ha desarrollado un beta-alanina/alfa-cetoglutarato aminotransferasa para la producción de 3 HP a partir de beta-alanina a través de malonil-semialdehído (PCT/US2007/076252 (Jessen et al.)). El producto del gen de SkPYD4 en Saccharomyces kluyveri. También se demostró que utiliza preferentemente beta-alanina como el grupo amino donante (Andersen et al., FEBS. J. 274: 1804-1817 (2007)). SkUGAl codifica un homólogo de GABA aminotransferasa UGA1 de Saccharomyces cerevisiae (Ramos et al., Eur. J. Biochem. 149:401-404 (1985)), mientras que SkPYD4 codifica una enzima implicada en la transaminación tanto de β-alanina como de GABA (Andersen et al., FEBS. J. 274: 1804-1817 (2007)). 3-amino-2-metilpropionato transaminasa cataliza la

transformación de semialdehído metilmalonato de 3-amino-2-metilpropiónico. La enzima se ha caracterizado en Rattus norvegicus y Sus scrofa y es codificada por Abat (Kakimoto et al., Biochim. Biophys. Acta 156:374-380 (1968); Tamaki et al., Methods Enzymol. 324:376-389 (2000)). Los candidatos enzimáticos en otros organismos con alta homología de secuencia a las transaminasas de 3-amino-2-metilpropionato incluyen Gta-1 en C. elegans y gabT en Bacillus subtilis. Además, una de las aminotransferasas nativas GABA en E. coli, codificada por el gen gabT, se ha demostrado que tienen una amplia especificidad de sustrato (Liu et al., Biochemistry 43: 10896-10905 (2004); Schulz et al., Appl Environ Microbiol 56: 1-6 (1990)). El producto del gen de puuE cataliza la otra 4-aminobutirato transaminasa en E. coli (Kurihara y col. J. Biol. Chem. 280:4602-4608 (2005)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
SkyPYD4	ABF58893.1	98626772	*Saccharomyces kluyveri*
SkUGA1	ABF58894.1	98626792	*Saccharomyces kluyveri*
UGA1	NP_011533.1	6321456	*Saccharomyces cerevisiae*
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	120779	*Escherichia coli K12*
puuE	NP_415818.1	16129263	*Escherichia coli K12*

Las estructuras cristalinas de rayos X de E. coli 4-aminobutirato sin consolidar de las transaminasas y la unión de que el inhibidor se reportaron (Liu et al., Biochemistry 43: 10896 a 10905 (2004)). La unión de sustratos y especificidades de sustratos fueron estudiadas y sugeridas. Las funciones de los residuos en los puntos activos fueron estudiadas por mutagénesis y la cristalografía de rayos X dirigidas (Liu et al., Biochemistry 44:2982-2992 (2005)). Basándose en la información estructural, se trató de diseñar 4-aminobutirato transaminasa de E. coli con actividad enzimática novedosa. Estos estudios proporcionan una base para la evolución de la actividad de las transaminasas por las rutas de BDO.

2.7.2.a. Fosfotransferasa, grupo aceptor carboxilo

Las quinasas ilustrativas incluyen la acetato quinasa de E. coli, codificada por ackA (Skarstedt y Silverstein, J. Biol. Chem. 251:6775-6783 (1976)), las quinasas de butirato de C. acetobutylicum, codificada por bukl y buk2 (Walter et al., Gene 134 (1): 107-111 (1993) (Huang et al., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2 (1):33-38 (2000)] y la quinasa de E. coli gamma-glutamil, codificada por prob (Smith et. col. J. Bacteriol. 157:545-551 (1984)). Estos acetato fosforilan enzimas, butirato, y el glutamato, respectivamente. El producto del gen ackA de E. coli también

fosforila propionato (Hesslinger et al., Mol. Microbiol. 27:477 -492 (1998)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
ackA	NP_416799.1	16130231	*Escherichia coli*
buk1	NP_349675	15896326	*Clostridium acetobutylicum*
buk2	Q97II1	20137415	*Clostridium acetobutylicum*
proB	NP_414777.1	16128228	*Escherichia coli*

2.8.3.a. Coenzima-A-transferasa

En la familia CoA-transferasa, enzima acil-CoA: acetato de Co-A-transferasa de E. coli, también conocida como acetato-CoA transferasa (EC 2.8.3.8), se ha demostrado que transfiere la porción de CoA de acetato de una variedad de sustratos acil-CoA ramificados y lineales, incluyendo isobutirato (Matthies y Schink Appl. Environ. Microbiol. 58: 1435-1439 (1992)), valerato (Vanderwinkel et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902-908 (1968)) y butanoato (Vanderwinkel, supra. (1968)). Esta enzima está codificada por atoA (subunidad alfa) y atoD (subunidad beta) en E. coli sp. K12 (Korolev et al., Acta Crystallogr. D. Crystallogr. Biol. 58:2116-2121 (2002); Vanderwinkel, supra (1968)) y actA y cg0592 Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 (Duncan et al. Appl Environ Microbiol 68:5186-5190 (2002)). Los genes

adicionales se han encontrado por una homología de secuencia incluyen atoD y atoA en UT189 de Escherichia coli.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	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*

Las transformaciones similares son catalizadas por los productos génicos de cat1 y cat3 de Clostridium kluyveri que se ha demostrado que exhiben actividad de succinil-CoA, 4-CoA-hidroxibutirilo y butirilo-CoA acetiltransferasa, respectivamente (Seedorf y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 105 (6):2128-2133 (2008); Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178 (3):871-880 (1996)].

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
cat1	P38946.1	729048	*Clostridium kluyveri*
cat2	P38942.2	1705614	*Clostridium kluyveri*
cat3	EDK35586.1	146349050	*Clostridium kluyveri*

La enzima glutaconato-CoA-transferasa (EC 2.8.3.12) de bacteria anaerobia Acidaminococcus fermentans reacciona con el diácido glutaconil-CoA y 3-butenoil-CoA (Mack y

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 de CoA incluyendo glutaril-CoA, 2-CoA-hidroxiglutarilo, adipilo-CoA y acrililo-CoA (Buckel et al., Eur. J. Biochem. 118:315-321 (1981)). La enzima ha sido clonada y expresada en E. coli (Mac et al. Eur. J. Biochem. 226:41-51 (1994)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
gctA	CAA57199.1	559392	*Acidaminococcus fermentans*
gctB	CAA57200.1	559393	*Acidaminococcus fermentans*

3.1.2.a. Tiolester hidrolasa (CoA específica)

En la familia CoA hidrolasa, la enzima 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa es específica para el 3-HIBCoA y ha sido descrita de manera eficiente para catalizar la transformación deseada durante la degradación de valina (Shimomura et al, J. Biol. Chem. 269: 14248 a 14253 (1994)). Los genes que codifican esta enzima incluyen hibch de Rattus norvegicus (Shimomura et al., supra (1994); Shimomura y col. Methods Enzymol. 324:229-240 (2000) y Homo sapiens (Shimomura et al., Supra, 2000). Los genes candidatos por homología de secuencia incluyen hibch de Saccharomyces cerevisiae y BC_2292 de Bacillus cereus.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
hibch	Q5XIE6.2	146324906	*Rattus norvegicus*
hibch	Q6NVY1.2	146324905	*Homo sapiens*
hibch	P28817.2	2506374	*Saccharomyces cerevisiae*
BC_2292	Q81DR3	81434808	*Bacillus cereus*

La conversión de adipilo-CoA a adipato puede llevarse a cabo por una hidrolasa de acil-CoA o equivalentemente una tioesterasa. El gen de E. coli candidato superior es tesB (Naggert et al., J. Biol. Chem. 266 (17): 11044 a 11050 (1991)], que muestra gran similitud con el acot8 humano que es un ácido dicarboxílico con actividad adipilo-CoA acetiltransferasa (Westin y cols. J. Biol. Chem. 280 (46): 38125-38132 (2005). Esta actividad también se ha caracterizado en el hígado de la rata (Deana, Int. Biochem. 26 (4): p 767-773 (1992)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
tesB	NP_414986	16128437	*Escherichia coli*
acot8	CAA15502	3191970	*Homo sapiens*
acot8	NP_570112	51036669	*Rattus norvegicus*

Otras posiblas E. coli hidrolasas de tioléster incluyen los productos génicos de tesA (Bonner y Bloch, J. Biol. Chem. 247 (10):3123-3133 (1972)), ybgC (Kuznetsova et al., FEMS Microbiol. Rev. 29 (2):263-279 (2005); Zhuang et

al., FEBS Lett. 516 (1-3): 161-163 (2002)) paaI (Song et al., J. Biol. Chem. 281 (16): 11028 a 11038 (2006)) y ybdB (Leduc et al., J. Bacteriol. 189 (19):7112-7126 (2007)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
tesA	NP_415027	16128478	*Escherichia coli*
ybgC	NP_415264	16128711	*Escherichia coli*
paaI	NP_415914	16129357	*Escherichia coli*
ybdB	NP_415129	16128580	*Escherichia coli*

Varias acetil-CoA hidrolasas eucatióticas (EC 3.1.2.1) tienen amplia especificidad de susrato. La enzima de cerebro Rattusnorvegicus (Robinson et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 71:959-965 (1976) pueden reaccionar con butiril-CoA, hexanoil-CoA y malonil-CoA.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
acot12	NP_570103.1	18543355	*Rattus norvegicus*

4.1.1.a. Carboxi-liasa

Una carboxiliasa ilustrativa es acetolactato descarboxilasa que participa en el catabolismo de citrato y de cadena ramificada de biosíntesis de aminoácidos, la conversión de 2-acetolactato a acetoína. En la enzima Lactococcus lactis se compone de seis subunidades,

codificadas por los genes aldB, y se activa por valina, leucina e isoleucina (Goupil et al., Appl. Environ. Microbiol 62:2636-2640 (1996); Goupil-Feuillerat et al., J. Bacteriol. 182:5399-5408 (2000)). Esta enzima ha sido sobreexpresado y caracterizado en E. coli (Phalip et al., FEBS Lett. 351:95-99 (1994)). En otros organismos la enzima es un dímero, codificada por aldC en Streptococcus thermophilus (Monnet et al., Lett. Appl. Microbiol. 36:399-405 (2003)), aldB en Bacillus brevis (Diderichsen y col. J. Bacteriol. 172:4315-4321 (1990); Najmudin et al., Acta Crystallogr. D. Biol Crystallogr. 59: 1073-1075 (2003)) y el budA de Enterobacter aerogenes (Diderichsen y otros J. Bacteriol 172:4315-4321 (1990)). La enzima de Bacillus brevis fue clonado y sobreexpresado en Bacillus subtilis y se caracteriza cristalográficamente (Najmudin et al., Acta Crystallogr. Crystallogr.D.Biol 59: 1073-1075 (2003)). Además, la enzima de Leuconostoc lactis se ha purificado y caracterizado el gen pero no ha sido aislado (O'Sullivan et al., FEMS Microbiol. Lett. 194:245-249 (2001)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
aldB	NP_267384.1	15673210	*Lactococcus lactis*
aldC	Q8L208	75401480	*Streptococcus thermophilus*
aldB	P23616.1	113592	*Bacillus brevis*
budA	P05361.1	113593	*Enterobacter aerogenes*

La aconitato descarboxilasa cataliza el paso final en la biosíntesis de itaconato en una cepa de Candida y también en el hongo filamentoso Aspergillus terreus (Bonnarme et al., J. Bacteriol. 177:3573-3578 (1995); Willke y Vorlop Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:289-295 (2001)). Aunque itaconato es un compuesto de interés biotecnológico, el gen descarboxilasa aconitato o secuencia de la proteína no se ha informado hasta la fecha.

4-oxalocronato descarboxilasa 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., J. Bacteriol. 174:711-724 (1992)), y xylII xylIII de Pseudomonas putida (Kato y Asano Arch. Microbiol 168:457-463 (1997), Lian y J. Am. Chem. Soc. Whitman 116: 10403 hasta 10411 (1994), Stanley et al., Biochemistry 39:3514 (2000)) y Reut_B5691 y Reut_B5692 de Ralstonia eutropha JMP134 (Hughes et al., J. Bacteriol. 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)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	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*

Una clase adicional de descarboxilasas se ha caracterizado que catalizan la conversión de cinamato (fenilacrilato) y derivados sustituidos de cinamato a los derivados de estireno correspondientes. Estas enzimas son comunes en una variedad de organismos y genes específicos que codifican estas enzimas que se han clonado y expresado en E. coli son: pad 1 de Saccharomyces cerevisiae (Clausen et al., Gene 142:. 107-112 (1994)), PDC desde Lactobacillus plantarum (Barthelmebs et al., Appl. Environ. Microbiol. 67: 1063-1069 (2001), Qi et al., Metab. Eng. 9:268-276 (2007), Rodríguez et al., Chem. 56:3068-3072 J. Agric. Food (2008)), pofK (PAD) de Klebsiella oxytoca (Hashidoko et al., Biosci. Biotech. Biochem 58:217-218 (1994); Uchiyama et al., Biosci. Biotechnol. Biochem 72: 116-123 (2008)), Pedicoccus pentosaceus (Barthelmebs et al., Appl. Environ. Microbiol. 67: 1063-1069 (2001)) y PADC de Bacillus subtilis y Bacillus pumilus (Lingen et al., Protein Eng. 15:585-593 (2002)). Un descarboxilasa del ácido ferúlico de Pseudomonas fluorescens también se ha purificado y caracterizado (Huang et al., J.

Bacteriol. 176:5912-5918 (1994)). Es importante destacar que esta clase de enzimas han demostrado ser estables y no requieren ya sea exógena o unido internamente co-factores, así haciendo estas enzimas idealmente adecuado para biotransformaciones (Sariaslani, Annu. Rev. Microbiol. 61:51-69 (2007)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
pad1	AB368798 BAG32372.1	188496948 188496949	*Saccharomyces cerevisae*
pdc	U63827 AAC45282.1	1762615, 1762616	*Lactobacillus plantarum*
pofK (pad)	AB330293, BAF65031.1	149941607, 149941608	*Klebsiella oxytoca*
padC	AF017117 AAC46254.1	2394281, 2394282	*Bacillus subtilis*
pad	AJ276891 CAC16794.1	11322456, 11322458	*Pedicoccus pentosaceus*
pad	AJ278683 CAC18719.1	11691809, 11691810	*Bacillus pumilus*

Otras enzimas descarboxilasa pueden formar semialdehído succínico a partir de alfa-cetoglutarato. Estqs incluyen las enzimas alfa-cetoglutarato descarboxilasas de Euglena gracilis (Shigeoka et al., Biochem 282 (Pt 2):319-323 (1992); Shigeoka y Arch. Biochem. Biophys Nakano 288:22-28 (1991); Shigeoka y Biochem Nakano 292 (Pt 2):463-467 (1993)), cuya secuencia genética correspondiente aún no se ha determinado, y de Mycobacterium tuberculosis (Tian et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 102: 10670 - 10675 (2005)). Además, las enzimas glutamato descarboxilasa se pueden convertir en glutamato 4-aminobutirato tales como los productos de la E. coli gadA y los genes gadB (De Biase et al., Proteína. Expr. Purif. 8:430-438 (1993)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
kgd	O50463.4	160395583	*Mycobacterium tuberculosis*
gadA	NP_417974	16131389	*Escherichia coli*
gadB	NP_416010	16129452	*Escherichia coli*

Ceto-ácido descarboxilasas

Piruvato descarboxilasa (PDC, EC 4.1.1.1), también denominada ceto-ácido descarboxilasa, una enzima clave en la fermentación alcohólica, que cataliza la descarboxilación del piruvato a acetaldehído. Esta enzima tiene un rango amplio sustrato para 2-ceto ácidos alifáticos incluyendo 2-cetobutirato, 2-cetovalerato, 3-hidroxipiruvato y 2-fenilpiruvato (Berg y otros, Science 318: 1782-1786 (2007)). El PDC de Zymomonas mobilus, codificada por el PDC, ha sido objeto de estudios de ingeniería dirigidos que alteraron la afinidad por diferentes sustratos (Siegert et al., Protein. Eng. Des. Sel. 18:345-357 (2005)). El PDC de Saccharomyces cerevisiae también ha sido ampliamente estudiado, diseñado para la modificación de la actividad, y funcionalmente

expresado en E. coli (Killeberg-Jabs y otros Eur. J. Biochem 268: 1698-1704 (2001); Li y Jordania Biochemistry 38:10004 a 10012 (1999); ter Schure y otros Appl. Environ. Microbiol 64: 1303-1307 (1998)). La estructura cristalina de esta enzima está disponible (Killeberg-Jabs Eur. J. Biochem 268: 1698-1704 (2001)). Otros candidatos de PDC bien caracterizados incluyen las enzimas de Acetobacter pasteurianos (Chandra et al., Arch. Microbiol. 176:443-451 (2001)) y Kluyveromyces lactis (Krieger et al., Eur. J. Biochem. 269:3256-3263 (2002)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
pdc	P06672.1	118391	*Zymomonas mobilus*
pdc1	P06169	30923172	*Saccharomyces cerevisiae*
pdc	Q8L388	75401616	*Acetobacter pasteurians*
pdc1	Q12629	52788279	*Kluyveromyces lactis*

Al igual que el PDC, la benzoilformato descarboxilasa (EC 4.1.1.7) tiene un amplio rango de sustrato y ha sido objeto de estudios de ingeniería de enzimas. La enzima de Pseudomonas putida ha sido ampliamente estudiada y las estructuras cristalinas de esta enzima están disponibles (Hasson et al., Biochemistry 37:9918-9930 (1998); Polovnikova et al., Biochemistry 42: 1820-1830 (2003)). La mutagénesis dirigida de dos residuos en el sitio activo de la enzima de Pseudomonas putida alteró la afinidad (Km) de forma natural y

sustratos no de origen natural (Siegert Protein Eng. Des Sel 18:345-357 (2005)). Las propiedades de esta enzima han sido modificadas por la ingeniería dirigida (Lingen et al., Ing. proteína 15:585-593 (2002)); Lingen ChemBioChem 4:721-726 (2003)). La enzima de Pseudomonas aeruginosa, codificada por MDLC, también se ha caracterizado experimentalmente (Barrowman et al., FEMS Microbiology Letters 34:57-60 (1986)). Los candidatos adicionales de genes de Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas fluorescens y otros organismos se puede deducir por homología de secuencia o identificados mediante un sistema de selección desarrollado en el crecimiento de Pseudomonas putida (Henning et al., Appl.Environ.Microbiol 72:7510 - 7517 (2006)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
mdlC	P20906.2	3915757	*Pseudomonas putida*
mdlC	Q9HUR2.1	81539678	*Pseudomonas aeruginosa*
dpgB	ABN80423.1	126202187	*Pseudomonas stutzeri*
ilvB-1	YP_260581.1	70730840	*Pseudomonas fluorescens*

4.2.1.a. Hidro-liasa

La (hidroximetil) glutarato 2-deshidratasa de Eubacterium barkeri es un ejemplo de hidro-liasa. Esta enzima se ha estudiado en el contexto de catabolismo de nicotinato y está codificado por HMD (Alhapel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 103: 12341-12346 (2006)). Enzimas similares con

alta homología de secuencia se encuentran en Bacteroides capillosus, Anaerotruncus colihominis y Natranaerobius thermophilius.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
hmd	ABC88407.1	86278275	*Eubacterium barkeri*
BACCAP_02294	ZP_02036683.1	154498305	*Bacteroides capillosus* ATCC 29799
ANACOL_02527	ZP_02443222.1	167771169	*Anaerotruncus colihominis* DSM 17241
NtherDRAFT_2368	ZP_02852366.1	169192667	*Natranaerobius thermophilus* JW/NM-WN-LF

Una segunda hidro-liasa ilustrativa es fumarato hidratasa, un enzima que cataliza la deshidratación de malato a fumarato. Una gran cantidad de información estructural está disponible para esta enzima y los investigadores han diseñado con éxito la enzima para alterar la actividad, la inhibición y la localización (Weaver, T. Acta Crystallogr. D Crystallogr. Biol. 61: 1395-1401 (2005)). Las fumarato hidratasas adicionales son las codificadas por fumC de Escherichia coli (Estévez et al., Protein. Sci. 11: 1552-1557 (2002), Hong y Lee Biotechnol. Bioprocess. Eng. 9:252-255 (2004), Rose y Weaver Proc Natl. Acad. Sci. USA 101:3393-3397 (2004)), Campylobacter jejuni (Smith et al., Int. J. Biochem. Cell Biol. 31:961-975 (1999)) y Thermus thermophilus (Mizobata et al. Arch. Biochem. Biophys. 355:49-55 (1998)), y fumH de Rattus norvegicus (Kobayashi et al., J. Biochem. 89: 1923-1931 (1981)). Las enzimas similares con alta homología

de secuencia incluyen fuml de Arabidopsis thaliana y fumC de Corynebacterium glutamicum.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
fumC	P05042.1	120601	*Escherichia coli K12*
fumC	O69294.1	9789756	*Campylobacter jejuni*
fumC	P84127	75427690	*Thermus thermophilus*
fumH	P14408.1	120605	*Rattus norvegicus*
fum1	P93033.2	39931311	*Arabidopsis thaliana*
fumC	Q8NRN8.1	39931596	*Corynebacterium glutamicum*

La Citramalato hidroliasa, también llamada 2-metulmalato deshidratasa, convierte el 2-metilmalato de mesaconato. La actividad de 2-Metilmalato deshidratasa se detectó en Clostridium tetanomorphum, Morganella morganii, Citrobacter amalonaticus en el contexto de la degradación de la ruta de glutamato VI (Kato y Asano Arch. Microbiol. 168:457-463 (1997)), sin embargo los genes que codifican esta enzima no tienen han secuenciado hasta la fecha.

El producto del gen de CRT de C. acetobutylicum cataliza la deshidratación de 3-hidroxibutiril-CoA a crotonil-CoA (Atsumi et al., Metab Eng.; 29 (2007)); Boynton et al., Diario de Bacteriología 178:3015-3024 (1996)). El enoil-CoA hidratasss, phaA y phaB, de P. putida se cree que llevar a cabo la hidroxilación de los dobles enlaces durante el catabolismo fenilacetato; (Olivera et al., Proc Natl Acad

Sci E.U.A. 95 (11):6419-6424 (1998)). El paaA y paaB de P. fluorescens catalizan transformaciones análogas (14 Olivera et al., Supra, 1998). Por último, un número de genes de Escherichia coli se ha demostrado que demostrar enoil-CoA funcionalidad hidratasa incluyendo maoC (Park y Lee, J. Bacteriol 185 (18):5391-5397 (2003)), paaF (Park y Lee, Biotechnol Bioeng. 86 (6): 681-686 (2004a)), Park y Lee, Appl. Biochem. Biotechnol. 113-116: 335-346 (2004b)), Ismail et al., Eur. J. Biochem. 270 (14): pág. 3047-3054 (2003), y el PAAG (Park y Lee, supra, 2004; Park y Lee supra, 2004b; Ismail et al, supra, 2003).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
maoC	NP_415905.1	16129348	*Escherichia coli*
paaF	NP_415911.1	16129354	*Escherichia coli*
paaG	NP_415912.1	16129355	*Escherichia coli*
crt	NP_349318.1	15895969	*Clostridium acetobutylicum*
paaA	NP_745427.1	26990002	*Pseudomonas putida*
paaB	NP_745426.1	26990001	*Pseudomonas putida*
phaA	ABF82233.1	106636093	*Pseudomonas fluorescens*
phaB	ABF82234.1	106636094	*Pseudomonas fluorescens*

Los genes de E. coli fadA y fadB codifican un complejo multienzimático que exhibe actividades de cetoacil-CoA tiolasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, y enoil-CoA

hidratasa (Yang et al., Biochemistry 30 (27): P. 6788 hasta 6795 (1991); Yang et al., J. Biol. Chem. 265 (18): p 10424 a 10429 (1990); Yang et al., J. Biol. Chem. 266 (24): p 16255 (1991); Nakahigashi y ácidos nucleicos Inokuchi Res. 18 (16): p 4937 (1990)). Los genes fadI codifican funciones similares y fadJ y se expresan naturalmente sólo anaeróbicamente (Campbell et al., Mol. Microbiol. 47 (3): P 793-805 (2003). Un método para producir poli [(R)-3-hidroxibutirato] en E. coli que implica la activación de fadB (al noquear a un regulador negativo, FadR) y co-expresión de una cetotiolasa no nativo (phaA de Ralstonia eutropha) se ha descrito anteriormente (Sato et al., J. Biosci. Bioeng. 103 (1): 38-44 (2007)). Este trabajo demuestra claramente que una enzima β-oxidación, en particular, el producto fadB del gen que codifica actividades tanto de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa como de enoil-CoA hidratasa, puede funcionar como parte de una ruta para producir moléculas de cadena más largas a partir de precursores acetil-CoA.

Gen	Acceso No.	**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*

4.3.1.a Amonio-liasa

La aspartasa (EC 4.3.1.1), que cataliza la desaminación de aspartato a fumarato, es una enzima generalizada en los microorganismos, y se ha caracterizado extensamente (Viola, R.E. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. 74:295-341 (2000)). La estructura cristalina de la aspartasa E. coli, codificada por aspA, ha sido resuelto (Shi et al., Biochemistry 36:9136-9144 (1997)). La enzima de de E. coli también se ha demostrado que reacciona con sustratos alternativos, ester aspartato fenilmetilo, asparagina, bencil-aspartato y malato (Ma et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 672:60-65 (1992)). En un estudio separado, la evolución dirigida se ha empleado en esta enzima para alterar la especificidad de sustrato (Asano et al., Biomol. Eng 22:95-101 (2005)). Las enzimas con funcionalidad aspartasa también se han caracterizado en Haemophilus influenzae (Sjostrom et al. Biochim. Biophys. Acta 1324: 182-190 (1997)), Pseudomonas fluorescens (Takagi et al. J. Biochem. 96:545-552 (1984)), Bacillus subtilis (Sjostrom et al., Biochim. Biophys. Acta 1324: 182-190 (1997)) y Serratia marcescens (Takagi y Kisumi J. Bacteriol. 161: 1-6. (1985)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
aspA	NP_418562	90111690	*Escherichia coli K12 subsp. MG1655*
aspA	P44324.1	1168534	*Haemophilus influenzae*
aspA	P07346.1	114273	*Pseudomonas fluorescens*
ansB	P26899.1	114271	*Bacillus subtilus*
aspA	P33109.1	416661	*Serratia marcescens*

La 3-metilaspartasa (EC 4.3.1.2), también conocida como beta-metilaspartasa o 3-metilaspartato amoníaco-liasa, cataliza la desaminación de treo-3-metilasparatato a mesaconate. La 3-metilaspartasa de Clostridium tetanomorphum ha sido clonada, expresada funcionalmente en E. coli, y se cristalizó (Asunción et al., Acta Biol. Crystallogr. D Crystallogr. 57:731-733 (2001); Asunción et al., J. Biol. Chem. 277:8306-8311 (2002); Botting et al., Biochemistry 27:2953-2955 (1988); Goda et al., Biochemistry 31: 10747 a 10756 (1992). En Citrobacter amalonaticus, esta enzima está codificada por BAA28709 (Kato y Asano Arch. Microbiol. 168:457-463 (1997)). 3-Metilaspartasa también se ha cristalizado a partir de E. coli YG1002 (Asano y Kato FEMS Microbiol Lett. 118:255-258 (1994)), aunque la secuencia de la proteína no se encuentra en las bases de datos públicas, como el GenBank de homología de secuencia se puede utilizar para identificar los genes candidatos adicionales, incluyendo CTC_02563 en C. tetani y ECs0761 en Escherichia coli 0157: H7.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	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*

Las enzimas candidatas de amoníaco liasa que forman productos enoil-CoA incluyen beta-alanil-CoA amoníaco-liasa (EC 4.3.1.6), que desamina beta-alanil-CoA, y 3-aminobutiril-CoA amoníaco-liasa (EC 4.3.1.14). Dos de beta-alanil-CoA amoníaco liasas han sido identificadas y caracterizadas en Clostridium propionicum (Herrmann et al., FEBS J. 272:813-821 (2005)). No hay otros beta-alanil-CoA amoniaco liasa que han sido estudiados hasta la fecha, pero los candidatos de genes pueden ser identificados por la similitud de secuencias. Uno de estos candidatos es MXAN_4385 en Myxococcus xanthus.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
ac12	CAG29275.1	47496504	*Clostridium propionicum*
acl1	CAG29274.1	47496502	*Clostridium propionicum*
MXAN_4385	YP_632558.1	108756898	*Myxococcus xanthus*

5.3.3.a. Isomerasa

Las 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasas tanto de Clostridium aminobutyrium como C. kluyveri catalizan la conversión reversible de 4-hidroxibutiril-CoA a crotonilo-CoA

y poseen una actividad intrínseca de vinilacetil Δ-CoA-isomerasa (Scherf y Buckel Eur. J. Biochem. 215:421-429 (1993); Scherf et al., Arch. Microbiol. 161:239-245 (1994)). Ambas enzimas nativas fueron purificadas y caracterizadas, incluyendo las secuencias de ácido N-terminal amino (Scherf y Buckel, supra, 1993; Scherf et al., supra, 1994). Los genes de abfD de C. aminobutyrium y C. kluyveri coinciden exactamente con estas secuencias de ácido N-terminal amino, por lo tanto se codifican las deshidratasas 4-hidroxibutiril-CoA o vinilacetil-CoA- Δ-isomerasa. Además, el gen de abfD de Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 se identifica a través de los proyectos de homología del genoma.

Gen	Acceso No.	**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*

5.4.3.a. Aminomutasa

La Lisina 2,3-aminomutasa (EC 5.4.3.2) es una aminomutasa ilustrativa que convierte a la (3S)-3,6-diaminohexanoato lisina, desplazando un grupo amina a partir de la posición 2 a la 3. La enzima se encuentra en las bacterias que fermentan lisina a acetato y butirato,

incluyendo como Fusobacterium nuleatum (kamA) (Barker et al., J. Bacteriol. 152:201-207 (1982)) y Clostridium subterminale (kamA) (Chirpich et al., J. Biol. Chem. 245: 1778-1789 (1970)). La enzima de Clostridium subterminale se ha cristalizado (Lepore y otros, Proc. E.U.A. 102: 13819 a 13824 (2005)). Una enzima que codifica esta función también está codificada por yodo en Bacillus subtilis (Chen et al., Biochem. 348 Pt 3:539-549 (2000)). La enzima utiliza piridoxal 5'-fosfato como cofactor, requiere la activación por S-Adenosilmetionina, y es estereoselectiva, reaccionando con el único con L-lisina. No se ha demostrado que la enzima reaccionan con sustratos alternativos.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
yodO	O34676.1	4033499	*Bacillus subtilus*
kamA	Q9XBQ8.1	75423266	*Clostridium subterminale*
kamA	Q8RHX4	81485301	*Fusobacterium nuleatum subsp. nuleatum*

Una segunda aminomutasa, beta-lisina 5,6-aminomutasa (EC 5.4.3.3), cataliza la siguiente etapa de fermentación lisina a acetato y butirato, que transforma (3S)-3,6-diaminohexanoato a (3S,5S)-3,5-diaminohexanoato, desplazando un grupo amino terminal de la posición 6 a la 5. Esta enzima también cataliza la conversión de lisina a 2,5-diaminohexanoato y también se llama lisina-5,6-aminomutasa (EC 5.4.3.4). La enzima se ha cristalizado en Clostridium

sticklandii (kamD, kamE) (Berkovitch et al., Proc. E.U.A. 101:15870-15875 (2004)). La enzima de Porphyromonas gingivalis también se ha caracterizado (Tang et al., Biochemistry 41:8767-8776 (2002)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
kamD	AAC79717.1	3928904	*Clostridium sticklandii*
kamE	AAC79718.1	3928905	*Clostridium sticklandii*
kamD	NC_002950.2	34539880, 34540809	*Porphyromonas gingivalis W83*
kamE	NC_002950.2	34539880, 34540810	*Porphyromonas gingivalis W83*

4,5-ornitina aminomutasa (EC 5.4.3.5) convierte D-ornitina a 2,4-diaminopentanoato, también cambiando una amina terminal al carbono adyacente. La enzima de Clostridium sticklandii está codificada por dos genes, oraE y oraS, y ha sido clonado, secuenciado y expresado en E. coli (Chen et al., J. Biol. Chem. 276: 44744 a 44750 (2001)). Esta enzima no se ha caracterizado en otros organismos hasta la fecha.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
oraE	AAK72502	17223685	*Clostridium sticklandii*
oraS	AAK72501	17223684	*Clostridium sticklandii*

La tirosina 2,3-aminomutasa (EC 5.4.3.6) participa en la biosíntesis de la tirosina, la conversión de tirosina reversiblemente a propanoato 3-amino-3-(4-hidroxifenilo)

desplazando una amina de la posición 2 a 3. En Streptomyces globisporus la enzima también se ha demostrado que reacciona con los derivados de tirosina (Christenson et al., Biochemistry 42: 12708 a 12718 (2003)). La secuencia de información no está disponible.

La leucina 2,3-aminomutasa (EC 5.4.3.7) se convierte en L-leucina a la beta-leucina durante la degradación y biosíntesis de leucina. Un ensayo para actividad detectada de leucina 2,3-aminomutasa en muchos organismos (Poston, JM Methods Enzymol. 166: 130-135 (1988)), pero los genes que codifican la enzima no se han identificado hasta la fecha.

Cargill ha desarrollado una nueva enzima 2,3-aminomutasa para convertir la L-alanina a β-alanina, creando así una ruta de piruvato a 3-HP en cuatro pasos bioquímicos (Liao et al., E.U.A. Publicación No. 2005-0221466).

6.2.1.a. Acido-tiol ligasa

Una ligasa ácido-tiol ilustrativa de los productos génicos de sucCD de E. coli que en conjunto catalizan la formación de succinil-CoA de succinato con el consumo concomitante de un ATP, una reacción que es reversible en vivo (Buck et al., Biochemistry 24 (22): p 6245 -6252 (1985)). Las CoA-ligasas adicionales ilustrativas incluyen la rata dicarboxilato-CoA ligasa para la cual está todavía sin

caracterizar la secuencia (Vamecq et al., Biochem. J. 230 (3): P 683-693 (1985)), cualquiera de los dos caracterizado fenilacetato-CoA ligasas de P. chrysogenum (Lamas-Maceiras y otros Biochem. J. 395 (1): 147 a 155 (2006), Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun, 360 (2):453-458 (2007)), la fenilacetato-CoA ligasa de Pseudomonas putida (Martínez-Bianco et al., J Biol Chem. 265 (12):7084-7090 (1990)) y la 6-carboxyhexanoato-CoA ligasa a partir de Bacillus subtilis (Bower et al., J. Bacteriol 178 (14) :4122-4130 (1996)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
sucC	NP_415256.1	16128703	*Escherichia coli*
sucD	AAC73823.1	1786949	*Escherichia coli*
phl	CAJ15517.1	77019264	*Penicillium chrysogenum*
phlB	ABS19624.1	152002983	*Penicillium chrysogenum*
paaF	AAC24333.2	22711873	*Pseudomonas putida*
bioW	NP_390902.2	50812281	*Bacillus subtilis*

Ejemplo V

Ruta ilustrativa de BDO succinil-CoA

Este ejemplo describe rutas ilustrativas de BDO succinil-CoA.

Las rutas de BDO succinil-CoA se describen en la presente y se han descrito anteriormente (véase el número de serie solicitud de E.U.A. 12/049,256, presentada el 14 de

marzo 2008 y la solicitud PCT No. de serie US08/57168, presentada el 14 de marzo 2008, cada uno de los cuales se incorpora aquí por referencia). Las rutas adicionales se muestran en la Figura 8A. Las enzimas de las rutas ilustrativas BDO se enumeran en la Tabla 15, junto con los genes que codifican estas enzimas ilustrativas.

En resumen, succinil-CoA se puede convertir en semialdehído succínico por succinil-CoA reductasa (o semialdehído succinato deshidrogenasa) (EC 1.2.l.b.). El succinato semialdehído se puede convertir en 4-hidroxibutirato por 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (EC 1.1.1.a), como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, succinil-CoA se puede convertir en 4-hidroxibutirato por succinil-CoA reductasa (formador de alcohol) (EC lllc). 4-hidroxibutirato se puede convertir en 4-hidroxibutiril-CoA por 4-hidroxibutiril-CoA transferasa (EC 2.8.3.a), como se ha descrito anteriormente, o por 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.a) o 4-hidroxibutiril-CoA ligasa (o 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa) (EC 6.2.1.a). Alternativamente, 4-hidroxibutirato se puede convertir en 4-hidroxibutiril-fosfato de 4-hidroxibutirato quinasa (EC 2.7.2.a), como se ha descrito anteriormente. 4-hidroxibutiril-fosfato se puede convertir en 4-hidroxibutiril-CoA por fosfotrans-4-hidroxibutirilasa (EC 2.3.1.a), como se ha descrito anteriormente.

Alternativamente, 4-hidroxibutiril-fosfato se puede convertir en 4-hidroxibutanal por 4-hidroxibutanal deshidrogenasa (fosforilación) (EC 1.2.1.d). 4-hidroxibutiril-CoA se puede convertir en 4-hidroxibutanal por 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (o 4-hidroxibutanal deshidrogenasa) (EC 1.2.1.b.). Alternativamente, 4-hidroxibutiril-CoA se puede convertir en 1,4-butanodiol por 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol) (EC l.l.l.c). 4-hidroxibutanal se puede convertir en 1,4-butanodiol por 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1.a), como se ha descrito anteriormente.

Tabla 15. Ruta BDO de succinil-CoA

Figura	Clase EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de Enzima	Nombre de gen	GenBank ID (si està disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
8A	1.2.1.b	succinil-CoA	semialdehìdo succinico	succinil-CoA reductasa (o succinate semialdehìdo deshidrogenasa)	*sueD*	P3S947.1	*Clostridium kluyveri*	succinil-CoA
					sueD	NP_904963.1	*Porphyromonas gingiva/is*	succinil-CoA
					Msed_0709	YP_001190SOS.1	*Metallosphaera sedula*	malonil-CoA
8A	1.1.1.a	succinato semialdehìdo	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutirato deshidrogenasa	*4hbd*	YP_726053.1	*Ralstonia eutropha H16*	4-hidroxibutirato
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	4-hidroxibutirato
					4hbd	Q94B07	*Arabidopsis thaliana*	4-hidroxibutirato
8A	1.1.1.c	succinil-CoA	4-hidroxibutirato	succinil-CoA reductasa (formador de alcohol)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium aeetobutylieum*	butanoilo-CoA
					mer	AAS20429.1	*Chloroflexus aurantiaeus*	malonil-CoA
					FAR	AAD3S039.1	*Simmondsia ehinensis*	Acilo de cadena larga CoA

8A	2.S.3.a	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA transferasa	*catl, cat2, cat3*	P3S946.1, P3S942.2, EDK355S6.1	*Clostridium kluyveri*	succinate, 4-hidroxibutirato, butirate
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Acidaminococcus fermentans*	glutarato
					atoA, atoD	P76459.1, P7645S.l	*Escherichia coli*	butanoato
8A	3.1.2.a	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa	*tesB*	NP_4149S6	*Escherichia coli*	adipil-CoA
					acotl2	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*	butiril-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*	3-hidroxipropanoil-CoA
8A	6.2.1.a	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA ligasa(o 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73S23.1	*Escherichia coli*	succinate
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	fenilacetato
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxihexanoato

8A	2.7.2.a	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutiril-fosfato	4-hidroxibutirato cinasea	*ackA*	NP_416799.1	*Escherichia coli*	acetato, propionato
					bukl	NP_349675	*Clostridium acetobutilicum*	butirato
					buk2	Q97II1	*Clostridium acetobutilicum*	butirato
8A	2.3.1.a	4-hidroxibutiril-fosfato	4-hidroxibutiril-CoA	fosfotrans-4-hidroxibutirilasa	*ptb*	NP_349676	*Clostridium acetobutilicum*	butiril-fosfato
					ptb	AAR19757.1	*butirate-producing bacterium L2-50*	butiril-fosfato
					ptb	CAC07932.1	*Bacillus megaterium*	butiril-fosfato
8A	1.2.1.d	4-hidroxibutiril-fosfato	4-hidroxibutanal	4-hidroxibutanal deshidrogenasa (fosforilaciòn)	*asd*	NP_417891.1	*Escherichia coli*	L-4-aspartil-fosfato
					proA	NP_41477S.l	*Escherichia coli*	L-glutamil-5-fospato
					gapA	POA9B2.2	*Escherichia coli*	Gliceraldehido-3-fosfato

8A	1.2.1.b	4-hidroxibutiril -CoA	4-hidroxibutanal	4-hidroxibutiril-CoA reductasa (o 4-hidroxibutanal deshidrogenasa)	*sueD*	P3S947.1	*Clostridium kluyveri*	succinil-CoA
					sueD	NP_904963.1	*Porphyromonas gingivalis*	succinil-CoA
					Msed_0709	YP_001190SOS.1	*Metallosphaera sedula*	malonil-CoA
8A	1.1.1.c	4-hidroxibutiril -CoA	1,4-butanodiol	4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutilicum*	butanoil-CoA
					mer	AAS20429.1	*Chloroflexus aurantiacus*	malonil-CoA
					FAR	AAD3S039.1	*Simmondsia chinensis*	acil- CoA cadena larga
8A	1.1.1.a	4-hidroxibutanal	1,4-butanodiol	1,4-butanodiol deshidrogenasa	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevzszae*	general
					yqhD	NP_4174S4.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Succinato semialdheido

Ejemplo VI

Otros ejemplos de rutas de BDO de Alfa-cetoglutarato

Este ejemplo describe las rutas de BDO ilustrativas de alfa-cetoglutarato.

Las rutas de BDO succinil-CoA se describen en la presente y se han descrito anteriormente (véase la solicitud de número de serie E.U.A. 12/049,256, presentada el 14 de marzo 2008 y la solicitud de PCT No. de serie US08/57168, presentada el 14 de marzo 2008, cada uno de los cuales se incorpora aquí por referencia).

Las rutas adicionales se muestran en la Figura 8B. Las enzimas de tales rutas ilustrativas de BDO se enumeran en la Tabla 16, junto con los genes que codifican estas enzimas ilustrativas.

En resumen, alfa-cetoglutarato se puede convertir en semialdehído succínico por alfa-cetoglutarato descarboxilasa (EC 4.1.1.a), como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, alfa-cetoglutarato puede ser convertido a glutamato por glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1. a). 4-aminobutirato se puede convertir en semialdehído succínico por 4-aminobutirato oxidorreductasa (desaminante) (EC 1.4.1.a) o 4-aminobutirato transaminasa (EC 2.6.1. a). El glutamato se puede convertir en 4-aminobutirato por glutamato descarboxilasa (EC 4.1.1. a). El succinato semialdehído se

puede convertir en 4-hidroxibutirato por 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (EC 1.1.1.a), como se ha descrito anteriormente. 4-hidroxibutirato se puede convertir en 4-hidroxibutiril-CoA por 4-hidroxibutiril-CoA transferasa (EC 2.8.3.a), como se ha descrito anteriormente, o por 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.a), o 4-hidroxibutiril-CoA ligasa (o 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa) (EC 6.2.1. a). 4-hidroxibutirato se puede convertir en 4-hidroxibutiril-fosfato de 4-hidroxibutirato quinasa (EC 2.7.2. a). 4-hidroxibutiril-fosfato se puede convertir en 4-hidroxibutiril-CoA por fosfotrans-4-hidroxibutirilasa (EC 2.3.1.a), como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, 4-hidroxibutiril-fosfato se puede convertir en 4-hidroxibutanal por 4-hidroxibutanal deshidrogenasa (fosforilación) (EC 1.2.1.d). 4-hidroxibutiril-CoA se puede convertir en 4-hidroxibutanal por 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (o 4-hidroxibutanal deshidrogenasa) (EC 1.2.1.B), como se ha descrito anteriormente. 4-hidroxibutiril-CoA se puede convertir en 1,4-butanodiol por 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol) (EC 1.1.1.c). 4-hidroxibutanal se puede convertir en 1 ,4-butanodiol por 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1.a), como se ha descrito anteriormente.

TABLA 16. Ruta BDO de .a)-cetoglutarato

Figura	Clasa EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de enzima	Nombre de gen	ID GenBank (si està disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
8B	4.1.1.a	alfa-cetoglutarato	succinic semialdehìdo	alfa-cetoglutarato descarboxilasa	*kgd*	050463.4	*Mycobacterium tuberculosis*	alfa-cetoglutarato
					gadA	NP_417974	*Escherichia coli*	glutamato
					gadB	NP_416010	*Escherichia coli*	glutamato
8B	1.4.1.a	alfa-cetoglutarato	glutamato	glutamato deshidrogenasa	*gdhA*	P00370	*Escherichia coli*	glutamato
					gdh	P96110.4	*Thermotoga maritima*	glutamato
					gdhAJ	NP_279651.1	*Halobacterium salinarum*	glutamato
8B	1.4.1.a	4-aminobutirato	succinic semialdehìdo	4-aminobutirato oxidoreductasa (deaminating)	*lysDH*	AB052732	*Geobacillus stearothermophilus*	lisina
					lysDH	NP_147035.1	*Aeropyrum pernix* K1	lisina
					ldh	POA393	*Bacillus cereus*	leucina, isoleucina, valina, 2-aminobutanoato

8B	2.6.1.a	4-aminobutirato	succinic semialdehìdo	4-aminobutirato transaminasa	*gabT*	P22256.1	*Escherichia coli*	4-aminobutirato
					puuE	NP_415818.1	*Escherichia coli*	4-aminobutirato
					UGAJ	NP_011533.1	*Saccharomyces cerevisiae*	4-aminobutirato
8B	4.1.1.a	glutamato	4-aminobutirato	glutamato descarboxilasa	*gadA*	NP_417974	*Escherichia coli*	glutamato
					gadB	NP_416010	*Escherichia coli*	glutamato
					kgd	050463.4	*Mycobacterium tuberculosis*	alfa-cetoglutarato
8B	1.1.1.a	succinato semialdehìdo	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutirato deshidrogenasa	*4hbd*	YP_726053.1	*Ralstonia eutropha H16*	4-hidroxibutirato
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	4-hidroxibutirato
					4hbd	Q94B07	*Arabidopsis thaliana*	4-hidroxibutirato
8B	2.8.3.a	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA transferasa	*catl, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*Clostridium kluyveri*	succinato, 4-hidroxibutirato, butirato
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Acidaminococcus fermentans*	glutarato
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*Escherichia coli*	butanoato

8B	3.1.2.a	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa	*tesB*	NP_414986	*Escherichia coli*	adipil-CoA
					acotl2	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*	butiril-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*	3-Hidroxipropano-il-CoA
8B	6.2.1.a	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA ligasa (o 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*Escherichia coli*	succinato
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	fenilacetato
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxihexanoato
8B	2.7.2.a	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutiril-fosfato	4-hidroxibutirato cinasa	*ackA*	NP_416799.1	*Escherichia coli*	acetato, propionato
					bukl	NP_349675	*Clostridium acetobutylicum*	butirato
					buk2	Q97II1	*Clostridium acetobutylicum*	butirato

2.3.1.a	4-hidroxibutiril-fosfato	4-hidroxibutiril-CoA	fosfotrans-4-hidroxibutirilasa	*ptb*	NP_349676	*Clostridium acetobutylicum*	butiril-fosfato
				ptb	AAR19757.1	*butyrate-producing bacterium L2-50*	butiril-fosfato
				ptb	CAC07932.1	*Bacillus megaterium*	butiril-fosfato
1.2.1.d	4-hidroxibutiril-fosfato	4-hidroxibutanal	4-hidroxibutanal deshidrogenasa (fosforilaciòn)	*asd*	NP_417891.1	*Escherichia coli*	L-4-aspartil-fosfato
				proA	NP_414778.1	*Escherichia coli*	L-glutamil-5-fosfato
				gapA	POA9B2.2	*Escherichia coli*	Gliceraldehido-3-fosfato
1.2.1.b	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutanal	4-hidroxibutiril-CoA reductasa (o 4-hidroxibutanal dehidrogenasa)	*sueD*	P38947.1	*Clostridium kluyveri*	succinil-CoA
				sueD	NP_904963.1	*Porphyromonas gingiva/is*	succinil-CoA
				Msed_0709	YP_001190808.1	*Metallosphaera sedula*	malonil-CoA
1.1.1.c	4-hidroxibutiril-CoA	1,4-butanodiol	4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*	butanoil-CoA
				mer	AAS20429.1	*Chloroflexus aurantiacus*	malonil-CoA
				FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*	Acilo de cadena larga-CoA

8B	1.1.1.a	4-hidroxibutanal	1,4-butanodiol	1,4-butanodiol deshidrogenasa	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharomyces cerevisiae*	general
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Succinato semialdehido

Ejemplo VII

Rutas BDO desde 4-aminobutirato

Este ejemplo describerutas de BDO ilustrativas de 4-aminobutirato.

La Figura 9A muestra rutas BDO ilustrativas en las cuales se convierte 4-aminobutirato a BDO. Las enzimas de tal ruta BDO ilustrativa se enumeran en la Tabla 17, junto con los genes que codifican estas enzimas ilustrativas.

En resumen, 4-aminobutirato se puede convertir en 4-aminobutiril-CoA por 4-aminobutirato CoA transferasa (EC 2.8.3. a), 4-aminobutiril-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.a), o 4-aminobutirato CoA-ligasa (o 4-aminobutiril-CoA sintetasa) (EC 6.2.1. a). 4-aminobutiril-CoA se puede convertir en 4-oxobutiril-CoA por 4-aminobutiril-CoA oxido-reductasa (desaminante) (EC 1.4.1.a) o 4-aminobutiril-CoA transaminasa (EC 2.6.1. a). 4-oxobutiril-CoA se puede convertir en 4-hidroxibutiril-CoA por 4-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa (EC 1.1.1. a). 4-hidroxibutiril-CoA se puede convertir en 1,4-butanodiol por 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol) (EC 1,1. Lc). Alternativamente, 4-hidroxibutiril-CoA se puede convertir en 4-hidroxibutanal por 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (o 4-hidroxibutanal deshidrogenasa) (EC 1.2.1.B). 4-hidroxibutanal se puede convertir en 1,4-butanodiol por 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1.a.).

TABLA 17. Ruta de BDO de 4-aminobutirato.

Figura	Clase EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de enzima	Nombre de gen	ID GenBank (si está disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
9A	2.8.3.a	4-aminobutirato	4-aminobutiril-CoA	4-aminobutirato CoA transferasa	*catI, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*Clostridium kluyveri*	succinato, 4-hidroxibutirato, butirato
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Acidaminococcus fermentans*	glutarato
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*Escherichia coli*	butanoato
9A	3.1.2.a	4-aminobutirato	4-aminobutiril-CoA	4-aminobutiril-CoA hidrolasa	*tesB*	NP_414986	*Escherichia coli*	adipulo-CoA
					acotl2	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*	butyryl-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*	3-hidroxipropanoil-CoA
9A	6.2.1.a	4-aminobutirato	4-aminobutiril-CoA	4-aminobutirato-CoA ligasa (or 4-aminobutiril-CoA sintetasa)	*sueCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*Escherichia coli*	succinato
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	fenilacetato
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxihexanoato

Tabla 17 continuación

9A	1.4.1.a	4-aminobutiril-CoA	4-oxobutiril-CoA	4-aminobutiril-CoA oxidoreductasa (deaminating)	*lysDH*	AB052732	*Geobacillus stearothermophilus*	lisina
					lysDH	NP_147035.1	*Aeropyrum pernix KI*	lisina
					ldh	POA393	*Bacillus cereus*	leucina, isoleucina, valina, 2-aminobutanoato
9A	2.6.1.a	4-aminobutiril-CoA	4-oxobutiril-CoA	4-aminobutiril-CoA transaminasa	*gabT*	P22256.1	*Escherichia coli*	4-aminobutirilato
					abat	P50554.3	*Rattus norvegicus*	3-amino-2-metilpropionato
					SkyPYD4	ABF58893.1	*Saccharomyces kluyveri*	beta-alanina
9A	1.1.1.a	4-oxobutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevzswe*	general
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Succinato semialdehido

Tabla 17 continuación

8	1.1.1.c	4-hidroxibutiril-CoA	1,4-butanodiol	4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*	butanoil-CoA
					mer	AAS20429.1	*Chloroflexus aurantiacus*	malonil-CoA
					FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*	Acilo de cadena Larga CoA
8	1.2.1.b	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutanal	4-hidroxibutiril-CoA reductasa (o 4-hidroxibutanal deshidrogenasa)	*sueD*	P38947.1	*Clostridium kluyveri*	Succinil-CoA
					sueD	NP_904963.1	*Porphyromonas gingiva/is*	Succinil-CoA
					Msed_0709	yp_001190808.1	*Metallosphaera sedula*	Malonil-CoA
8	1.1.1.a	4-hidroxibutanal	1,4-butanediol	1,4-butanodiol deshidrogenasa	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevzswe*	general
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Succinato semialdehido

Las enzimas para otra ruta BDO ilustrativa que convierte 4-aminobutirato de BDO se muestra en la Figura 9A. Las enzimas de la ruta BDO ilustrativa se enumeran en la Tabla 18, junto con los genes que codifican estas enzimas ilustrativas.

En resumen, se puede convertir 4-aminobutirato en 4-aminobutiril-CoA por 4-aminobutirato CoA transferasa (EC 2.8.3.a), 4-aminobutiril-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.a) o 4-aminobutirato-CoA ligasa (o 4-aminobutiril-CoA sintetasa) (EC 6.2.1.a). 4-aminobutiril-CoA se puede convertir en 4-aminobutan-1-ol por 4-aminobutiril-CoA reductasa (formador de alcohol) (EC 1,1.1.c).

Alternativamente, 4-aminobutiril-CoA se puede convertir en 4-aminobutanal por 4-aminobutiril-CoA reductasa (o 4-aminobutanal deshidrogenasa) (EC 1.2.1.b.), y 4-aminobutanal se convierte en 4-aminobutan-1-ol por 4 -aminobutan-1-ol-deshidrogenasa (EC 1.1.1. a). 4-aminobutan-1-ol puede convertirse en 4-hidroxibutanal por oxidorreductasa 4-aminobutan-1-ol (desaminante) (EC 1.4.1.a) o 4-aminobutan-1-ol transaminasa (EC 2.6.1.a.). 4-hidroxibutanal se puede convertir en 1,4-butanodiol por 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1. a).

TABLA 18. Ruta de BDO de 4-aminobutirato.

Figura	Clase EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de enzima	Nombre de gen	ID GenBank (si está disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
9A	2.8.3.a	4-aminobutirato	4-aminobutiril-CoA	4-aminobutirato CoA transferasa	*catI, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*Clostridium kluyveri*	succinato, 4-hidroxibutirato, butirato
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Acidaminococcus fermentans*	glutarato
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*Escherichia coli*	butanoato
9A	3.1.2.a	4-aminobutirato	4-aminobutiril-CoA	4-aminobutiril-CoA hidrolasa	*tesB*	NP_414986	*Escherichia coli*	adipil-CoA
					acotl2	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*	butiril-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*	3-hidroxipropanoil-CoA
9A	6.2.1.a	4-aminobutirato	4-aminobutiril-CoA	4-aminobutirato-CoA ligasa (o 4-aminobutiril-CoA sintetasa)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*Escherichia coli*	succinato
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	fenilacetato
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxihexanoato

Tabla 18 continuación

9A	1.1.1.c	4-aminobutiril-CoA	4-aminobutan-1-ol	4-aminobutiril-CoA reductasa (formador de alcohol)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*	butanoil-CoA
					mer	AAS20429.1	*Chloroflexus aurantiacus*	malonil-CoA
					FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*	Acilo de cadena larga -CoA
9A	1.2.1.b	4-aminobutiril-CoA	4-aminobutanal	4-aminobutiril-CoA reductasa (o 4-aminobutanal deshidrogenasa)	*sueD*	P38947.1	*Clostridium kluyveri*	Succinil-CoA
					sueD	NP_904963.1	*Porphyromonas gingivalis*	Succinil-CoA
					Msed_0709	yp_001190808.1	*Metallosphaera sedula*	Malonil-CoA
9A	1.1.1.a	4-aminobutanal	4-aminobutan-1-ol	4-aminobutan-1-ol deshidrogenasa	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	general
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Succinato semialdehido

Tabla 18 continuación

9A	1.1.1.c	4-hidroxibutiril-CoA	1,4-butanodiol	4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*	butanoil-CoA
					mer	AAS20429.1	*Chloroflexus aurantiacus*	malonil-CoA
					FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*	Acilo de cadena Larga CoA
9A	1.2.1.b	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutanal	4-hidroxibutiril-CoA reductasa (or 4-hidroxibutanal deshidrogenasa)	*sueD*	P38947.1	*Clostridium kluyveri*	Succinil-CoA
					sueD	NP_904963.1	*Porphyromonas gingiva/is*	Succinil-CoA
					Msed_0709	yp_001190808.1	*Metallosphaera sedula*	Malonil-CoA
9A	1.1.1.a	4-hidroxibutanal	1,4-butanediol	1,4-butanodiol deshidrogenasa	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevzswe*	general
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Succinato semialdehido

La Figura 9B muestra la ruta BDO ilustrativa en el que 4-aminobutirato se convierte en BDO. Las enzimas de tal ruta de BDO ilustrativa se enumeran en la Tabla 19, junto con los genes que codifican estas enzimas ilustrativas.

En resumen, 4-aminobutirato se puede convertir a [(4-aminobutanolil) oxi] fosfónico por 4-aminobutirato quinasa (EC 2.7.2.a). [(4-aminobutanolil) oxi] fosfónico puede ser convertido a 4-aminobutanal por 4-aminobutiraldehído deshidrogenasa (fosforilación) (EC 1.2. 1.a). 4-aminobutanal se puede convertir en 4-aminobutan-1-ol por 4-aminobutan-1-ol-deshidrogenasa (EC 1.1.1. a). 4-aminobutan-1-ol puede convertirse en 4-hidroxibutanal por oxidorreductasa 4-aminobutan-1-ol (desaminante) (EC 1.4.1.a) o 4-aminobutan-1-ol transaminasa (EC 2.6.1.a). Alternativamente, [(4-aminobutanolil) oxi] fosfónico se puede convertir a [(4-oxobutanolil) oxi] fosfónico por [(4-aminobutanolyl) oxi] fosfónico oxidorreductasa (desaminante) (EC 1.4.1.a) o [(4-aminobutanolil) oxi] fosfónico transaminasa (EC 2.6.1. a). [(4-oxobutanolil) oxi] fosfónico puede ser convertido a 4-hidroxibutiril-fosfato deshidrogenasa por 4-hidroxibutiril-fosfato (EC 1.1.1. a). 4-hidroxibutiril-fosfato se puede convertir en 4-hidroxibutanal por 4-hidroxibutiraldehído deshidrogenasa (fosforilación) (EC 1,2. LD). 4-hidroxibutanal se puede convertir en 1,4-butanodiol por 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1. a).

TABLA 19. Ruta de BDO de 4-aminobutirato.

Figura	Clase EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de enzima	Nombre de gen	ID GenBank (si está disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
9B	2.7.2.a	4-aminobutirato	Acido [(4-aminobutanoiloxi] fosfónico	4-aminobutirato cinasa	*ackA*	NP_416799.1	*Escherichia coli*	Acetate, propionato
					bukl	NP_349675 1	*Clostridium acetobutylicum*	butirato
					proB	NP 414777.1	*Escherichia coli*	glutamato
9B	1.2.1.d	Acido [(4-aminobutanoiloxi] fosfónico	4-aminobutiril-CoA	4-aminobutirilaldehido deshidrogenasa (fosforilación)	*asd*	NP_417891.1	*Escherichia coli*	L-4-aspartil fosfato
					pro A	NP_414778.1	*Escherichia coli*	L-glutamil-5-fosfato
					gap A	POA9B2.2	*Escherichia coli*	Giceraldehido--3-fosfato
9B	l.l.l.a	4-aminobutanal	4-aminobutan-1-ol	4-aminobutan-1-ol	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	general
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Succinato semialdehido

Tabla 19 (continuación)

9B	1.4.1.a	4-aminobutan-1-ol	**4-** hidroxibutanal	4-aminobutan-1-ol oxidoreductasa (desaminación)	*lysDH*	AB052732	*Geobacillus stearothermophilus*	lisina
					lysDH	NP_147035.1	*Aeropyrum pernix* ***KI***	lisina
					ldh	POA393	*Bacillus cereus*	leucina, isoleucina, valina, 2-aminobutanoato
9B	2.6.1.a	4-aminobutan-1-ol	**4-** hidroxibutanal	4-aminobutan-1-ol transaminasa	*gabT*	P22256.1	*Escherichia coli*	4-aminobutiriato
					abat	P50554.3	*Rattus norvegicus*	3-amino-2-metilpropionato
					SkyPYD4	ABF58893.1	*Saccharomyces kluyveri*	beta-alanina
9B	1.4.1.a	Ácido [(4-aminobutanolil)oxi] fosfonico	Acido [(4-oxobutanolil) oxi] fosfónico	Ácido [(4-aminobutanolil)oxi]fosfonico oxidoreductasa (desaminación)	*lysDH*	AB052732	*Geobacillus stearothermophilus*	lisina
					lysDH	NP_147035.1	*Aeropyrum pernix* ***KI***	lisina
					ldh	POA393	*Bacillus cereus*	leucina, isoleucina, valina, 2-aminobutanoato

Tabla 19 continuación

9B	2.6.1.a	Ácido [(4-aminobutanolil)oxi] fosfonico	Acido [(4-oxobutanolil) oxi] fosfónico	Acido [(4-aminobutanolil)oxi]fosfonico transaminasa	*gabT*	P22256.1	*Escherichia coli*	4-aminobutirato
					SkyPYD4	ABF58893.1	*Saccharomyces kluyveri*	beta-alanine
					sere	NP_415427.1	*Escherichia coli*	fosfoserina, fosfohidroxitreonina
9B	1.1.1.a	Ácido [(4-aminobutanolil)oxi] fosfonico	4-Hidroxibutiril-fosfato	4-hidroxibutiril-fosfato deshidrogenasa	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevzszae*	general
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Succinato semialdehido
9B	1.2.1.d	4-hidroxibutiril-fosfato	4-hidroxibutanal	4-Hidroxibutiral-dehído deshidrogenasa (fosforilación)	*asd*	NP_417891.1	*Escherichia coli*	L-4-aspartil-fosfato
					proA	NP_414778.1	*Escherichia coli*	L-glutamil-5-fosfato
					gapA	POA9B2.2	*Escherichia coli*	Gliceraldehido-3-fosfato

Tabla 19 continuación

9B	1.1.1.a	4-hidroxibutanal	1,4-butanodiol	1,4-butanodiol	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevzszae*	general
					yqh D	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hb d	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Succinato semialdehido

La Figura 9C muestra una ruta ilustrativa a través de acetoacetato.

Ejemplo VIII

Ejemplos de Caminos de BDO de Alfa-cetoglutarato

Este ejemplo describe las rutas de BDO ilustrativas de alfa-cetoglutarato.

La Figura 10 muestra ejemplos de rutas de BDO en el que el alfa-cetoglutarato es convertido a BDO. Las enzimas de tal ruta de BDO ilustrativa se enumeran en la Tabla 20, junto con los genes que codifican estas enzimas ilustrativas.

En resumen, alfa-cetoglutarato se puede convertir en alfa-cetoglutaril-fosfato por alfa-cetoglutarato 5-quinasa (EC 2.7.2.a). El alfa-cetoglutaril-fosfato se puede convertir a ácido 2,5-dioxopentanoico por la deshidrogenasa semialdehído 2,5-dioxopentanoico (fosforilación) (EC 1.2.1.d). El ácido 2,5-dioxopentanoico se puede convertir en 5-hidroxi-2-oxopentanoico por dioxopentanoic ácido 2,5-reductasa (EC 1.1.1. a). Alternativamente, el alfa-cetoglutarato se puede convertir en alfa-cetoglutaril-CoA por alfa-cetoglutarato CoA transferasa (EC 2.8.3. a), alfa-cetoglutaril-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.a) o alfa-ligasa cetoglutaril-CoA (o alfa-cetoglutaril-CoA sintetasa) (EC 6.2.1. a). El Alfa-cetoglutaril-CoA se puede convertir en ácido 2,5-dioxopentanoic por alfa-cetoglutaril-CoA reductasa

(o ácido 2,5-dioxopentanoico deshidrogenasa) (EC 1.2.1.b). El ácido 2,5-dioxopentanoiclo se puede convertir en 5-hidroxi-2-oxopentanoico por ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa. Alternativamente, la alfa-cetoglutaril-CoA se puede convertir en 5-hidroxi-2-oxopentanoico por alfa-cetoglutaril-CoA reductasa (formador de alcohol) (EC lllc). El ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico se puede convertir en 4-hidroxibutanal por descarboxilasa del ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico (EC 4.1.1. a). El 4-hidroxibutanal se puede convertir en 1,4-butanodiol por 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1. a). El ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico se puede convertir en 4-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa por ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico (descarboxilación) (EC 1.2.1.c).

TABLE 20. Ruta de BDO de alfa-cetoglutarato.

Figura	Clase EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de enzima	Nombre de gen	ID GenBank (si está disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
10	2.7.2.a	alfa-cetoglutarato	alfa-cetoglutari-fosfato	alfa-cetoglutarato 5-cinasa	*ackA*	NP_416799.1	*Escherichia coli*	acetate, propionato
					bukl	NP_349675	*Clostridium acetobutylicum*	butirato
					proB	NP_414777.1	*Escherichia coli*	glutamato
10	1.2.1.d	alfa-cetoglutaril-fosfato	ácido 2,5-dioxopentano-ico	semialdehído 2,5-Dioxopentano-ico deshidrogenasa (fosforilación)	*proA*	NP_414778.1	*Escherichia coli*	L-glutamil-5-fospato
					asd	NP_417891.1	*Escherichia coli*	L-4-aspartil-fosfato
					gapA	POA9B2.2	*Escherichia coli*	Gliceraldehido-3-fosfato
10	1.1.1.a	ácido 2,5-dioxopentano-ico	ácido 5-hidroxi-2-oxopentano-ico	ácido 2,5-dioxopentano-ico reductasa	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	general
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Succinato semialdehído

Tabla 20 continuación

10	2.8.3.a	alfa-cetoglutarato	alfa-cetoglutaril-CoA	alfa-cetoglutarato CoA transferasa	*catl, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*Clostridium kluyveri*	succinato, 4-hidroxibutirato, butirato
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Ácidoaminococcus fermentans*	glutarato
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*Escherichia coli*	butanoato
10	3.1.2.a	alfa-cetoglutarato	alfa-cetoglutaril-CoA	alfa-cetoglutaril-CoA hidrolasa	*tesB*	NP_414986	*Escherichia coli*	adipil-CoA
					acotl2	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*	butiril-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*	3-hidroxipropanoil-CoA
10	6.2.1.a	alfa-cetoglutarato	alfa-cetoglutaril-CoA	alfa-cetoglutaril-CoA ligasa (o alfa-cetoglutaril-CoA sintetasa)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*Escherichia coli*	succinato
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	fenilacetato
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxihexanoato

Tabla 20 continuación

10	1.2.1.b	alfa-cetoglutaril-CoA	ácido 2,5-dioxopenta-noico	alfa-cetoglutaril-CoA reductasa (or 2,5-dioxopentanoico o ácido deshidrogenasa)	*sueD*	P38947.1	*Clostridium kluyveri*	Succinil-CoA
					Msed_0709	yp_001190808.1	*Metallosphaera sedula*	Malonil-CoA
					bphG	BAA03892.1	*Pseudomonas sp*	Acetaldehido, Propionaldehido, Butiraldehido, Isobutiraldehido y Formaldehido
10	1.1.1.a	ácido 2,5-dioxopentano-ico	ácido 5-hidroxi-2-Oxopentano-ico	5-hidroxi-2-oxopentanoico o ácido deshidrogenasa	*ADH2* *yqhD* *4hbd*	NP_014032.1 NP_417484.1 L21902.1	*Saccharymyces cerevisiae* *Escherichia coli* *Clostridium kluyveri DSM 555*	general >C3 Succinato semialdehído
10	1.1.1.c	alfa-cetoglutaril-CoA	5-hidroxi-2-oxopentano-ico ácido	alfa-cetoglutaril-CoA reductasa (formador de alcohol)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*	butanoil-CoA
					mer	AAS20429.1	*Chloroflexus aurantiacus*	malonil-CoA
					FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*	Acilo de cadena larga-CoA

Tabla 20 (continuación)

10	4.1.1.a	ácido 5-hidroxi-2-oxopentano-ico	4-hidroxibutanal	ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa	*pdc*	P06672.1	*Zymomonas mobilus*	ácido 2-oxopentanoico
					mdlC	P20906.2	*Pseudomonas putida*	ácido 2-oxopentanoico
					pdcl	P06169	*Saccharomyces cerevisiae*	piruvato
10	1.1.1.a	4-hidroxibutanal	1,4-butanodiol	1,4-butanodiol deshidrogenasa	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	general
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Succinato semialdehído
10	1.2.1.c	ácido 5-hidroxi-oxopentanoico	4-hidroxibutiril -CoA	ácido 5-hidroxi-oxopentanoico deshidrogenasa (decarboxilación)	*sucA, sucB, lpd*	NP_415254.1, NP_415255.1, NP_414658.1	*Escherichia coli*	Alfa-cetoglutarato
					bfmBB, bfmBAA, bfmBAB, bfmBAB, pdhD	NP_390283.1, NP_390285.1, NP_390284.1, P21880.1	*Bacillus subtilis*	2-ceto ácidos derivados de valina, leucina e isoleucina
					Bckdha, Bckdhb, Dbt, Dld	NP_036914.1, NP_062140.1, NP_445764.1, NP_955417.1	*Rattus norvegicus*	2-ceto ácidos derivados de valina, leucina e isoleucina

Ejemplo IX

Rutas de BDO Ilustrativas de glutamato

Este ejemplo describe rutas de BDO ilustrativas de glutamato.

La Figura 11 muestra ejemplos de rutas de BDO en el que el glutamato es convertido a BDO. Las enzimas de tal ruta de BDO ilustrativa se enumeran en la Tabla 21, junto con los genes que codifican estas enzimas ilustrativas.

En resumen, el glutamato se puede convertir en glutamil-CoA por glutamato CoA transferasa (EC 2.8.3. a), glutamil-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.a) o glutamil-CoA ligasa (o glutamil-CoA sintetasa) (EC 6,2 .1. a). Alternativamente, el glutamato puede ser convertido a glutamato-5-fosfato por glutamato 5-quinasa (EC 2.7.2. a). El glutamato-5-fosfato pueden ser convertidos a glutamato-5-semialdehído por el glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa (fosforilación) (EC 1,2. LD). El glutamil-CoA se puede convertir a glutamato-5-semialdehído por glutamil-CoA reductasa (o glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa) (EC 1.2.1.B). El glutamato-5-semialdehído se puede convertir en ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico ácido por el glutamato-5-semialdehído reductasa (EC 1.1.1. a). Alternativamente, glutamil-CoA se puede convertir en ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico por glutamil-CoA reductasa (formador de alcohol) (EC lllc). Ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico se puede convertir en ácido 5-

hidroxi-2-oxopentanoico por ácido oxido-reductasa de 2-amino-5-hidroxipentanoico (desaminante) (EC 1.4.1.a) o ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico transaminasa (EC 2.6.1. a). Ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico se puede convertir en 4-hidroxibutanal por descarboxilasa del ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico (EC 4.1.1. a). 4-hidroxibutanal se puede convertir en 1 ,4-butanodiol por 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1. a). Alternativamente, el ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico se puede convertir en 4-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa por ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico (descarboxilación) (EC 1.2.1.c).

TABLA 21. Ruta de BDO de glutamato

Figura	Clasa EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de enzima	Nombre de gen	ID GenBank (si está disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
11	2.8.3.a	glutamato	glutamil-CoA	glutamato CoA transferasa	*catI, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*Clostridium kluyveri*	succinato, 4-hidroxibutirato, butirato
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Acidaminococcus fermentans*	glutarato
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*Escherichia coli*	butanoato
11	3.1.2.a	glutamato	glutamil-CoA	glutamil-CoA hidrolasa	*tesB*	NP_414986	*Escherichia coli*	adipil-CoA
					acotl2 *hibch*	NP_570103.1 Q6NVY1.2	*Rattus norvegicus* *Homo sapiens*	butyril-CoA 3-hidroxipropanoil-CoA
11	6.2.1.a	glutamato	glutamil-CoA	glutamil-CoA ligasa (o glutamil-CoA sintetasa)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*Escherichia coli*	succinato
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	fenilacetato
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxihexanoato
11	2.7.2.a	glutamato	glutamato-5-fosfato	glutamato 5-cinasa	*ackA*	NP_416799.1	*Escherichia coli*	acetato, propionato
					bukl	NP_349675	*Clostridium acetobutylicum*	butirato
					proB	NP_414777.1	*Escherichia coli*	glutamato

Tabla 21 continuación

11	1.2.1.d	glutamato-5-fosfato	glutamato-5-semialdehído	glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa (fosforilación)	*proA*	NP_414778.1	*Escherichia coli*	L-glutamil-5-fosfato
					asd	NP_417891.1	*Escherichia coli*	L-4-aspartil-fosfato
					gapA	POA9B2.2	*Escherichia coli*	Gliceraldehido-3-fosfato
11	1.2.1.b	glutamil-CoA	glutamato-5-semialdehído	glutamil-CoA reductasa (o glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa)	*sueD*	P38947.1	*Clostridium kluyveri*	Succinil-CoA
					Msed_0709	yp_001190808.1	*Metallosphaera sedula*	Malonil-CoA
					bphG	BAA03892.1	*Pseudomonas sp*	Acetaldehido, Propionaldehido, Butiraldehido, Isobutiraldehido y Formaldehido
11	1.1.1.a	glutamato-5-semialdehído	Ácido 2-amino-5-Hidroxipenta-noico	glutamato-5-semialdehído reductasa	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevzswe*	general
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Succinato semialdehído

Tabla 21 continuación

11	1.1.1.c	glutamil-CoA	Ácido 2-amino-5-Hidroxipenta-noico	glutamil-CoA reductasa (formación de alcohol)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*	butanoil-CoA
					mer	AAS20429.1	*Chloroflexus aurantiacus*	malonil-CoA
					FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*	Acilo de cadena larga-CoA
11	1.4.1.a	Ácido 2-amino-5-hidroxipenta-noico	5-hidroxi-2-oxopentanoic acid	Ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico oxidoreductasa (desaminación)	*gdhA*	P00370	*Escherichia coli*	glutamato
					ldh	POA393	*Bacillus cereus*	leucina, isoleucina, valina, 2-aminobutanoato
					nadX	NP_229443.1	*Thermotoga maritima*	aspartato
11	2.6.1.a	Ácido 2-amino-5-hidroxipenta noico	Ácido 5-hidroxi-2-oxopentano-ico	Ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico transaminasa	*aspC*	NP_415448.1	*Escherichia coli*	aspartato
					AAT2	P23542.3	*Saccharomyces cerevzswe*	aspartato
					avtA	yp_026231.1	*Escherichia coli*	valina, alfa-aminobutirato

Tabla 21 continuación

11	4.1.1.a	Ácido 5-hidroxi-2-oxo-pentanoico	4-hidroxibutanal	Ácido 5-hidroxi-2- oxopentanoico descarboxilasa	*pdc*	P06672.1	*Zymomonas mobilus*	Ácido 2-oxopentanoico
					mdlC	P20906.2	*Pseudomonas putida*	Ácido 2-oxopentanoico
					pdcl	P06169	*Saccharomyces cerevisiae*	piruvato
11	1.1.1.a	4-hidroxibutanal	1,4-butanodiol	1,4-butanediol deshidrogenasa	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	general
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	Succinato semialdehído
11	1.2.1.c	Acido 5-oxopentanoico	4-hidroxibutiril -CoA	Ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación)	*sucA, sucB, lpd*	NP_415254.1, NP_415255.1, NP_414658.1	*Escherichia coli*	Alfa-cetoglutarato
					bfmBB, bfmBAA, bfmBAB, bfmBAB, pdhD	NP_390283.1, NP_390285.1, NP_390284.1, P21880.1	*Bacillus subtilis*	2-ceto acidos derivados de valina, leucina e isoleucina
					Bckdha, Bckdhb, Dbt, Dld	NP_036914.1, NP_062140.1, NP_445764.1, NP_955417.1	*Rattus norvegicus*	2-ceto acidos derivados de valina, leucina e isoleucina

Ejemplo X

BDO Ilustrativo de Acetoacetil-CoA

En este ejemplo se describe una ruta de BDO ilustrativa de acetoacetil-CoA.

La Figura 12 muestra ejemplos de rutas de BDO en el que acetoacetil-CoA se convierte en BDO. Las enzimas de tal ejemplar ruta BDO se enumeran en la Tabla 22, junto con los genes que codifican estas enzimas ilustrativas.

En resumen, acetoacetil-CoA se puede convertir en 3-hidroxibutiril-CoA por 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa (EC 1.1.1.a). 3-hidroxibutiril-CoA se puede convertir en crotonoilo-CoA por 3-hidroxibutiril-CoA deshidratasa (EC 4.2.1. a). Crotonoilo-CoA se puede convertir en vinilacetil-CoA por vinilacetil-CoA △-isomerasa (EC 5.3.3.3). Vinilacetil-CoA se puede convertir en 4-hidroxibutiril-CoA por 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa (EC 4.2.1.a). 4-hidroxibutiril-CoA se puede convertir en 1,4-butanodiol por 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol) (EC 1,1. 1.c). Alternativamente, 4-hidroxibutiril-CoA se puede convertir en 4-hidroxibutanal por 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (o 4-hidroxibutanal deshidrogenasa) (EC 1.2.1.b). 4-hidroxibutanal se puede convertir en 1,4-butanodiol por 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1.a).

TABLA 22. Ruta BDO de acetoacetil-CoA

Figura	Clase EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de enzima	Nombre de gen	ID GenBank (si está disponible)	Organismo	Sustrato conocido
12	1.1.1.a	acetoacetil-CoA	3-hidroxibutiril-CoA	3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa	*hbd*	NP_349314.1	*Clostridium acetobutylicum*	3-hidroxibutiril-CoA
					hbd	AAM14586.1	*Clostridium beijerinckii*	3-hidroxibutiril-CoA
					Msed_1423	YP_001191505	*Metallosphaera sedula*	3-hidroxibutiril-CoA presupuesto
12	4.2.1.a	3-hidroxibutiril-CoA	crotonil-CoA	3-hidroxibutiril-CoA deshidratasa	*crt*	NP_349318.1	*Clostridium acetobutylicum*	3-hidroxibutiril-CoA
					maoC	NP_415905.1	*Escherichia coli*	3-hidroxibutiril-CoA
					paaF	NP_415911.1	*Escherichia coli*	3-hidroxiadipil-CoA
12	5.3.3.3	crotonil-CoA	vinilacetil-CoA	vinilacetil-CoA Δ-isomerasa	*abfD*	YP_001396399.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	4-hidroxibutiril-CoA
					abfD	P55792	*Clostridium aminobutyricum*	4-hidroxibutiril-CoA
					abfD	YP_001928843	*Porphyromonas gingivalis ATCC 33277*	4-hidroxibutiril-CoA
12	4.2.1.a	vinilacetil-CoA	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa	*abfD*	YP_001396399.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	4-hidroxibutiril-CoA

TABLA 22 continua

					abfD	P55792	*Clostridium aminobutyricum*	4-hidroxibutiril-CoA
					abfD	YP_001928843	*Porphyromonas gingivalis ATCC 33277*	4-hidroxibutiril-CoA
12	1.1.1.c	4-hidroxibutiril-CoA	1,4-butanodiol	4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*	butanoil-CoA
					mcr	AAS20429.1	*Chloroflexus aurantiacus*	malonil-CoA
					FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*	acilo de cadena larga-CoA
12	1.2.1.b	4-hidroxibutiril-CoA	1,4-hidroxibutano-diol	4-hidroxibutiril-CoA reductasa (o 4-hidroxibutanal deshidrogenasa)	*sucD*	P38947.1	*Clostridium kluyveri*	Succinil-CoA
					sucD	NP_904963.1	*Porphyromonas gingivalis*	Succinil-CoA
					Msed_0709	YP_001190808.1	*Metallosphaera sedula*	malonil-CoA
12	1.1.1.a	4-hidroxibutanal	1,4-butanodiol	1,4-butanodiol deshidrogenasa	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	general
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	succinato semialdehído

Ejemplo XI

Ruta de BDO ilustrativa de homoserina

Este ejemplo describe una ruta de BDO ilustrativa de homoserina.

La Figura 13 muestra rutas de BDO ilustrativas en el que se convierte a homoserina BDO.

Las enzimas de tal ruta de BDO ilustrativas se enumeran en la Tabla 23, junto con los genes que codifican estas enzimas ilustrativas.

En resumen, la homoserina se puede convertir en 4-hidroxibut-2-enoato por desaminasa homoserina (EC 4.3.1. a). Alternativamente, la homoserina se puede convertir en homoserina-CoA por homoserina CoA transferasa (EC 2.8.3. a), homoserina-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.a) o homoserina-CoA ligasa (o homoserina-CoA sintetasa) (EC 6,2 .1. a). La homoserina-CoA se puede convertir en 4-hidroxibut-2-enoil-CoA por homoserina-CoA-desaminasa (EC 4.3.1. a). 4-hidroxibut-2-enoato se puede convertir en 4-hidroxibut-2-enoil-CoA por 4-hidroxibut-2-enoil-CoA transferasa (EC 2.8.3. a), 4-hidroxibut-2-enoil-CoA hidrolasa (EC 3.1.2. a), o 4-hidroxibut-2-enoil CoA-ligasa (o 4-hidroxibut-2-enoil-CoA sintetasa) (EC 6.2.1. a). Alternativamente, 4-hidroxibut-2-enoato se puede convertir en 4-hidroxibutirato por 4-hidroxibut-2-enoato reductasa (EC 1.3.1. a). 4-hidroxibutirato se puede convertir en 4-hidroxibutiril-CoA

por transferasa 4-hidroxibutiril-CoA (EC 2.8.3. a), 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.a), o 4-hidroxibutiril-CoA ligasa (o 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa) (EC 6.2.1. a). 4-hidroxibut-2-enoil-CoA se puede convertir en 4-hidroxibutiril-CoA por 4-hidroxibut-2-enoil-CoA reductasa (EC 1.3.1. a). 4-hidroxibutiril-CoA se puede convertir en 1,4-butanodiol por 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol) (EC lllc). Alternativamente, 4-hidroxibutiril-CoA se puede convertir en 4-hidroxibutanal por 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (o 4-hidroxibutanal deshidrogenasa) (EC 1.2.1.B). 4-hidroxibutanal se puede convertir en 1,4-butanodiol por 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1. a).

TABLA 22. Ruta BDO de homoserina

Figura	Clase EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de enzima	Nombre de gen	ID GenBank (si está disponible)	Organismo	Sustrato conocido
13	4.3.1.a	homoserina	4-hidroxibut-2-enoato	homoserina desaminasa	*aspA*	NP_418562	*Escherichia coli*	aspartato
					aspA	P44324.1	*Haemophilus influenzae*	aspartato
					aspA	P07346	*Pseudomonas fluorescens*	aspartato
13	2.8.3.a	homoserina	homoserina-CoA	homoserina-CoA transferasa	*cat1, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*Clostridium kluyveri*	succinato, 4-hidroxibutirato, butirato
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Acidaminococcus fermentans*	glutarato
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*Escherichia coli*	butanoato
13	3.1.2.a	homoserina	homoserina-CoA	homoserina-CoA hidrolasa	*tesB*	NP_414986	*Escherichia coli*	adipil-CoA
					acot12	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*	butiril-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*	3-hidroxipropanoil-CoA

TABLA 23 continua

13	6.2.1.a	homoserina	homoserina-CoA	homoserina-CoA ligasa (o homoserina-CoA sintetasa)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*Escherichia coli*	succinato
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	fenilacetato
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxihexanoato
13	4.3.1.a	homoserina-CoA	4-hidroxibut-2-enoil-CoA	homoserina-CoA desaminasa	*acl1*	CAG29274.1	*Clostridium propionicum*	beta-alanil-CoA
					acl2	CAG29275.1	*Clostridium propionicum*	beta-alanil-CoA
					MXAN_4385	YP_632558.1	*Myxococcus xanthus*	beta-alanil-CoA
13	2.8.3.a	4-hidroxibut-2-enoato	4-hidroxibut-2-enoil-CoA	4-hidroxibut-2-enoil-CoA transferasa	*cat1, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*Clostridium kluyveri*	succinato, 4-hidroxibutirato, butirato
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Acidaminococcus fermentans*	glutarato
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*Escherichia coli*	butanoato

TABLA 23 continua

13	3.1.2.a	4-hidroxibut-2-enoato	4-hidroxibut-2-enoil-CoA	4-hidroxibut-2-enoil-CoA hidrolasa	*tesB*	NP_414986	*Escherichia coli*	adipil-CoA
					acot12	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*	butiril-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*	3-hidroxipropanoil-CoA
13	6.2.1.a	4-hidroxibut-2-enoato	4-hidroxibut-2-enoil-CoA	4-hidroxibut-2-enoil-CoA ligasa (o 4-hidroxibut-2-enoil-CoA sintetasa)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*Escherichia coli*	succinato
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	fenilacetato
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxihexanoato
13	1.3.1.a	4-hidroxibut-2-enoato	4-hidroxibutirato	4-hidroxibut-2-enoato reductasa	*enr*	CAA71086.1	*Clostridium tyrobutyricum*	
					enr	CAA76083.1	*Clostridium kluyveri*	
					enr	YP_430895.1	*Moorella thermoacetica*	

TABLA 23 continua

13	2.8.3.a	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA transferasa	*cat1, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*Clostridium kluyveri*	succinato, 4-hidroxibutirato, butirato
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*Acidaminococcus fermentans*	glutarato
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*Escherichia coli*	butanoato
13	3.1.2.a	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa	*tesB*	NP_414986	*Escherichia coli*	adipil-CoA
					acot12	NP_570103.1	*Rattus norvegicus*	butiril-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	*Homo sapiens*	3-hidroxipropanoil-CoA
13	6.2.1.a	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA ligasa (o 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*Escherichia coli*	succinato
					phl	CAJ15517.1	*Penicillium chrysogenum*	fenilacetato
					bioW	NP_390902.2	*Bacillus subtilis*	6-carboxihexanoato

TABLA 23 continua

13	1.3.1.a	4-hidroxibut-2-enoil-CoA	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibut-2-enoil-CoA reductasa	*bcd, etfA, etfB*	NP_349317.1, NP_349315.1, NP_349316.1	*Clostridium acetobutylicum*	
					TER	Q5EU90.1	*Euglena gracilis*	
					TDE0597	NP_971211.1	*Treponema denticola*	
8	1.1.1.c	4-hidroxibut-2-enoil-CoA	1,4-butanodiol	4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formador de alcohol)	*adhE2*	AAK09379.1	*Clostridium acetobutylicum*	butanoil-CoA
					mcr	AAS20429.1	*Chloroflexus aurantiacus*	malonil-CoA
					FAR	AAD38039.1	*Simmondsia chinensis*	acilo de cadena larga-CoA
8	1.2.1.b	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutanal	4-hidroxibutiril-CoA reductasa (o 4-hidroxibutanal deshidrogenasa)	*sucD*	P38947.1	*Clostridium kluyveri*	succinil-CoA
					sucD	NP_904963.1	*Porphyromonas gingivalis*	succinil-CoA
					Msed_0709	YP_001190808.1	*Metallosphaera sedula*	malonil-CoA
8	1.1.1.a	4-hidroxibutanal	1,4-butanodiol	1,4-butanodiol deshidrogenasa	*ADH2*	NP_014032.1	*Saccharymyces cerevisiae*	general
					yqhD	NP_417484.1	*Escherichia coli*	>C3
					4hbd	L21902.1	*Clostridium kluyveri DSM 555*	succinato semialdehído

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 20~~12~~ 2012

Signature M Howard

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy de de
personalmente compareció ante mí,

a quien conozco, y de quien me consta que firmó el anterior documento, debidamente juramentado declaró y dijo que él (ella) es

de, **GENOMATICA, INC.**

Sociedad legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y representación de la expresada compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del objeto social de la sociedad.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las pruebas de la existencia de la sociedad.

Estado de
con fecha

y que quien confiere el presente poder es su representante.

Notario Público (sello)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 5th day of July of 2012 personally appeared before me,
Mary Susan Howard
to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument who being by me duly sworn did depose and say that he (she) is the
Vice President, Intelectual Property
of, **GENOMATICA, INC.**

Which is legally constituted for a term not yet expired, that deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney: that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purpose of company.

The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existence of the company.

State of Delaware
under date of 7/07

and that he (she) who grants the present power of attorney is its Representative.

DAWN COUGHLIN
Commission # 1960533
Notary Public - California
San Diego County
My Comm. Expires Nov 17, 2015

Notary Public (Seal)
Dawn Coughlin

CERTIFICADO NOTARIAL PERSONA NATURAL

Hoy de de , compareció(eron) ante mí

a quien (es) conozco y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede y quien(es) declara(n) que otorgan el mismo para los fines y propósitos que en él se expresan.

Notario Público (sello)

NOTARIAL CERTIFICATE NATURAL PERSON

On this day of of
personally appeared before me

who is(are) known to me and who I attest executed the foregoing document and he (they) declared he (they) grant(s) the document for the uses and purposes therein expressed.

Notary Public (Seal)

LEGALIZACIÓN POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.

Ejemplo XII

BDO Productores de cepas que expresan succinil-CoA sintetasa

En este ejemplo se describe aumento de la producción de BDO en las cepas productoras de BDO expresan succinil-CoA sintetasa.

Como se discutió anteriormente, succinato puede ser un precursor para la producción de BDO por conversión a succinil-CoA (véase también WO2008/115840, WO 2009/023493, E.U.A. publicación 2009/0047719, E.U.A. publicación 2009/0075351). Por lo tanto, la cepa huésped fue modificada genéticamente para sobreexpresar los genes de sucCD de E. coli, que codifican succinil-CoA sintetasa. La secuencia de nucleótidos del operón sucCD de E. coli se muestra en la Figura 14 A, y las secuencias de aminoácidos de las subunidades codificadas sintetasa CoA-succinil se muestran en las figuras 14B y 14C. Las cepas de los genes, el sucCD de E. coli se clonaron por PCR a partir de ADN cromosómico de E. coli y se introduce en multicopia plásmidos pZS * 13, pZA13, y pZE33 detrás del promotor PAllacO-1 (Lutz y Bujard, Nucleic Acids Res. 25:. 1203-1210 (1997)) utilizando los procedimientos estándar de biología molecular.

Se sobreexpresan los genes de sucCD de E. coli que codifican la succinil-CoA sintetasa. Los resultados mostraron que la introducción en las cepas sucCD para expresar

succinil-CoA sintetasa mejoró la producción de BDO en diversas cepas en comparación con cualquiera de los niveles de expresión nativas o expresión de cat1, que es un succinil -CoA/acetil-CoA transferasa. Así, la producción de BDO se mejoró por sobreexpresión de los genes nativos de sucCD de E. coli que codifican succinil-CoA sintetasa.

Ejemplo XIII

Expresión de genes heterólogos que codifican enzimas de la Ruta de BDO

Este ejemplo describe la expresión de diversas enzimas de las rutas no nativas para proporcionar una producción mejorada de BDO.

El alfa-cetoglutarato descarboxilasa. El gen Mycobacterium bovis sucA que codifica alfa-cetoglutarato descarboxilasa se expresó en las cepas huésped. La sobreexpresión de sucA de M. bovis mejoran la producción de BDO (véase también WO2008/115840, WO 2009/023493, publicación de E.U.A. 2009/0047719, publicación de E.U.A. 2009/0075351). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos sucA de M. bovis y alfa-cetoglutarato descarboxilasa codificada se muestra en la Figura 15.

Para construir cepas que expresan sucA de M. bovis, los fragmentos del gen que codifica alfa-cetoglutarato descarboxilasa sucA se amplificaron a partir del ADN genómico

de Mycobacterium bovis BCG (ATCC 19015; American Type Culture Collection, de Manassas VA) utilizando cebadores que se muestran a continuación. El gen de cuerpo entero fue montado por reacción de ligadura de los cuatro fragmentos de ADN amplificados y se clonaron en vectores de expresión pZS * 13 y pZE23 detrás del promotor P_{AII0-1} (Lutz y Bujard, Nucleic Acids Res. 25:. 1203-1210 (1997)). La secuencia de nucleótidos del gen ensamblado se verificó mediante secuenciación del ADN.

Cebadores para fragmento 1:

5'- ATGTACCGCAAGTTCCGC-3' (SEC ID NO :)

5'-C AATTTGCCGATGCCCAG-3' (SEC ID NO :)

Cebadores para fragmento 2:

5'-GCTGACCACTGAAGACTTTG-3' (SEC ID NO :)

5'-GATCAGGGCTTCGGTGTAG-3' (SEC ID NO :)

Cebadores para fragmento 3:

5 '-TTGGTGCGGGCCAAGCAGGATCTGCTC-3' (SEC ID NO :)

5'-TCAGCCGAACGCCTCGTCGAGGATCTCCTG-3' (SEC ID NO :)

Cebadores para fragmento 4:

5'-TGGCCATAAGTTCACCATTCGGGCAAAACAAC-3' (SEC ID NO :)

5 '-TCTCTTCAACCAGCCATTCGTTTTGCCCG-3' (SEC ID NO :)

Expresión funcional de alfa-cetoglutarato descarboxilasa se demostró usando ensayos tanto in vitro como in vivo. La actividad enzimática sucA se midió siguiendo un

método que ya se ha informado (Tian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 102: 10670 a 10675 (2005)). La mezcla de reacción contuvo 50 mM de solución reguladora de fosfato de potasio, pH 7.0, 0.2 mM de pirofosfato de tiamina, 1 mM de $MgCl_2$, 0.8 mM de ferricianuro, 1 mM de alfa-cetoglutarato y lisauo bruto celular. La actividad enzimática se controló mediante la reducción de ferricianuro a 430 nm. La función in vivo de la enzima sucA se verificó utilizando E. coli entero de cultivo celular. Las colonias individuales de E. coli MG1655 $lacI^q$ transformadas con plásmidos que codifican la enzima sucA y el 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (4Hbd) se inoculó en 5 ml de medio LB que contiene los antibióticos apropiados. Las células se cultivaron a 37°C durante la noche aeróbicamente. A 200 uL de este cultivo durante la noche se introdujo en 8 ml de medio mínimo M9 (6.78 g/l Na_2HPO_4, 3.0 g/l KH2P04, 0.5 g/l de NaCl, 1.0 g/l NH4Cl, 1 mM de $MgSO_4$, 0.1 mM de $CaCl_2$) suplementado con 20 g/L de glucosa, 100 mM de 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) para mejorar la capacidad amortiguadora, 10 µg/ml de tiamina y los antibióticos apropiados. Las condiciones microaerobias fueron establecidas por lavado inicialmente cubiertas de anaerobios con nitrógeno durante 5 minutos, luego perforando el diafragma con una aguja 23G después de inoculación. La aguja se mantiene en la botella durante el crecimiento para permitir introducir una pequeña cantidad de aire a las botellas. La expresión de la

proteína fue inducida con 0.2 mM de isopropil β-DL-tiogalactopiranósido (IPTG) cuando el cultivo alcanzó a mediados de registro de fase de crecimiento. Como controles, cepas MG1655 de E. coli $lacI^q$ transformada con el plásmido que codifica sólo el 4-hidroxibutirato deshidrogenasa y sólo los vectores vacíos se cultivaron en las mismas condiciones (véase la Tabla 23). La acumulación de 4-hidroxibutirato (4HB) en el medio de cultivo se controló mediante el método de LCMS. Sólo las cepa de E. coli que expresa el Mycobacterium alfa-cetoglutarato descarboxilasa que produjo una cantidad significativa de 4HB (ver Figura 16).

Tabla 24. Tres cepas que contienen varios controles de plásmido y que codifican sucA y 4-hidroxibutirato deshidrogenasa.

	Huésped	pZE13	pZA33
1	MG1655 lacIq	Vector	Vector
2	MG1655 lacIq	vector	4hbd
3	MG1655 lacIq	sucA	4hbd

Un experimento separado demostró que las funciones de la ruta de descarboxilasa alfa-cetoglutarato independientemente del ciclo de Krebs reductivo. La cepa de E. coli ECKh-401 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA :: K.p.lpdA322 Δmdh

ΔarcA) se utilizó la cepa huésped (véase la Tabla 25). Las tres construcciones contuvieron el gen que codifica 4HB deshidrogenasa (4Hbd). La construcción 1 también contuvo el gen que codifica la alfa-cetoglutarato descarboxilasa (sucA). La construcción 2 contuvo los genes que codifican la sintetasa succinil-CoA (sucCD) y el succinato semialdehído CoA-dependiente deshidrogenasa (sucD), que son necesarios para la síntesis de 4HB a través del ciclo de Krebs reductivo. La construcción 3 contiene todos los genes de 1 y 2. Las tres cepas de E. coli fueron cultivadas en las mismas condiciones como se ha descrito anteriormente, excepto el segundo cultivo que estaba bajo la condición micro-aeróbica. Al expresar la enzima sucA, la construcción de 3 produjo más 4HB que la construcción 2, que se basa en el ciclo de Krebs reductor de síntesis de 4HB (ver Figura 17).

El soporte adicional para la contribución de la alfa-cetoglutarato descarboxilasa a la producción de 4HB y BDO fue proporcionada por los experimentos de análisis de flujo. Los cultivos de ECKh-432, que contiene tanto sucCD-sucD y sucA en el cromosoma, se cultivaron en medio mínimo M9 que contuvo una mezcla de 1-13C-glucosa (60%) y U-13C-glucosa (40%). La biomasa se recogió, la proteína fue aislada e hidrolizada a los aminoácidos y la distribución de etiquetas de los aminoácidos fue analizada por espectrometría de gases -cromatografía de masas (GC-MS) como se ha descrito

previamente (Fischer y Sauer, Eur. J. Biochem. 270:880-891 (2003)). Además, la distribución de la etiqueta 4HB y BDO secretada se analizó por GC-MS, como se describe en WO2008115840 A2. Estos datos se usaron para calcular la distribución de flujo intracelular usando métodos establecidos (Suthers et al., Metab. Eng. 9:387-405 (2007)). Los resultados indicaron que entre 56% y 84% de la alfa-cetoglutarato se canalizó a través de alfa-cetoglutarato descarboxilasa en la ruta de BDO. El resto se oxida por la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, que luego entró en BDO por la ruta succinil-CoA.

Estos resultados demuestran cepas productoras de 4-hidroxibutirato que contienen el gen sucA de Mycobacterium bovis BCG expresada en un plásmido. Cuando el plásmido que codifica este gen no está presente, la producción de 4-hidroxibutirato es insignificante cuando no se expresa sucD (succinato semialdehído CoA- dependiente deshidrogenasa). El gen M. bovis es un homólogo estrecho del gen Mycobacterium tuberculosis, cuyo producto de enzima ha sido caracterizado previamente (Tian et al., Supra, 2005).

<u>Succinato semialdehído deshidrogenasa (CoA-dependiente), 4-hidroxibutirato deshidrogenasa y 4-hidroxibutiril-CoA/acetil-CoA transferasa</u>. Los genes de Porphyromonas gingivalis W83 pueden ser componentes efectivos

de la ruta para la producción de 1,4-butanodiol (véase también WO2008/115840, WO 2009/023493, publicación de E.U.A. 2009/0047719, publicación de E.U.A. 2009/0075351). La secuencia de nucleótidos de succinato semialdehído CoA-dependiente deshidrogenasa (sucD) de Porphyromonas gingivalis se muestra en la Figura 18A y la secuencia de aminoácidos codificada se muestra en la Figura 18B. La secuencia de nucleótidos de 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (4hbd) de Porphymonas gingivalis se muestra en la Figura 19A y la secuencia de aminoácidos codificada se muestra en la Figura 19B. La secuencia de nucleótidos de 4-hidroxibutirato CoA transferasa (cat2) de Porphyromonas gingivalis se muestra en la Figura 20A y la secuencia de aminoácidos codificada se muestra en la Figura 20B.

En resumen, los genes de Porphyromonas gingivalis W83 que codifican succinato semialdehído deshidrogenasa (CoA-dependiente) y 4-hidroxibutirato deshidrogenasa y en algunos casos 4-hidroxibutiril-CoA/acetil-CoA adicionalmente, se clonaron por PCR a partir de ADN cromosómico de P. gingivalis y una presentación en plásmidos de múltiples copias pZS * 13, pZA13, y pZE33 detrás del promotor PAllacO-1 (Lutz y Bujard, Nucleic. Acids. Res. 25:. 1203-1210 (1997)) utilizando procedimientos estándar de biología molecular. Estos plásmidos se introdujeron luego en cepas huésped.

Los genes de Porphyromonas gingivalis W83 se introducen en cepas de producción como se ha descrito anteriormente. Algunas cepas incluyen sólo succinato semialdehído deshidrogenasa (CoA-dependiente) y 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, sin 4-hidroxibutiril-CoA/acetil-CoA transferasa.

Butirato cinasa y fosfotransbutirilasa. El butirato cinasa (BK) y fosfotransbutirilasa (ptb), las enzimas pueden utilizarse para producir 4-hidroxibutiril-CoA (véase también WO2008/115840, WO 2009/023493, publicación de E.U.A. 2009/0047719, publicación de E.U.A. 2009/0075351). En particular, los genes de Clostridium acetobutylicum, bukl y ptb, se pueden utilizar como parte de una ruta funcional de BDO.

Los experimentos iniciales implicaron la clonación y expresión de los genes nativos de C. acetobutylicum ptb (020) y BK (021) en E. coli. Cuando sea necesario, el codón de inicio y codón de tope para cada gen se modificaron para "ATG" y "TAA", respectivamente, para la expresión más óptima en E. coli. Las secuencias de genes (C. acetobutylicum 020N y 021N) y sus secuencias peptídicas correspondientes traducidas se muestran en las Figuras 21 y 22.

Los genes ptb y BK existen en C. acetobutylicum como un operón, el gen ptb (020) expresándose en primer lugar. Los dos genes están conectados por la secuencia "atta

aagttaagtg gaggaatgtt aac" (SEC ID NO :) que incluye un sitio de unión ribosomal de reinicio para el BK corriente abajo (021) gen. Los dos genes en este contexto, se fusionaron para lac controlado por los promotores en vectores de expresión para la expresión en E. coli (Lutz y Bujard, Nucleic. Acids Res. 25: 1203-1210 (1997)).

La expresión de las dos proteínas de estas construcciones de vectores se encontró que fue baja en comparación con otros genes expresados exógenamente debido a la alta incidencia de codones en genes de C. acetobutylicum que se producen sólo en raras ocasiones en E. coli. Por lo tanto, se prevé que los nuevos genes 020 y 021 cambien codones raros por los suplentes que están más representados en las secuencias de genes de E. coli. Este método de optimización del codón siguieron algoritmos descritos anteriormente (Sivaraman et al., Nucleic. Acids Res. 36:.. EL6 (2008)). Este método predice sustituciones de codones en el contexto de su frecuencia de ocurrencia, cuando son flanqueados por ciertos codones en cada lado. Las secuencias de genes alternativos para 020 (Figura 23) y 021 (Figura 24) se determinó que un creciente número de codones raros fueron reemplazados por los codones más frecuentes (a <b <c <d) en función de su incidencia en el contexto codón vecino. No hay cambios en la secuencia del péptido real en comparación con

las secuencias de péptidos nativas 020 y 021 se introdujeron en estas secuencias previstas.

La mejora en la expresión de las proteínas BK y ptb resultantes de optimización del codón se muestra en la Figura 25A. La expresión de las secuencias de genes nativos se muestra en la línea 2, mientras que la expresión de la 020B-021B y 020C 021C se muestra en las líneas 3 y 4, respectivamente. Los niveles más altos de expresión de la proteína en los operones de codón-optimizados 020B-021B (2021B) y 020C-021C (2021C) también dio lugar a una mayor actividad en comparación con el operón nativo (2021n) en extractos crudos equivalentemente expresados de E. coli (Figura 25B).

Los operones de codones optimizados se expresaron en un plásmido en la cepa ECKh-432 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA :: K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD :: sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis fimD;; sucA de M. bovis , C. kluyveri 4hbd) junto con el aldehído deshidrogenasa C. acetobutylicum para proporcionar una ruta completa de BDO. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 que contuvo 20 g/L de glucosa, utilizando una aguja 23G para mantener las condiciones microaerobias como se describió anteriormente. Se midió la conversión resultante de la glucosa en el producto final BDO. También se midió la acumulación de gama-butirilactona (GBL), que es una molécula

espontáneamente reordenada derivada de 4HB-CoA, el producto inmediato de la enzima par ptb-BK. La Figura 26 muestra que la expresión del operón 2021n nativo dio como resultado niveles de BDO comparables a una función de la enzima alternativa, cat2 (034), que es capaz de convertir 4HB y libre CoA a 4HB-CoA. Los niveles de GBL de 034 fueron significativamente mayores que 2021n, lo que sugiere que la enzima anterior tiene más actividad que ptb-BK expresada a partir de los genes nativos. Sin embargo, tanto los niveles de BDO y GBL fueron mayores que cualquiera de los 034 o 2021n cuando se expresaron las variantes de codón optimizadas 2021B y 2021C, lo que indica que la optimización de codones de los genes para la TBP y BK aumenta significativamente sus contribuciones a la síntesis de BDO en E. coli.

Estos resultados demuestran que las enzimas butirato quinasa (BK) y fosfotransbutirilasa (ptb) se pueden emplear para convertir 4-hidroxibutirato a 4-hidroxibutiril-CoA. Esto elimina la necesidad de una enzima transferasa como transferasa 4-hidroxibutiril-CoA/Acetil-CoA, lo que generaría un mol de acetato por cada mol de 4-hidroxibutiril-CoA producido. Las enzimas de Clostridium acetobutylicum están presentes en un número de cepas de ingeniería para la producción de BDO.

4-hidroxibutiril-CoA reductasa. El gen ald de Clostridium beijerinckii puede ser utilizado como parte de

una ruta funcional de BDO (véase también WO2008/115840, WO 2009/023493, publicación de E.U.A. 2009/0047719, publicación de E.U.A. 2009/0075351). La ald de Clostridium beijerinckii también puede ser utilizada para la producción de etanol menor en las cepas productoras de BDO. Además, un determinado codón optimizado de variante de ald (GNM0025B) se encontró para mejorar la producción de BDO.

El gen ald nativo C. beijerinckii (025n) y la secuencia de proteína predicha de la enzima se muestran en la Figura 27. Como se ha visto por el ptb Clostridium acetobutylicum y los genes BK, la expresión del gen nativo ald C. beijerinckii fue muy baja en E. coli. Por lo tanto, cuatro codones optimizados para las variantes de este gen se predijeron. Las Figuras 28A-28D muestran las secuencias de genes alternativos para 025, en la que un número creciente de codones raros se sustituyen por los codones más frecuentes (A <B <C <D) en función de su incidencia en el contexto codón de vecinos (25 A, P = 0.05; 25B, p = 0.1; 25C, p = 0.15; 25D, P = 1). No se introdujeron cambios en la secuencia peptídica real en comparación con la secuencia del péptido nativo 025 en estas predicciones. La optimización del codón aumenta significativamente la expresión de ald C. beijerinckii (véase Figura 29), lo que dio como resultado la conversión significativamente más alta de glucosa a BDO en células que expresan la totalidad de la ruta de BDO (Figura 30A).

Los genes nativos y codón optimizado se expresaron en un plásmido junto con cat2 de P. gingivalis, en la cepa huésped ECKh-432 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA :: K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L ΔackA fimD:: sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis fimD :: sucA de M. bovis, C. kluyveri 4hbd), por lo que contiene una ruta completa de BDO. Las células fueron cultivadas microaeróbicamente en medio mínimo M9 que contuvo 20 g/L de glucosa como se describió anteriormente. La producción relativa de BDO y etanol por la enzima ald C. beijerinckii (expresada a partir del gen de codón variante optimizado 025B) se comparó con la enzima C acetobutylicum AdhE2 (véase la Figura 30B). La enzima AdhE2 de C. acetobutylicum (002 C) produjo etanol a partir de casi 4 veces más de BDO. En comparación, la ald C. beijerinckii (025B) (junto con una actividad endógena de ADH) produjo cantidades equivalentes de BDO, sin embargo, la proporción de BDO a la producción de etanol se invirtió para esta enzima en comparación con 002C. Esto sugiere que la ald C. beijerinckii es más específica para 4HB-CoA sobre acetil-CoA que el AdhE2 C. acetobutylicum, y por lo tanto, la anterior es la enzima preferida para su inclusión en la ruta de BDO.

El gen ald de Clostridium beijerinckii (Toth et al., Appl. Environ. Microbiol. 65:4973-4980 (1999)) se ensayó como un candidato para catalizar la conversión de 4-

hidroxibutiril-CoA a 4-hidroxibutanal. Más de cincuenta aldehído deshidrogenasas fueron seleccionadas por su capacidad para catalizar la conversión de 4-hidroxibutiril-CoA a 4-hidroxibutiraldehído. El gen ald C. beijerinckii fue elegido para la aplicación en BDO de cepas productoras debido a la preferencia de esta enzima para 4-hidroxibutiril-CoA como sustrato en lugar de acetil-CoA. Esto es importante porque la mayoría de otras enzimas con funcionalidad de aldehído deshidrogenasa (por ejemplo, adhE2 de C. acetobutylicum (Fontaine et al., J. Bacteriol. 184:821-830 (2002)) preferentemente convierten acetil-CoA a acetaldehído, que a su vez se convierte en etanol. El uso del gen C. beijerinckii disminuye la cantidad de etanol producido como subproducto en los organismos productores de BDO. Además, una versión codón optimizado de este gen se expresa muy bien en E. coli (Sivaraman et al., Nucleic. Acids Res. 36: EL6 (2008)).

4-hidroxibutanal reductasa. Se utilizó la actividad de 4-hidroxibutanal de la reductasa de la adhl de Geobacillus thermoglucosidasius (M10EXG). Esto condujo a la producción mejorada mediante el aumento de actividad de BDO 4-hidroxibutanal de la reductasa en los niveles endógenos.

Se tamizaron alcohol deshidrogenasas múltiples por su capacidad para catalizar la reducción de 4-hidroxibutanal

a BDO. La mayoría de las alcohol-deshidrogenasas con alta actividad en el butiraldehído exhibieron actividad muy por debajo del 4-hidroxibutiraldehído. Una excepción notable es el gen de la adhl Geobacillus thermoglucosidasius M10EXG (Jeon et al., J. Biotechnol. 135: 127-133 (2008)) (GNM0084), que presenta una alta actividad en 4-hidroxibutanal y butanal.

La secuencia del gen nativo y la secuencia de la proteína codificada si el gen de adhl Geobacillus thermoglucosidasius se muestra en la Figura 31. El gen G. thermoglucosidasius ALDL se expresó en E. coli.

La enzima Adhl (084) se expresa muy bien a partir de su gen nativo en E. coli (véase la Figura 32A). En los ensayos enzimáticos ADH, la enzima de E. coli expresada mostró actividad reductora muy alta cuando fueron utilizados butiraldehído o aldehído-4HB como los sustratos (véase la Figura 32B). Los valores de Km determinados para estos sustratos fueron 1.2 mM y 4.0 mM, respectivamente. Estos valores de actividad mostraron que la enzima Adhl fue la más activa en la reducción de 4HB-aldehído de todos los candidatos ensayados.

La enzima 084 se puso a prueba por su capacidad para impulsar la producción de BDO cuando se combina con la ald C. beijerinckii. El gen se insertó 084 detrás de la variante del gen ald C. beijerinckii 025B para crear un

operón sintético que tiene como resultado la expresión de ambos genes acoplados. Las construcciones similares 025B fueron ligadas con otros genes candidatos ADH y se probó el efecto de incluir cada ADH con 025B en la producción de BDO. La cepa huésped utilizada fue ECKh-459 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA :: fnr-pflB6-K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis fimD :: sucA de M. bovis, C. kluyveri 4hbd fimD :: bukI de C. acetobutylicum, C. acetobutylicum ptb), que contiene el resto de la ruta de BDO en el cromosoma.

La ADH 084 expresadas junto con 025B mostró la mayor cantidad de BDO (flecha hacia la derecha en la Figura 33) cuando se compara con sólo 025B (flecha izquierda en la Figura 33) y junto con funciones endógenas ADH. También produjo más BDO que lo hicieron otras enzimas ADH cuando se combina con 025B, se indica como sigue: 026A-C, variantes de codón optimizado de butanol deshidrogenasa de Clostridium acetobutylicum; 050, Zymomonas mobilis alcohol deshidrogenasa I; 052, 1,3-propanodiol deshidrogenasa de Citrobacter freundii, 053, 1,3-propanodiol deshidrogenasa de Lactobacillus brevis, 057, lactaldehido reductasa de Bacteroides fragilis, 058 de 1,3-propanodiol deshidrogenasa de E. coli; 071 de semialdehído alfa-cetoglutarato deshidrogenasa de Bacillus subtilis 168. Las construcciones marcadas "PT51acO" son aquellos en los que los genes son

impulsados por el promotor PT51acO. En todos los demás casos, el promotor PAllacO-1 se utilizó. Esto demuestra que la inclusión de la ADH 084 en la ruta de BDO aumento de la producción de BDO.

Ejemplo XIV

Cepas Productoras de BDO de Expresión de Piruvato Deshidrogenasa

Este ejemplo describe el uso de piruvato deshidrogenasa (PDH) para mejorar la producción de BDO. La expresión heteróloga de la neumonía por Klebsiella gen ipdA se utilizó para aumentar la producción de BDO.

Computacionalmente, la conversión de NADH generadora de piruvato a acetil-CoA se requiere para alcanzar el rendimiento máximo teórico de 1,4-butanodiol (véase también WO2008/115840, WO 2009/023493, publicación de E.U.A. 2009/0047719, publicación de E.U.A. 2009/0075351, WO 2008/018930, Kim et al., Appl.. Environ.. Microbiol. 73: 1766-1771 (2007), Kim et al., J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008); Menzel et al., J. Biotechnol. 56: 135-142 (1997)). La falta de actividad de la PDH ha demostrado reducir al máximo el rendimiento anaeróbico teórico de BDO en un 11% si fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (pepCK) la actividad no puede ser alcanzado y un 3% si la actividad pepCK puede ser alcanzado. Más importante, sin embargo, la ausencia de

actividad de la PDH en la cepa 439 # OptKnock, que se describe en la patente WO 2009/023493 y la publicación de E.U.A. 2009/0047719, que tiene la eliminatoria de la adherencia, ASPT, LDH_D, MDH y PFLi, podría reducir el rendimiento anaeróbico máximo de BDO en un 54% o un 43% si la actividad pepCK esté ausente o presente, respectivamente. En presencia de un aceptor de electrones externo, la falta de actividad de la PDH reduciría el máximo rendimiento de la cepa por KO del 10% o un 3% suponiendo que la actividad pepCK está ausente o presente, respectivamente.

PDH es una de las enzimas más complicados de metabolismo central y se compone de 24 copias de la piruvato descarboxilasa (El) y 12 moléculas de dihidrolipoil deshidrogenasa (E3), que se unen a la parte exterior de la dihidrolipoil transacetilasa (E2) del núcleo. PDH es inhibida por la alta NADH/NAD, ATP/ADP, y la acetil-Co A o una cooperativa de proporciones. La enzima natural muestra una actividad muy baja en condiciones limitadas de oxígeno o anaeróbicas en los organismos tales como E. coli, debido en gran parte a la sensibilidad de NADH en el E3, codificadas por ipdA. Para este fin, una versión NADH-insensible del gen ipdA de Klebsiella pneumoniae fue clonado y expresado para aumentar la actividad de la PDH en condiciones donde se espera que sea alta la relación NADH/NAD.

Reemplazo de ipdA nativo. El operón piruvato deshidrogenasa de Klebsiella pneumoniae se encuentra entre 78 y 95% idénticos a nivel de nucleótidos para el operón equivalente de E. coli. Se ha demostrado previamente que K. pneumoniae tiene la capacidad de crecer en condiciones anaerobias en presencia de glicerol (Menzel et al., J. Biotechnol. 56: 135-142 (1997); Menzel et al., Biotechnol. Bioeng. 60:617-626 (1998)). También se ha demostrado que dos mutaciones en el gen ipdA del operón de E. coli aumentaría su capacidad para crecer anaeróbicamente (Kim et al., Appl. Environ. Microbiol. 73: 1766-1771 (2007); Kim et al., J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008)). El gen de la ipdA de K. pneumonia fue amplificado por PCR utilizando ADN genómico (ATCC700721D) como plantilla y los cebadores KP-LPDA-Bam (5'-acacgcggatccaacgtcccgg-3') (SEC ID NO :) y KP-LPDA-Nhe (5'-agcggctccgctagccgcttatg-3') (SEC ID NO :). El fragmento resultante fue clonado en el vector pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad CA), dando lugar al plásmido PCR-PK-lpdA.

El reemplazo del gen cromosómico se realizó utilizando un plásmido no replicativo y el gen sacB de Bacillus subtilis como un medio de contraselección (Gay et al., J. Bacteriol. 153: 1424-1431 (1983)). El vector utilizado es pRE118 (ATCC87693) suprimido de la oriT y son secuencias, lo que es de 3.6 kb de tamaño y que tienen el gen

de resistencia a la canamicina. La secuencia fue confirmada, y el vector se llama pRE118-V2 (véase Figura 34).

Los fragmentos de E. coli que flanquean el gen lpdA se amplificaron por PCR utilizando la combinación de cebadores: EC-aceF-Pst (5'-aagccgttgctgcagctcttgagc-3') (SEC ID NO :) + EC-aceF-Bam2 (5'-atctccggcggtcggatccgtcg-3') (SEC ID NO :) y EC-Yach-Nhe (5'-aaagcggctagccacgccgc-3 ') (SEC ID NO :) + EC-Yach-KPN (5'-attacacgaggtacccaacg-3') (SEC ID NO :). Un fragmento BamHI-XbaI que contuvo el gen de la neumonía ipdA K. se aisló a partir del plásmido pCR-PK-lpdA y se ligó a los fragmentos anteriores de E. coli digeridos con PstI-1-BamHI y KpnI-Nhel respectivamente, y el plásmido pRE118 -V2 digerido con KpnI y PstI. El plásmido resultante (llamada pRE118-M2.1 IpdA yac) se sometió a mutagénesis dirigida al sitio (SDM), utilizando la combinación de cebadores KP-lpdA-HisTyr-F (5'-atgctggcgtacaaaggtgtcc-3') (SEC ID NO :) y (5'-ggacacctttgtacgccagcat-3') (SEC ID NO :) para la mutación de la Su 322 residuo a un residuo Tyr o cebadores KP-LPDA-GluLys-F (5'-atcgcctacactaaaccagaagtgg-3') (SEC ID NO :) y KP-lpdA-GluLys-R (5'-ccacttctggtttagtgtaggcgat-3') (SEC ID NO :) para la mutación del residuo de Glu 354 a los residuos de Lys. PCR se realizó con la polimerasa Pfu Turbo (Stratagene, San Diego, CA). La secuencia del fragmento entero, así como se verificó la presencia de sólo las mutaciones deseadas. El plásmido resultante se introdujo en células electro

competentes de E. coli ΔadhE :: FRT-ΔldhA :: Frt por transformación. El primer evento de integración en el cromosoma se seleccionó en placas de agar LB que contuvo canamicina (25 o 50 mg/l). Las inserciones incorrectas fueron verificadas por PCR utilizando 2 cebadores, uno situado fuera de la región de inserción y uno en el gen de canamicina (5'-aggcagttccataggatggc-3') (SEC ID NO :). Los clones con la inserción correcta se seleccionaron para su resolución. Fueron sub-cultivados dos veces en LB líquido puro a la temperatura deseada y se sembraron diluciones en serie en placas con LB-sin sal-sacarosa 10%. Los clones que crecieron en placas que contienen sacarosa fueron examinados para detectar la pérdida del gen de resistencia a kanamicina en LB-agar bajo condiciones salinas y la sustitución de genes ipdA se verificó por PCR y secuenciación de la región circundante. La secuencia de la región de inserción fue verificada y es como se describe a continuación. Fue seleccionado un clon (llamado 4-4-P1) con mutación de Glu354Lys. Este clon fue entonces traducido con PI lisado de E. coli APflB :: Frt que conduce a la tensión ECKh-138 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA :: K.p.lpdA322).

La secuencia de la región ECKh-138 que abarca el aceF y los genes lpdA se muestra en la Figura 35. La neumonía por K. lpdA gen está subrayado, ya la sombra del codón cambiado en el mutante Glu354Lys. La comparación de

secuencias de proteínas de la E. coli nativa lpdA y el mutante K. neumonía lpdA se muestra en la Figura 36.

Para evaluar el beneficio de usar K. pneumoniae lpdA en una cepa de producción de BDO, el huésped cepas AB3 y ECKh-138 fueron transformadas con plásmidos que expresan toda la ruta de BDO de fuertes promotores inducibles. En concreto, la sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd P. gingivalis se expresaron en copias medias del plásmido pZA33, y cat2 de P. gingivalis y AdhE2 de C. acetobutylicum se expresaron en altas copias del plásmido pZE13. Estos plásmidos se han descrito en la literatura (Lutz y Bujard H., Nucleic. Acids Res 25: 1203-1210 (1997)) y su uso para la expresión de la ruta de BDO se describe en el Ejemplo XIII y WO 2008/115840.

Las células se cultivaron anaeróbicamente a 37°C en medio mínimo M9 (6.78 g/l Na_2HPO_4, 3.0 g/l KH_2PO_4, 0.5 g/l de NaCl, 1.0 g/l NH_4Cl, 1 mM de $MgSO_4$, 0.1 mM de $CaCl_2$) suplementado con 20 g/L de glucosa, 100 mM de 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) para mejorar la capacidad amortiguadora, 10 µg/ml de tiamina y los antibióticos apropiados. Las condiciones microaerobias fueron establecidas por lavado inicialmente cubiertas de anaerobios con nitrógeno durante 5 minutos, luego perforando el diafragma con una aguja 23G siguiendo la inoculación. La aguja se mantiene en la botella durante el crecimiento para permitir que se

introduzca una pequeña cantidad de aire a las botellas. 0.25 mM IPTG se añadió al OD600 alcanzó aproximadamente 0.2 para inducir los genes de la ruta y se tomaron muestras para el análisis de cada 24 horas Después de la inducción. Los sobrenadantes de cultivo se analizaron para BDO, 4HB, y otros subproductos como se describe en el Ejemplo II y en WO2008/115840. La producción de BDO y 4HB en ECKh-138 fue significativamente mayor después de 48 horas que en AB3 o el host utilizado en trabajos anteriores, MG1655 AldhA (Figura 37).

Reemplazo de promotor PDH. Se ha demostrado previamente que la sustitución del represor de pdhR por una fusión transcripcional que contiene el sitio de unión Fnr, uno de los promotores pflB y su sitio de unión al ribosoma (RBS), lo que conduce a la expresión del operón aceEF-lpd por un promotor anaeróbico, debe aumentar la actividad de la PDH anaeróbicamente (Zhou et al., Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008)). Una fusión que contiene el sitio de unión Fnr, el promotor pflB-P6 y un sitio de unión RBS se construyeron mediante la superposición de la PCR. Dos fragmentos fueron amplificados, utilizando los cebadores un aceE-corriente arriba-RC (5'-tgacatgtaacacctaccttctgtgcctgtgccagtggttgc tgtgatatagaag-3') (SEC ID NO :) y pflBp6-Up-Nde (5'-ataataatacatatgaaccatgcgagttacgggcctataagccaggcg-3') (SEC ID

NO :) y la otra utilizando los cebadores aceE-EcoRV-CE (5'-agtttttcgatatctgcatcagacaccggcacattgaaacgg-3') (SEC ID NO :) y aceE corriente arriba (5' ctggcaca ggcacagaaggtaggtgttacatgtcagaacgtttacacaatgacgtggatc-3') (SEC ID NO :) Los fragmentos tw fueron reunidos por la superposición de PCR y el fragmento final de ADN se digirió con las enzimas de restricción NdeI y BamHI. Este fragmento se introdujo posteriormente corriente arriba del gen aceE del operón E. coli utilizando pRE118-V2 como se ha descrito anteriormente. La sustitución se llevó a cabo en las cepas ECKh-138 y ECKh-422. La secuencia de nucleótidos que abarca la región 5' del gen aceE se verificó y se muestra en la Figura 37. La Figura 37 muestra la secuencia de nucleótidos del extremo 5 'del gen aceE fusionado al promotor pflB-P6 y el sitio de unión al ribosoma (RBS). La secuencia 5 'en cursiva muestra el comienzo del gen aroP, que se transcribe en la dirección opuesta desde el operón PDH. La secuencia en cursiva 3 'muestra el comienzo del gen aceE. En mayúsculas: pflB RBS. Subrayado: sitio de unión fnr. En negritas: secuencia promotora pflB-P6.

Reemplazo promotor de ipdA. La región promotora contiene el sitio de unión fnr, el promotor pflB-P6 y RBS del gen de la pflB se amplificó por PCR utilizando plantilla cromosómica de ADN y cebadores ACEF-pflBp6-FWD (5'-

agacaaatcggttgccgtttgttaagccaggcgagatatgatctatatc-3') (SEC ID NO:) y LPDA-RBS-B-REV (5'-gagttttgatttcagtactcatcatg taacacctaccttcttgctgtgatatag-3') (SEC ID NO :). El plásmido 2-4a fue amplificado por PCR utilizando los cebadores B-RBS-lpdA FWD (5'-ctatatcacagcaagaaggtaggtgttacatgatga gtactgaaatcaaaactc-3') (SEC ID NO :) y pflBp6 aceF-rev-(5'-gatatagatcatatctcgcctggcttaacaaacggcaaccgatttgtct-3') (SEC ID NO :). Los dos fragmentos resultantes fueron ensamblados utilizando el kit de clonación BPS (BPS Bioscience, San Diego, CA). La construcción resultante fue verificada secuenciada y se introdujo en la cepa ECKh-439 utilizando el método pRE118-V2 descrito anteriormente. La secuencia de nucleótidos que abarca la región aceF-lpdA en la cepa resultante ECKh-456 se muestra en la Figura 39.

La cepa huésped ECKh-439 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA :: K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L ackA fimD:: sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis fimD :: sucA de M. bovis, C. kluyveri 4hbd), cuya construcción se describe a continuación, y se probaron los derivados pdhR y ipdA de sustitución del promotor 455-ECKh y ECKh-456, para la producción de BDO. Las cepas fueron transformadas con pZS * 13 que contienen cat2 de P. gingivalis y C. ald beijerinckii para proporcionar una ruta completa de BDO. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 suplementado con 20 g/l de glucosa como se describió anteriormente. 48 horas después de

la inducción con IPTG 0.2 mM, las concentraciones de BDO, 4HB y piruvato fueron como se muestra en la Figura 40. Las cepas de recambio promotor producir un poco más BDO que los padres isogénicos.

Estos resultados demostraron que la expresión de la piruvato deshidrogenasa aumentó la producción de BDO en las cepas productoras de BDO.

Ejemplo XV

Cepas Productoras BDO que Expresan Citrato Sintasa y Aconitasa

Este ejemplo describe la actividad creciente de citrato sintasa y aconitasa para aumentar la producción de BDO. Se encontró que una mutación en R163L gltA mejora la producción de BDO. Además, una eliminación de arcA se utiliza para mejorar la producción de BDO.

Computacionalmente, se determinó que el flujo a través de la citrato sintasa (CS) y la aconitasa (ACONT) es necesario para alcanzar el rendimiento máximo teórico de 1,4-butanodiol (véase también WO2008/115840, WO 2009/023493, publicación de E.U.A. 2009/0047719, publicación de E.U.A. 2009/0075351). La falta de actividad CS o ACONT reduciría el rendimiento teórico máximo de 14% bajo condiciones anaeróbicas. En presencia de un aceptor de electrones

externo, el rendimiento máximo se reduce en un 9% o un 6% sin flujo a través de CS o ACONT suponiendo la ausencia o presencia de actividad pepCK, respectivamente. Al igual que con la piruvato deshidrogenasa (PDH), la importancia de la CS y ACONT se amplifica considerablemente en el fondo cepa knock-out en el que la adherencia, ASPT, LDH_D, MDH y PFLi son eliminados (diseño # 439) (véase el documento WO 2009/023493 y la publicación de E.U.A. 2009/0047719, que se incorpora aquí por referencia).

El diseño de cepa OptKnock mínima se describe en la patente WO 2009/023493 y la publicación de E.U.A. 2009/0047719 tuvo una supresión adicional más allá de ECKh-138, el gen de la MDH, la codificación de la malato deshidrogenasa. La supresión de este gen tiene por objeto impedir el flujo de succinato a través del ciclo de Krebs reductor. La supresión MDH se realizó mediante el método de recombinación homóloga roja λ (Datsenko y Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 97:6640-6645 (2000)). Los siguientes oligonucleótidos se utilizaron para amplificar por PCR el gen de resistencia a cloranfenicol (CAT) flanqueado por sitios FRT de pKD3:

S-mdh-Kan 5' **TAT TGT GCA TAC AGA TGA ATT TTT ATG CAA ACA GTC AGC CCT GAA GAA GG**G TGT AGG CTG GAG CTG CTT C -3' (SEC ID NO :)

AS-mdh-Kan 5'- **CAA AAA ACC GGA GTC TGT GCT CCG GTT TTT TAT TAT CCG CTA ATC AAT TAC** ATA TGA ATA TCC TCC TTA G -3' (SEC ID NO ").

Las regiones subrayadas indican de homología de secuencia a plásmido PKD3 y las negritas se refieren a una homología de secuencia corriente arriba y corriente abajo de la mdh ORF. Después de la purificación, el producto de PCR se electroforaró en células electrocompetentes ECKh-138 que habían sido transformadas con pRedET(tet) y se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante (www.genebridges.com/gb/pdf/K001%20Q%20E%20BAC%20Modification%20Kit-version2.6-2007-screen.pdf). El producto PCR se diseña de manera que se integra en el genoma ECKh-138 en una región corriente arriba del gen MDH, como se muestra en la Figura 41.

Las recombinantes se seleccionaron para resistencia al cloranfenicol y se purificó mediante estriado. La pérdida del gen MDH y la inserción de CAT fue verificada por PCR de diagnóstico. Para eliminar el gen CAT, un plásmido pCP20 sensible a la temperatura que contiene una FLP recombinasa (Datsenko y Wanner, Proc. Natl.. Acad. E.U.A. 97:6640-6645 (2000)) se transformó en la célula a 30°C y se seleccionó para resistencia a la ampicilina (AMP). Los transformantes se desarrollaron no selectivamente a 42°C durante la noche para inducir térmicamente la síntesis FLP y provocar la pérdida

del plásmido. El cultivo se purifica por estriado y las colonias individuales se ensayaron para determinar la pérdida de todas las resistencias a antibióticos. La mayoría perdió el gen de resistencia FRT-flanqueado y el plásmido auxiliar de FLP de forma simultánea. También hubo restos de cicatriz de "FRT". La cepa resultante fue denominada ECKh-172.

CS y ACONT no son altamente activos o altamente expresados en condiciones anaeróbicas. Para este fin, el gen arcA, que codifica para un regulador global del ciclo de Krebs, ha sido eliminado. arcA trabaja en condiciones microaerobias para inducir la expresión de productos génicos que permiten la actividad de las enzimas del metabolismo de centrales que son sensibles a los niveles bajos de oxígeno, aceE, pflB y adhE. Se ha demostrado microaerobicamente, que una supresión en arcA/ArcB aumenta las actividades específicas de genes ldh, icd, gltA, rndh y gdh (Salmon et al., J. Biol. Chem. 280: 15084 - 15096 (2005); Shalel-Levanon et al., Biotechnol. Bioeng. 92 (2): 147-159 (2005). Las regiones corriente arriba y corriente abajo del gen de arcA de E. coli MG1655 fueron amplificadas por PCR utilizando los cebadores arcA-arriba-EcoRI (5'-ataataatagaattcgtttgctacctaaattgccaactaaatcgaaacagg-3') (SEC ID NO :) con arcA-arriba-KpnI (5'-tattattatggtaccaatatcatgcagcaaacggtgcaacattgccg-3') (SEC ID NO :) y arcA-abajo-EcoRI (5'-

tgatctggaagaattcatcggctttaccaccgtcaaaaaaaacggcg -3') (SEC ID NO :) con arcA-abajo-PstI (5'-ataaaaccctgcagcggaaacgaagttttatccatttttggttacctg -3') (SEC ID NO :), respectivamente. Estos fragmentos se digirieron posteriormente con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI (fragmento corriente arriba) y EcoRI y PstI (corriente abajo). Se ligaron a continuación en el plásmido pRE118-V2 digerido con PstI y KpnI, que conduce al plásmido pRE118-AarcA. La secuencia del plásmido pRE118-ΔarcA fue verificada. pRE118-ΔarcA se introdujo en células electro-competentes de E. coli de cepa ECKh-172 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA :: KplpdA322 Δmdh). Después de la integración y la resolución sobre placas de LB-sin sal -sacarosa como se ha descrito anteriormente, la supresión del gen arcA en el cromosoma de la cepa resultante ECKh-401 se verificó mediante secuenciación y se muestra en la Figura 42.

El gen gltA de E. coli codifica para una citrato sintasa. Se ha demostrado previamente que este gen se inhibe alostéricamente por NADH y los aminoácidos implicados en esta inhibición se han identificado (Pereira et al., J. Biol. Chem. 269 (1) : 412-417 (1994); Stokell et al., J. Biol. Chem. 278 (37): 35435-35443 (2003)). El gen gltA de E. coli MG1655 fue amplificado por PCR utilizando los cebadores gltA-up (5'-ggaagagaggctggtacccagaagccacagcagga-3') (SEC ID NO :) y gltA PstI-(5'-gtaatcactgcgtaagcgccatgccccggcgttaattc-3')

(SEC ID NO:). El fragmento amplificado se clona en pRE118-V2 después de la digestión con KpnI y PstI. El plásmido resultante se denominó pRE118-gltA. Este plásmido se sometió entonces a mutagénesis dirigida al sitio (SDM) utilizando cebadores R163L-F (5'-attgccgcgttcctcctgctgtcga-3') (SEC ID NO :) y R163L-R (5'-cgacagcaggaggaacgcggcaat-3') (SEC ID NO:) para cambiar el residuo Arg 163 a un resto de Lys. La secuencia del fragmento entero se verificó mediante secuenciación. Una variación del método λ rojo recombinación homóloga (Datsenko y Wanner, Proc. Natl. Acad. E.U.A. 97:6640-6645 (2000)) se utiliza para reemplazar el gen nativo gltA con el alelo mutante R163L sin dejar una cicatriz Frt. El procedimiento de recombinación general es la misma que la utilizada para hacer la supresión MDH descrito anteriormente. En primer lugar, la cepa ECKh-172 se hizo resistente a la estreptomicina mediante la introducción de una mutación nula de rpsL utilizando el método de recombinación homóloga λ rojo. A continuación, una recombinación fue hecha para reemplazar la totalidad de región codificante tipo silvestre gltA en esta cepa con un casete que consta de un gen de resistencia a kanamicina (KanR) y una copia de tipo silvestre del gen de E. coli rpsL. Cuando se introduce en una cepa de E. coli que aloja una mutación nula rpsL, el casete hace que las células cambien de resistencia a la estreptomicina fármaco a la sensibilidad estreptomicina. Fragmentos de ADN

se introdujo entonces que incluye cada una de las versiones mutantes del gen gltA junto con las correspondientes homólogos extremos, y el crecimiento resultante colonia se ensayó en presencia de estreptomicina. Este seleccionado para las cepas en las que había sido el KanR/casete rpsL reemplazado por el gen mutante gltA. La inserción del gen mutante en el lugar correcto fue confirmada por PCR y análisis de secuenciación de ADN. La cepa resultante se llamó ECKh-422 y tiene el genotipo ΔadhE ΔldhA ΔpflB AlpdA :: K.p.lpdA322 ΔMDH ΔarcA gltAR163L. La región que abarca el gen mutado de la cepa gltA ECKh-422 se verificó mediante secuenciación, como se muestra en la Figura 43.

Los extractos crudos de las cepas ECKh-401 y la mutante gltAR163L ECKh-422 fueron evaluados para la actividad de citrato sintasa. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 4,500 rpm (Beckman-Coulter, Allegera X-15R; Fullerton CA) durante 10 min. Los sedimentos se resuspendieron en 0.3 ml BugBuster (Novagen/DME, San Diego, CA) reactivo con benzonasa y lisozima y la lisis procedió durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se obtuvo lisado libre de células por centrifugación a 14.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5402; Hamburgo, Alemania) durante 30 min a 4°C. La proteína de la célula en la muestra se determinó utilizando el método de Bradford (Bradford, Anal. Biochem. 72:248-254 (1976)).

La actividad de citrato sintasa se determinó siguiendo la formación de libre de coenzima A (HS-CoA), que se libera de la reacción de acetil-CoA con oxalacetato. El grupo tiol libre de HS-CoA reacciona con 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) para formar ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). La concentración de TNB a continuación se monitorea espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 410 nm (máximo a 412 nm). La mezcla de ensayo contuvo 100 mM de Tris/HCl (pH 7.5), 20 mM de acetil-CoA, 10 mM de DTNB y 20 mM de oxaloacetato. Para la evaluación de la inhibición de NADH, 0.4 mM de NADH se añadió también a la reacción. El ensayo se inició mediante la adición de 5 microlitros del extracto celular y la velocidad de reacción se midió siguiendo el cambio de absorbancia con el tiempo. Una unidad de actividad específica se define como la µmol de producto convertido por minuto y por mg de proteína.

La Figura 44 muestra la actividad de la citrato sintasa del producto del gen de tipo silvestre y la mutante gltA R163L. El ensayo se realizó en ausencia o presencia de 0.4 mM de NADH.

Las cepas ECKh-401 y 422-ECKh se transformaron con plásmidos que expresan toda la ruta de BDO. sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis, y sucA de M. bovis se expresaron en la copia baja del plásmido pZS * 13, y P. gingivalis y cat2 AdhE2 de C. acetobutylicum se expresaron

en copias medias del plásmido pZE23. Los cultivos de estas cepas se cultivaron microaerobicamente en medio mínimo M9 suplementado con 20 g/l de glucosa y los antibióticos apropiados como los descritos anteriormente. Los 4HB y BDO concentraciones a las 48 horas después de la inducción promediado a partir de cultivos duplicados que se muestran en la Figura 45. Ambos son superiores en ECKh-422 que en ECKh-401, lo que demuestra que la mayor actividad de citrato sintetasa debido a la mutación gltA da como resultado el flujo incrementado a la ruta de BDO.

Las modificaciones en la cepa huésped descritas en esta sección se destinan a redirigir el flujo de carbono a través del ciclo oxidativo TCA, lo cual concuerda con el diseño de la cepa OptKnock descrita en el documento WO 2009/023493 y publicación de E.U.A. 2009/0047719. Para demostrar que el flujo se dirige efectivamente a través de esta ruta, el análisis de flujo de ^{13}C se realizó utilizando la cepa ECKh-432, que es una versión de ECKh-422 en el cual se integra la ruta de corriente arriba en el cromosoma (como se describe en el Ejemplo XVII). Para completar la ruta de BDO, cat2 de P. gingivalis y ald C. beijerinckii se expresa a partir pZS * 13. Cuatro cultivos paralelos se cultivaron en medio mínimo M9 (6.78 g/l Na_2HPO_4, 3.0 g/l KH_2PO_4, 0.5 g/l de NaCl, 1.0 g/l NH_4C1, 1 mM de $MgSO_4$, 0.1 mM de $CaCl_2$) que contiene 4 g/l de glucosa total de cuatro relaciones

diferentes de etiquetado (^{1-13}C, sólo el primer átomo de carbono en la molécula de glucosa está marcada con ^{13}C; uniforme-^{13}C, todos los átomos de carbono son ^{13}C):

1. 80 %molar sin marcar, 20 %molar uniforme-^{13}C
2. 10 %molar sin marcar, 90 %molar uniforme-^{13}C
3. 90 %molar ^{1-13}C, 10 %molar uniforme-^{13}C
4. 40 %molar ^{1-13}C, 60 %molar uniforme-^{13}C

Los cultivos no marcados paralelos se desarrollaron por duplicado, de los cuales se tomaron muestras con frecuencia para evaluar la velocidad de crecimiento, velocidad de absorción de la glucosa y las velocidades de formación de subproductos. En la fase exponencial tardía, los cultivos se recopilaron etiquetados, la proteína fue aislada e hidrolizada a los aminoácidos y la distribución de etiquetas de los aminoácidos analizados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) como se describió previamente (Fischer y Sauer., Eur. J. Biochem. 270:880-891 (2003)). Además, la distribución de la etiqueta 4HB fue secretada y BDO en el caldo de los cultivos etiquetados se analizaron por GC-MS, como se describe en WO 2008115840. Estos datos se utilizan conjuntamente para el cálculo de la distribución del flujo intracelular usando métodos establecidos (Suthers et al., Metab. Eng. 9:387-405 (2007)). Los flujos metabólicos resultantes centrales e intervalos del 95% de confianza asociados se muestran en la Figura 46. Los

valores son los flujos molares normalizados a una velocidad de captación de glucosa de 1 mMol/h. El resultado indica que el flujo de carbono se encamina a través de la citrato sintasa en la dirección oxidativa y que la mayor parte del carbono entra en la ruta de BDO en lugar de completar el ciclo de Krebs. Además, se confirma esencialmente no hay flujo entre malato y oxaloacetato debido a la supresión MDH en esta cepa.

La ventaja de utilizar una cepa de eliminación tales como cepas diseñadas utilizando OptKnock para la producción de BDO (véase el documento WO 2009/023493 y publicación de E.U.A. 2009/0047719) se puede observar comparando los perfiles típicos de fermentación de ECKh-422 con la de la cepa original ECKh-138, en la que se produce BDO de succinato a través del ciclo de Krebs reductiva (ver Figura 47). Las fermentaciones se realizaron con un volumen de 1 litro de cultivo inicial en 2L Biostat B + biorreactores (Sartorius; Cedex Francia) utilizando medio mínimo M9 suplementado con 20 g/l de glucosa. La temperatura se controló a 37°C y el pH se controló a 7.0 utilizando 2 M NH_4OH o Na_2CO_3. Las células se cultivaron aeróbicamente a una DO600 de aproximadamente 10, en cuyo momento los cultivos fueron inducidos con IPTG 0.2 mM. Una hora después de la inducción, la velocidad de flujo de aire se redujo a 0.02 litros estándar por minuto para las condiciones

microaerófilas. La velocidad de agitación se fijó en 700 rpm. Glucosa concentrada se alimentó a mantener la concentración de glucosa en el recipiente de entre 0.5 y 10 g/L. Ambas cepas se transformaron con plásmidos que llevan toda la ruta de BDO, como en los ejemplos anteriores. En ECKh-138, acetato, piruvato y 4HB dominan la fermentación, mientras que con ECKh-422 BDO es el producto principal.

Ejemplo XVI

Expresión Cepas BDO de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

Este ejemplo describe el uso de carboxicinasa fosfoenolpiruvato (pepCK) para aumentar la producción de BDO. El gen de la gripe pepCK Haemophilus fue utilizado para la expresión heteróloga.

Computacionalmente, se demostró que la conversión de ATP de generación de oxaloacetato a fosfoenolpiruvato es necesaria para alcanzar el rendimiento máximo teórico de 1,4-butanodiol (véase también WO2008/115840, WO 2009/023493, publicación de E.U.A. 2009/0047719, publicación de E.U.A. 2009/0.075.351). La falta de actividad pepCK ha demostrado reducir el rendimiento máximo teórico de BDO en un 12% suponiendo condiciones anaeróbicas y un 3% suponiendo un aceptor de electrones externo tal como el nitrato o el oxígeno está presente.

En los organismos tales como Escherichia coli, pepCK opera en la dirección gluconeogénica y ATP consume de oxaloacetato hacia fosfoenolpiruvato. Se ha postulado que las limitaciones cinéticas de pepCK de E. coli impiden la catalización eficaz de la formación de oxaloacetato de PPE. PEP carboxilasa (PPC), que no genera ATP, pero se requiere para el crecimiento eficiente, es, naturalmente, utilizada por E. coli para formar oxaloacetato a partir de fosfoenolpiruvato. Por lo tanto, tres enzimas pepCK no nativas (Tabla 26) se ensayaron para determinar su capacidad para complementar el crecimiento de una cepa mutante de PPC de E. coli en medios de glucosa mínimos.

Tabla 26. Fuentes de las secuencias de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

Cepa de Fuente de PEPCK	No. De acceso, Secuencia de referencia de GenBank
Haemophilus influenza	NC_000907.1
Actinobacillus succinogenes	YP_001343536.1
Mannheimia succiniciproducens	YP_089485.1

Los estudios de crecimiento de complementación involucraron expresión basada en plásmido de los genes candidatos en appc mutante de E. coli JW3978 obtenidos a partir de la colección de Keio (Baba et al., Molecular

Systems Biology 2:2006.0008 (2006)). Los genes fueron clonados del promotor PAllacO-1 en los vectores de expresión pZA23 (copia media) y pZE13 (copia alta). Estos plásmidos se han descrito anteriormente (Lutz y Bujard, Nucleic Acids Res. 25:. 1203-1210 (1997)), y su uso en los genes de expresión de la ruta de BDO se ha descrito anteriormente en WO2008115840.

Los precultivos se desarrollaron aeróbicamente en un medio mínimo M9 con 4 g/L de glucosa. Todos los pre-cultivos fueron suplementados con aspartato (2 mM) para proporcionar los mutantes Δppc con una fuente para generar productos intermedios de ciclo TCA independientes de expresión pepCK. Los medios mínimos M9 también se utilizan en las condiciones de ensayo con 4 g/L de glucosa, pero sin aspartato y se añadió IPTG se añadió a 0.5 mM. La Tabla 27 muestra los resultados de los estudios de crecimiento de complementación.

Tabla 27. Complementación de los mutantes de Δppc con pepCK de H. influenzae, A. succinogenes y M. succinoproducens cuando se expresaron de vectores pZA23 o pZE13.

Cepa de fuente PEPCK	Vector	Tiempo (h)	OD_{600}
H.influenzae	pZA23BB	40	0.950
Δppc Control	pZA23BB	40	0.038
A.succinogenes	pZA23BB	40	0.055
M. succinoproducens	pZA23BB	40	0.214
A.succinogenes	pZE13BB	40	0.041
M. succinoproducens	pZE13BB	40	0.024
Δppc Control	pZE13BB	40	0.042

Se encontró que pepCK Haemophilus influenzae complementa el crecimiento de ΔPPC mutante de E. coli mejor entre los genes que fueron probados en el análisis, basado en el plásmido. Este gen se integró entonces en el sitio de PPC de tipo silvestre de E. coli (MG1655) utilizando el método de selección sacB contador con pRE118-V2 que se discutió anteriormente (Gay et al., J. Bacteriol. 153: 1424-1431 (1983)). pepCK se integró mantener el promotor nativo PPC de E. coli, pero usando el pepCK terminador no nativo. La secuencia de esta región siguiendo el reemplazo de PPC por pepCK de H. influenzae se muestra en la Figura 48. La región de codificación de pepCK está subrayada.

Las técnicas para la adaptación de la evolución se han aplicado para mejorar la velocidad de crecimiento de la E. coli mutante (ΔPPC :: H. pepCK inf). Medio mínimo M9 con 4 g/l de glucosa y bicarbonato de sodio 50 mM fue utilizada para la cultura y evolucionar esta cepa en un ambiente anaerobio. La alta concentración de bicarbonato de sodio se utiliza para conducir el equilibrio de la reacción para la formación de oxaloacetato de pepCK. Para mantener el crecimiento exponencial, el cultivo se diluyó dos veces cada vez que se logró un OD600 de 0.5. Después de cerca de 100 generaciones de más de 3 semanas de evolución adaptativa, las velocidades de crecimiento anaerobio mejora de alrededor de 8 horas a la de tipo silvestre, alrededor de 2 horas. Después de la evolución, las colonias individuales se aislaron y el crecimiento en anaerobios se comparó con la de la cepa mutante inicial y de tipo silvestre-(ver Figura 49). Se utiliza Medio M9 con 4 g/l de glucosa y 50 mM de bicarbonato de sodio.

El gen de la ppc/pepck procedimiento de sustitución se ha descrito anteriormente se repitió, esta vez utilizando las cepas productoras de BDO ECKh-432 (AadhE AldhA ApflB AlpdA :: KplpdA322 AMDH AarcA gltAR163L AackA fimD :: sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis fimD :: sucA de M. bovis, C. kluyveri 4hbd) y ECKh-439 como los anfitriones. Estas cepas contienen las mejoras del ciclo TCA

discutidos anteriormente, así como la ruta de corriente arriba integrado en el cromosoma. ECKh-439 es un derivado de ECKh-432 que tiene el gen ackA eliminado, que codifica la acetato quinasa. Esta supresión se realizó mediante el método contraselección de sacB descrito anteriormente.

La Δppc :: H. derivada de la pepCK ECKh m-439, llamado ECKh-453, se ha ejecutado en un proceso de fermentación. La ruta descendente BDO fue suministrada por pZS * 13 que contiene cat2 de P. gingivalis y ald de C. beijerinckii. Esto se realizó con un volumen de 1 litro de cultivo inicial en 2L Biostat B + biorreactores (Sartorius) utilizando medio mínimo M9 suplementado con 20 g/L de glucosa y 50 mM de $NaHCO_3$. La temperatura se controló a 37°C, y el pH se controló a 7.0 utilizando 2 M NH_4OH o Na_2CO_3. Las células se cultivaron aeróbicamente a una DO600 de aproximadamente 2, en cuyo momento los cultivos fueron inducidos con IPTG 0.2 mM. Una inducción hora siguiente, la tasa de flujo de aire se redujo a 0,01 litros estándar por minuto para las condiciones microaerófilas. La velocidad de agitación se fijó inicialmente en 700 rpm. La velocidad de aireación se aumentó gradualmente a lo largo de la fermentación a medida que aumentó la densidad de cultivo. La solución de glucosa concentrada se alimentó para mantener la concentración de glucosa en el recipiente de entre 0.5 y 10 g/L. El perfil de productos se muestra en la Figura 50. El fenotipo observado,

en el que BDO y acetato se producen en una proporción de aproximadamente uno a uno molar, que es muy similar a la predicha en el documento WO 2009/023493 para el diseño # 439 (ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, PFLi). La supresión dirigida la reacción ASPT se consideró innecesaria dado que es bajo el flujo natural a través de la aspartato-amoníaco-liasa.

Una característica clave de las cepas OptKnock es que la producción del metabolito de interés general, se acopla al crecimiento, y además, que la producción debe ocurrir durante el crecimiento exponencial, así como en la fase estacionaria. El potencial de crecimiento de acoplamiento ECKh-432 y ECKh-453 fue evaluado por el crecimiento en botellas microaeróbicas con muestreo frecuente durante la fase exponencial. El medio M9 que contiene 4 g/l de glucosa y cualquiera de 10 mM $NaHCO_3$ (para ECKh-432) o 50 mM $NaHCO_3$ (para ECKh-453) fue utilizado, y 0.2 mM IPTG se incluyó desde la inoculación. Se utilizaron agujas 18G para el crecimiento de ECKh-432microaerofílica, mientras que las agujas tanto 18G y 27G se ensayaron para ECKh-453. Las agujas de calibre más alto dan como resultado una menor aireación. Como se muestra en la Figura 51, ECKh-432 no comenzará a producir BDO hasta que se ha consumido 5 g/L de glucosa, que corresponde a la aparición de la fase estacionaria. ECKh-453 produce BDO más uniformemente a lo largo del experimento.

Además, el acoplamiento crecimiento mejora a medida que se reduce la aireación del cultivo.

Ejemplo XVII

Integración de los genes de codificación de ruta en sitios específicos de BDO de integración

Este ejemplo describe la integración de varios genes de la ruta de BDO en el sitio fimD para proporcionar expresión y estabilidad más eficiente.

La totalidad de la ruta BDO corriente arriba, conduciendo a 4HB, se ha integrado en el cromosoma de E. coli en el sitio fimD. La rama de succinato de la ruta de corriente arriba se integró en el cromosoma de E. coli utilizando el método de recombinación homóloga de λ rojo (Datsenko y Wanner, Proc. Natl.. Acad. E.U.A. 97:6640-6645 (2000)). La cepa receptora E. coli fue ECKh-422 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA :: KplpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L). Un fragmento de ADN policistrónico que contiene un promotor, el gen sucCD, el gen sucD y el gen 4hbd y una secuencia de terminación se insertó en el sitio Afl111 del plásmido pKD3. Los siguientes cebadores se utilizaron para amplificar el operón junto con el marcador de cloranfenicol a partir del plásmido. Las secuencias subrayadas son homólogas al sitio de inserción de destino.

5'-GTTTGCACGCTATAGCTGAGGTTGTTGTCTTCCAGCAACGTACCGTATACAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTC-3'(SEC ID NO :)

5'-GCTACAGCATGTCACACGATCTCAACGGTCGGATGACCAATCTGGCTGGTATGGGAATTAGCCATGGTCC-3' (SEC ID NO :)

Después del tratamiento de Dpnl y electroforesis de ADN, el producto de PCR purificado se utilizó para transformar la cepa E. coli que aloja el plásmido pKD46. La cepa candidato se selecciona en placas que contienen cloranfenicol. El ADN genómico de la cepa candidato se purificó. La secuencia de inserción se amplificó y se confirmó mediante secuenciación de ADN. El marcador resistente al cloranfenicol fue retirado de cromosoma por f-lipasa. La secuencia de nucleótidos de la región después de la inserción y extracción marcador se muestra en la Figura 52.

La rama de alfa-cetoglutarato de la ruta corriente arriba se integró en el cromosoma por recombinación homóloga. El plásmido utilizado en esta modificación se derivó a partir del vector pRE118-V2, como se indica en el Ejemplo XIV, que contiene un gen resistente a la kanamicina, un gen que codifica la levanosacarosa (sacB) y un ori de replicación condicional de R6K. La integración del plásmido también contuvo una secuencia policistrónico con un promotor, el gen sucA, el gen 4hbd de C. kluyveri y un terminador que se inserta entre dos fragmentos de ADN de 1.5 kb que son

homólogos a las regiones que flanquean el sitio de inserción de destino. El plásmido resultante se utilizó para transformar la cepa de E. coli. El candidato de integración se seleccionó en placas que contuvieron kanamicina. El sitio de integración correcta se verificó por PCR. Para resolver el marcador antibiótico a partir del cromosoma, se seleccionaron las células para el crecimiento en medio que contuvo sacarosa. La cepa final fue verificada por PCR y secuenciación del ADN. La secuencia de nucleótidos de la región cromosómica después de la inserción y extracción del marcador se muestra en la Figura 53.

La cepa de integración resultante corriente arriba ruta ECKh-432 se transformó con un plásmido que aloja los genes de la ruta en sentido descendente. La construcción fue capaz de producir BDO a partir de la glucosa en medio mínimo (véase la Figura 54).

Ejemplo XVIII

Uso de un sistema de absorción de sacarosa sin fosfotransferasa para Reducir la formación de subproductos de piruvato

Este ejemplo describe el uso de un sistema sin fosfotransferasa (PTS) de captación de sacarosa para reducir piruvato como un subproducto en la conversión de sacarosa a BDO.

Las cepas tratadas para el uso de sacarosa a través de un sistema de fosfotransferasa (PTS) para producir cantidades significativas de piruvato como subproducto. Por lo tanto, el uso de un sistema de sacarosa sin PTS puede utilizarse para disminuir la formación de piruvato debido a que la importación de sacarosa no estaría acompañada por la conversión de fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato. Esto aumentará la combinación de PEP y el flujo de oxalacetato a través de PPC o PEPCK.

Se llevó a cabo la inserción de un operón de sacarosa sin PTS en la región rrnC. Para generar un producto de PCR que contiene los genes de sacarosa sin PTS flanqueadas por regiones de homología con la región rrnC, dos oligos se utilizaron para amplificar por PCR los genes ESC a partir de Mach1™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Esta cepa es un descendiente de la cepa W que es una cepa de E. coli conocids por ser capax de catabolizar sacarosa (Orencio-Trejo et al., Biotecnología Biocombustibles 1:8 (2008)). La secuencia se deriva de la cepa de E. coli W KO11 (acceso AY314757) (Shukla et al., Biotechnol. Lett. 26:689-693 (2004)) e incluye genes que codifican una permeasa de sacarosa (CSCB), D-fructocinasa (cscK), hidrolasa sacarosa (cscA), y una LaCl relacionada con represor específico de sacarosa (cscR). Los primeros 53 aminoácidos de cscR fueron eliminados eficazmente por la colocación de un cebador AS. Las secuencias de los oligos

fueron: rrnC 23S del AS-CSC 5'-**TGT GAG TGA AAG TCA CCT GCC TTA ATA TCT CAA AAC TCA TCT TCG GGT GA**C GAA ATA TGG CGT GAC TCG ATA C-3 '(SEC ID NO :) y rrnC 23S del AS-CSC 5'-**TCT GTA TCA GGC TGA AAA TCT TCT CTC ATC CGC CAA AAC AGC TTC GGC GT**T AAG ATG CGC GCT CAA GGA C-3' (SEC ID NO :). Las secuencias subrayadas indican regiones de homología con el operón ESC, y la secuencia en negritas se refiere a una homología de secuencia corriente arriba y corriente abajo de la región rrnC. La secuencia de la totalidad del producto de PCR se muestra en la Figura 55.

Después de la purificación, el producto de PCR se electroporó en células MG1655 electrocompetentes que habían sido transformadas con Nivel Mín (tet) y preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Www.genebridges.com/gb/pdf/K001%20Q%20E%20BAC%20Modification%20Kit version2.6-2007-screen.pdf). El producto de PCR se diseña de manera que integrarse en el genoma en la región rrnC del cromosoma. Se suprimen eficazmente 191 nucleótidos corriente arriba de rrlC (23S ARNr), todo lo del gen ARNr rrlC y 3 nucleótidos corriente abajo de $_{RRL}$C y se reemplazó con el operón de sacarosa, como se muestra en la Figura 56.

Los transformantes se desarrollaron en medio de sales M9 mínimo con 0.4% de sacarosa y se probaron colonias individuales para determinar la presencia del operón sacarosa por PCR de diagnóstico. La región completa de rrnC :: crcAKB

se transfirió a la cepa huésped BDO ECKh-432 por la transducción PI (Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001), dando como resultado. ECKh-463 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA :: K:p.lpdA322 ΔMDH ΔarcA gltAR163L fimD :: sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis fimD :: sucA M. bovis, 4hbd C. kluyveri rrnC :: cscAKB). Los recombinantes se seleccionaron por crecimiento en sacarosa y se verificaron por PCR de diagnóstico.

ECKh-463 se transformó con pZS * 13 que contiene cat2 de P. gingivalis y ald de C. beijerinckii para proporcionar una ruta completa de BDO. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 (6.78 g/l Na_2HPO_4, 3.0 g/l KH_2PO_4, 0.5 g/l de NaCl, 1.0 g/l NH_4Cl, 1 mM de $MgSO_4$, 0.1 mM de $CaCl_2$) suplementado con 10 g/L de sacarosa. 0.2 mM IPTG estaba presente en el cultivo desde el principio. Las condiciones anaerobias se mantuvieron con una botella con una aguja 23G. Como control, ECKh-432 que contiene el mismo plásmido se cultivó en el mismo medio, excepto con 10 g/L de glucosa en lugar de sacarosa. La Figura 57 muestra la concentración de producto medio, normalizado a la cultura OD600, después de 48 horas de crecimiento. Los datos son para 6 cultivos replicados de cada cepa. Esto demuestra que la producción de BDO ECKh-463 sobre la sacarosa es similar a la de la cepa progenitora en sacarosa.

Ejemplo XIX

Resumen de cepas productoras de BDO

Este ejemplo describe diversas cepas productoras de BDO.

La Tabla 28 resume varias cepas productoras de BDO en los ejemplos descritos anteriormente XII-XVIII.

Cepa #	Cepa Huésped #	Cromosoma Huésped	Descripción de huésped	Basado en Plásmido
1		ΔldhA	Un solo derivado de supresión de *E. coli* MG1655	*E. coli* sucCD, *P. gingiva/is* sueD, *P. gingiva/is* 4hbd, *P. gingiva/is* Cat2, C. *acetobutylicum* AdhE2
2	AB3	ΔadhE ΔldhA ΔpflB	Cepa productora de succinato; derivado de; derivative of *E.*	*E. coli* sucCD, *P. gingiva/is* sueD, *P. gingiva/is* 4hbd, *P. gingiva/is* Cat2, C. *acetobutylicum* AdhE2
3	ECKh-138	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322	Mejora de lpdA para incrementar flujo de piruvato deshidrogenasa	*E. coli* sucCD, *P. gingiva/is* sueD, *P. gingiva/is* 4hbd, *P. gingiva/is* Cat2, C. *acetobutylicum* AdhE2
4	ECKh-138	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322		*E. coli* sucCD, *P. gingiva/is* sueD, *P. gingiva/is* 4hbd, C.
				acetobutylicum buk1, C. *acetobutylicum* ptb, C. *acetobutylicum*
5	ECKh-401	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δ1mdh ΔarcA	Supresiones en mdh y areA para dirigir flujo a través de ciclo oxidativo TCA	*E. coli* sucCD, *P. gingiva/is* sueD, *P. gingiva/is* 4hbd, *P. gingiva/is* Cat2, C. *acetobutylicum* AdhE2
6	ECKh-401	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA		*M. bovis* sucA, *E. coli* sucCD, *P. gingiva/is* sueD, *P. gingiva/is* 4hbd, *P. gingiva/is* Cat2, C. *acetobutylicum* AdhE2
7	ECKh-422	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L	Mutación en citrato sintasa para mejorar actividad anaerobia	*E. coli* sucCD, *P. gingiva/is* sueD, *P. gingiva/is* 4hbd, *P. gingiva/is* Cat2, C. *acetobutylicum* AdhE2

8	ECKh-422	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L		*M. bovis* sucA, *E. coli* sucCD, *P. gingiva/is* sueD, *P. gingiva/is* 4hbd, *P. gingiva/is* Cat2, C. *acetobutylicum* AdhE2
9	ECKh-422	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L		*M. bovis* sucA, *E. coli* sucCD, *P. gingiva/is* sueD, *P. gingiva/is* 4hbd, *P. gingiva/is* Cat2, C. *beijerinckii* Ald
10	ECKh-426	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: *E. coli* sucCD, *P. gingivalis* sueD, *P. gingivalis* 4hbd	Rama de succinato de ruta ascendente integrada en ECKh-422	*P. gingiva/is* Cat2, C. *beijerinckii* Ald
11	ECKh-432	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: *E. coli* sucCD, *P. gingivalis* sueD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: *sucA de M. bovis*, C. *kluyveri* 4hbd	Ramificaciones de ruta ascendente de succinato y alfa-cetoglutarato integradas en ECKh-422	*P. gingiva/is* Cat2, C. *beijerinckii* Ald
12	ECKh-432	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: *E. coli* sucCD, *P. gingivalis* sueD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: *sucA de M. bovis*, C. *kluyveri* 4hbd		C. *acetobutylicum* buk1, C. *acetobutylicum* ptb, C. *beijerinckii* Ald
13	ECKh-439	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L L1ackA fimD:: *E. coli* sucCD, *P. gingivalis* sueD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: *M. bovis* sucA, C. *kluyveri* 4hbd	Supresión de acetate cinasa de ECKh-432	*P. gingiva/is* Cat2, C. *beijerinckii* Ald
14	ECKh-453	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L L1ackA L1ppc::H.i.ppck fimD:: *E. coli* sucCD, *P. gingivalis* sueD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: *sucA de M. bovis*, C. *kluyveri* 4hbd	Supresión de acetate cinasa y reemplazo de PPC/PEPCK de ECKh-432	*P. gingiva/is* Cat2, C. *beijerinckii* Ald
15	ECKh-456	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::fnr-pflB6-K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: *E. coli* sucCD, *P. gingivalis* sueD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: *sucA de M. bovis*, C. *kluyveri* 4hbd	Reemplazo de promotor lpdA con promotor anaerobio ECKh-432	*P. gingiva/is* Cat2, C. *beijerinckii* Ald
16	ECKh-455	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA:: K.p.lpdA322 Δ1pdhR:: fnr-pflB6 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: *E. coli* sucCD, *P. gingivalis* sueD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: *sucA de M. bovis*, C. *kluyveri* 4hbd	Reemplazo de promotor pdhR y aceEF con promotor anaerobio en ECKh-432	*P. gingiva/is* Cat2, C. *beijerinckii* Ald

17	ECKh-459	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA:: K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: *E. coli* sucCD, *P. gingivalis* sueD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: *M. bovis* sucA, C. *kluyveri* 4hbd fimD:: C. *acetobutylicum* buk1, C. *acetobutylicum* ptb	Integración de BK/PTB en ECKh-432	C. *beijerinckii* Ald
18	ECKh-459	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA:: K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: *E. coli* sucCD, *P. gingivalis* sueD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: *M. bovis* sucA, C. *kluyveri* 4hbd fimD:: C. *acetobutylicum* buk1, C. *acetobutylicum* ptb		C. *beijerinckii* Ald, G. *thermoglucosidasius* adh1
19	ECKh-463	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: *E. coli* sucCD, *P. gingivalis* sueD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: *sucA de M. bovis*, C. *kluyveri* 4hbd rrnC::cscAKB	Benes de sacarosa PTS insertados en ECKh-432	*P. gingivallis* Cat2, C. *beijerinckii* Ald
20	ECKh-463	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: *E. coli* sucCD, *P. gingivalis* sueD, *P. gingivalis* 4hbd fimD:: *sucA de M. bovis*, C. *kluyveri* 4hbd rrnC::cscAKB		C. *acetobutylicum* buk1, C. *acetobutylicum* ptb, C. *beijerinckii* Ald

Las cepas resumidas en la Tabla 28 son las siguientes. Cepa 1: derivado de la eliminación sola de E. coli MG1655, con la supresión de idhA endógena; plásmido de expresión de sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd P. gingivalis, cat2 de P. gingivalis, AdhE2 de C. acetobutylicum. Cepa 2: cepa huésped AB3, una cepa de producción de succinato, derivado de E. coli MG1655, con supresiones de pflB adhesivo idhA endógena; plásmido de expresión de sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de

P. gingivalis, cat2 de P. gingivalis, AdhE2 de C. acetobutylicum.

Cepa 3: cepa huésped ECKh-138, la eliminación de adhesivos endógeno, idhA, pflB, la supresión de ipdA endógeno y la inserción cromosómica de ipdA de Kleibsiella pneumoniae con una mutación en el sitio Glu354Lys ipdA; plásmido de expresión de sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, P. 4hbd gingivalis, cat2 de P. gingivalis, AdhE2 de C. acetobutylicum, la tensión y proporciona la mejora de las ipdA para aumentar flujo de la piruvato deshidrogenasa. Cepa 4: la cepa huésped ECKh-138, la supresión de adhesivos endógenos, idhA, pflB e ipdA, la inserción cromosómica de ipdA de Kleibsiella pneumoniae con una mutación Glu354Lys; plásmido de expresión de sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis, bukI de C. acetobutylicum, ptb de C. acetobutylicum, AdhE2 de C. acetobutylicum.

Cepa 5: cepa huésped ECKh-401, la eliminación de adhesivos endógeno, idhA, pflB, la supresión de ipdA endógeno y la inserción cromosómica de ipdA de Kleibsiella pneumoniae con una mutación en el sitio Glu354Lys ipdA, la supresión de MDH endógena y el arcA; plásmido de expresión de sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis, cat2 de P. gingivalis, AdhE2 de C. acetobutylicum; la cepa tiene supresiones en el MDH y arcA de un flujo directo a través de ciclo TCA oxidativo. Cepa 6: cepa huésped ECKh-401, la

eliminación de adhesivos endógenos, idhA, pflB, la supresión de ipdA endógeno y la inserción cromosómica de ipdA de Kleibsiella pneumoniae con una mutación en el sitio Glu354Lys ipdA, la supresión de MDH endógena y el arcA; el plásmido de expresión de sucA de M. bovis, sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis, cat2 de P. gingivalis, AdhE2 de C. acetobutylicum.

Cepa 7: Host cepa ECKh-422, la eliminación de adhesivos endógeno, idhA, pflB, la supresión de ipdA endógeno y la inserción cromosómica de ipdA de Kleibsiella pneumoniae con una mutación en el sitio Glu354Lys ipdA, la supresión de MDH endógena y arcA, la sustitución cromosómica de gltA con gltA mutante Arg163Leu; plásmido de expresión de sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis, cat2 de P. gingivalis, AdhE2 de C. acetobutylicum; cepa tiene una mutación en la citrato sintasa para mejorar la actividad anaeróbica. La cepa 8: cepa ECKh-422, la eliminación de adhesivos endógeno, idhA, pflB, la supresión de ipdA endógeno y la inserción cromosómica de ipdA de Kleibsiella pneumoniae con una mutación en el sitio Glu354Lys ipdA, la supresión de MDH endógena y arcA, la sustitución cromosómica de gltA con gltA Arg163Leu mutante; plásmido de expresión de sucA de M. bovis, sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis, cat2 de P. gingivalis, AdhE2 de C. acetobutylicum. Cepa 9: cepa huésped ECKh-422, la eliminación

de adhesivos endógeno, idhA, pflB, la supresión de ipdA endógeno y la inserción cromosómica de ipdA de Kleibsiella pneumoniae con una mutación en el sitio Glu354Lys ipdA, la supresión de MDH endógena y arcA, la sustitución cromosómica de gltA con gltA mutante Argl63Leu; plásmido de expresión de sucA de M. bovis, sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis, cat2 de P. gingivalis, Ald de C. beijerinckii.

Cepa 10: cepa huésped ECKh-426, la eliminación de adhesivos endógeno, idhA, pflB, la supresión de ipdA endógeno y la inserción cromosómica de ipdA de Kleibsiella pneumoniae con una mutación en el sitio Glu354Lys ipdA, la supresión de MDH endógena y arcA, la sustitución cromosómica de gltA con gltA Argl63Leu mutante, la inserción en el sitio cromosómico fimD de sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis; plásmido de expresión de cat2 de P. gingivalis, ald de C. beijerinckii; la cepa tiene la rama ascendente de la ruta succinato integradA en la cepa ECKh -422 en el sitio fimD. cepa 11: cepa huésped ECKh-432, la eliminación de adhesivos endógeno, idhA, pflB, la supresión de ipdA endógeno y la inserción cromosómica de Klebsiella pneumoniae con una mutación de ipdA Glu354Lys en el sitio de ipdA, la supresión de MDH endógeno y arcA, la sustitución cromosómico de gltA con gltA Argl63Leu mutante, la inserción en el sitio cromosómico de fimD sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis,

4hbd P. gingivalis, inserción cromosómico en el fimD lugar de sucA de M. bovis, C. kluyveri 4hbd; plásmido de expresión de cat2 de P. gingivalis, Ald de C. beijerinckii; la cepa tiene ramas ascendentes de rutas de succinato y alfa-cetoglutarato integradas en ECKh-422. Cepa 12: cepa huésped ECKh-432, la eliminación de adhesivos endógeno, idhA, pflB, la supresión de ipdA endógeno y la inserción cromosómica de ipdA de Kleibsiella pneumoniae con una mutación en el sitio Glu354Lys ipdA, la supresión de MDH endógena y arcA, la sustitución cromosómica de gltA con gltA Argl63Leu mutante, la inserción en el sitio cromosómico fimD de sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis, la inserción en el sitio cromosómico fimD de sucA de M. bovis, 4hbd de C. kluyveri; plásmido de expresión de bukI de C. acetobutylicum, ptb de C. acetobutylicum, Ald de C. beijerinckii.

Cepa 13: cepa huésped ECKh-439, la eliminación de adhesivos endógenos, idhA, pflB, la supresión de ipdA endógeno y la inserción cromosómica de ipdA de Kleibsiella pneumoniae con una mutación en el sitio Glu354Lys ipdA, la supresión de MDH endógena y arcA, la sustitución cromosómica de gltA con gltA Argl63Leu mutante, la supresión de ackA endógeno, inserción cromosómica en el sitio fimD de sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis, la inserción en el sitio cromosómico fimD de sucA de M. bovis, 4hbd de C. kluyveri, expresión de plásmido de cat2 de P.

gingivalis, Ald de C. beijerinckii; la cepa tiene la eliminación de acetato quinasa en la cepa ECKh-432. Cepa 14: cepa huésped ECKh-453, la eliminación de adhesivos endógeno, idhA, pflB, la supresión de ipdA endógeno y la inserción cromosómica de ipdA de Kleibsiella pneumoniae con una mutación en el sitio Glu354Lys ipdA, la supresión de MDH endógena y arcA, la sustitución cromosómica de gltA con gltA Argl63Leu mutante, la supresión de ackA endógena, la supresión de ppc endógeno y la inserción de Haemophilus influenzae ppck en el sitio ppc, la inserción en el sitio cromosómico fimD de sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd P. gingivalis, la inserción cromosómica en la fimD lugar de sucA de M. bovis, 4hbd de C. kluyveri; plásmido de expresión de cat2 de P. gingivalis, Ald de C. beijerinckii; cepa tiene la eliminación de acetato quinasa y PPC/reemplazo de la pepCK en la cepa ECKh-432.

Cepa 15: cepa huésped ECKh-456, la eliminación de adhesivos endógeno, idhA, pflB, la supresión de ipdA endógeno y la inserción cromosómica de Klebsiella pneumoniae con una mutación de ipdA Glu354Lys en el sitio ipdA, la supresión de MDH endógeno y reemplazo arcA, mutante cromosómica de gltA con gltA Argl63Leu, la inserción en el sitio cromosómico de E. coli fimD sucCD, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis, la inserción cromosómica en el lugar fimD de sucA de M. bovis, 4hbd de C. kluyveri, la sustitución del promotor

ipdA en el sitio de unión fnr, promotor pflB-P6 y RBS de pflB; plásmido de expresión de cat2 de P. gingivalis, Ald de C. beijerinckii; la cepa tiene el reemplazo del promotor ipdA anaeróbico con el promotor en la cepa ECKh-432. La cepa 16: cepa huésped ECKh-455, la eliminación de adhesivos endógeno, idhA, pflB, la supresión de ipdA endógeno y la inserción cromosómica de ipdA de Kleibsiella pneumoniae con una mutación en el sitio Glu354Lys ipdA, la supresión de MDH endógena y arcA, la sustitución cromosómica de gltA con gltA Argl63Leu mutante, la inserción en el sitio cromosómico fimD de sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd P. gingivalis, la inserción en el sitio cromosómico fimD de sucA de M. bovis, 4hbdl de C. kluyveri, la sustitución del promotor pdhR y aceEF en el sitio de unión fnr, promotor pflB-P6 y RBS de pflB; plásmido de expresión de cat2 de P. gingivalis, Ald de C. beijerinckii; cepa tiene el reemplazo del promotor pdhR y aceEF con el promotor anaeróbica en ECKh-432.

Cepa 17: cepa huésped ECKh-459, la eliminación de adhesivos endógenos, idhA, pflB, la supresión de ipdA endógeno y la inserción cromosómica de ipdA de Kleibsiella pneumoniae con una mutación en el sitio Glu354Lys ipdA, la supresión de MDH endógena y arcA, la sustitución cromosómica de gltA con gltA Argl63Leu mutante, la inserción en el sitio cromosómico fimD de sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis,

4hbd P. gingivalis, la inserción en el sitio cromosómico fimD de sucA de M. bovis, C kluyveri 4hbd, la inserción en el sitio cromosómico fimD de bukI de C. acetobutylicum, ptb de C. acetobutylicum; plásmido de expresión de Ald de C. beijerinckii; cepa tiene la integración de BK/ptb en la cepa ECKh-432. La cepa 18: cepa huésped ECKh-459, la eliminación de adhesivos endógeno, idhA, pflB, la supresión de ipdA endógeno y la inserción cromosómica de ipdA de Kleibsiella pneumoniae con una mutación en el sitio Glu354Lys ipdA, la supresión de MDH endógena y arcA, la sustitución cromosómica de gltA con gltA Arg163Leu mutante, la inserción en el sitio cromosómico fimD de sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis, la inserción en el sitio cromosómico fimD de sucA de M. bovis, 4hbd de C. kluyveri, la inserción en el sitio cromosómico fimD de bukI de C. acetobutylicum, ptb de C. acetobutylicum; plásmido de expresión de Ald de C. beijerinckii, adhl de G. thermoglucosidasius.

Cepa 19: cepa huésped ECKh-463, la eliminación de adhesivos endógeno, idhA, pflB, la supresión de ipdA endógeno y la inserción cromosómica de ipdA de Kleibsiella pneumoniae con una mutación en el sitio Glu354Lys ipdA, la supresión de MDH endógena y arcA, la sustitución cromosómica de gltA con gltA Arg163Leu mutante, la inserción en el sitio cromosómico fimD de sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis, la inserción en el sitio cromosómico fimD de sucA

de M. bovis, 4hbd de C. kluyveri, la inserción en el sitio de la rrnC no PTS operón genes sacarosa sacarosa permeasa (CSCB), D-fructocinasa (cscK), sacarosa hidrolasa (cscA) y un LaCl relacionada con sacarosa-represor específico (cscR); plásmido de expresión de cat2 de P. gingivalis, ald C. beijerinckii; la cepa tiene los genes de sacarosa sin PTS insertados en la cepa ECKh-432. Cepa 20: cepa huésped ECKh-463 la eliminación de adhesivos endógenos, idhA, pflB, la supresión de ipdA endógeno y la inserción cromosómica de ipdA de Kleibsiella pneumoniae con una mutación en el sitio Glu354Lys ipdA, la supresión de MDH endógeno y ArcA, un reemplazo de los cromosomas de gltA con gltA mutante Argl63Leu, la inserción en el sitio cromosómico fimD de sucCD de E. coli, sucD de P. gingivalis, 4hbd de P. gingivalis, la inserción en el sitio cromosómico fimD de sucA de M. bovis, 4hbd de C. kluyveri, la inserción en el sitio rrnC del operón de sacarosa sin-PTS; plásmido de expresión de bukI de C. acetobutylicum, ptb de C. acetobutylicum, Ald de C. beijerinckii.

Además de las cepas productoras de BDO aquí descritas, incluyendo las descritas en la Tabla 28, se entiende que las modificaciones adicionales pueden ser incorporadas para aumentar la producción adicional de BDO y/o disminuir los subproductos indeseables. Por ejemplo, una cepa productora de BDO, o una cepa de la Tabla 28, puede

incorporar cepas eliminadoras adicionales para aumentar aún más la producción de BDO o disminuir un subproducto indeseable. Ejemplos de orificios ciegos se han descrito anteriormente (ver publicación de E.U.A. 2009/0047719). Tales cepas de eliminación incluyen, pero no se limitan a, ADHEr, NADH6; ADHEr, PPCK; ADHEr, SUCD4; ADHEr, ATPS4r; ADHEr, FUM; ADHEr, MDH; ADHEr, PFLi, PPCK; ADHEr, PFLi, SUCD4; ADHEr, ACKr, NADH6; ADHEr, NADH6, PFLi; ADHEr, ASPT, MDH; ADHEr, NADH6, PPCK; ADHEr, PPCK, THD2; ADHEr, ATPS4r, PPCK; ADHEr, MDH, THD2; ADHEr, FUM, PFLi; ADHEr, PPCK, SUCD4; ADHEr, GLCpts, PPCK; ADHEr, GLUDy, MDH; ADHEr, GLUDy, PPCK; ADHEr, FUM, PPCK; ADHEr, MDH, PPCK; ADHEr, FUM, GLUDy; ADHEr, FUM, HEX1; ADHEr, HEX1, PFLi; ADHEr, HEX1, THD2; ADHEr, FRD2, LDH_D, MDH; ADHEr, FRD2, LDH_D, ME2; ADHEr, MDH, POL, THD2; ADHEr, G6PDHy, MDH, THD2; ADHEr, PFLi, PPCK, THD2; ADHEr, ACKr, AKGD, ATPS4r; ADHEr, GLCpts, PFLi, PPCK; ADHEr, ACKr, ATPS4r, SUCOAS; ADHEr, GLUDy, PFLi, PPCK; ADHEr, ME2, PFLi, SUCD4; ADHEr, GLUDy, PFLi, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, LDH_D, SUCD4; ADHEr, FUM, HEX1, PFLi; ADHEr, MDH, NADH6, THD2; ADHEr, ATPS4r, MDH, NADH6; ADHEr, ATPS4r, FUM, NADH6; ADHEr, ASPT, MDH, NADH6; ADHEr, ASPT, MDH, THD2; ADHEr, ATPS4r, GLCpts, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, GLUDy, MDH; ADHEr, ATPS4r, MDH, PPCK; ADHEr, ATPS4r, FUM, PPCK; ADHEr, ASPT, GLCpts, MDH; ADHEr, ASPT, GLUDy, MDH; ADHEr, ME2, SUCD4, THD2; ADHEr, FUM, PPCK, THD2; ADHEr, MDH, PPCK, THD2; ADHEr, GLUDy, MDH, THD2;

ADHEr, HEXl, PFLi, THD2; ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH; ADHEr, ATPS4r, MDH, PGL; ADHEr, ACKr, FRD2, LDH_D; ADHEr, ACKr, LDH_D, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, FUM, GLUDy; ADHEr, ATPS4r, FUM, HEXl; ADHEr, ATPS4r, MDH, THD2; ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D; ADHEr, ATPS4r, MDH, PGDH; ADHEr, GLCpts, PPCK, THD2; ADHEr, GLUDy, PPCK, THD2; ADHEr, FUM, HEXl, THD2; ADHEr, ATPS4r, ME2, THD2; ADHEr, FUM, ME2, THD2; ADHEr, GLCpts, GLUDy, PPCK; ADHEr, ME2, PGL, THD2; ADHEr, G6PDHy, ME2, THD2; ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D, ME2; ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D, MDH; ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, PFLi; ADHEr, ATPS4r, GLCpts, NADH6, PFLi; ADHEr, ATPS4r, MDH, NADH6, PGL; ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH, NADH6; ADHEr, ACKr, FUM, GLUDy, LDH_D; ADHEr, ACKr, GLUDy, LDH_D, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH, THD2; ADHEr, ATPS4r, MDH, PGL, THD2; ADHEr, ASPT, G6PDHy, MDH, PYK; ADHEr, ASPT, MDH, PGL, PYK; ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, SUCOAS; ADHEr, ASPT, FUM, LDH_D, MDH; ADHEr, ASPT, LDH_D, MALS, MDH; ADHEr, ASPT, ICL, LDH_D, MDH; ADHEr, FRD2, GLUDy, LDH_D, PPCK; ADHEr, FRD2, LDH_D, PPCK, THD2; ADHEr, ACKr, ATPS4r, LDH_D, SUCD4; ADHEr, ACKr, ACS, PPC, PPCK; ADHEr, GLUDy, LDH_D, PPC, PPCK; ADHEr, LDH_D, PPC, PPCK, THD2; ADHEr, ASPT, ATPS4r, GLCpts, MDH; ADHEr, G6PDHy, MDH, NADH6, THD2; ADHEr, MDH, NADH6, PGL, THD2; ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, GLCpts, MDH; ADHEr, ATPS4r, GLCpts, MDH, PGL; ADHEr, ACKr, LDH_D, MDH, SUCD4.

La Tabla 29 muestra las reacciones de los genes correspondientes a ser eliminados de un organismo huésped tales como E. coli. El metabolito correspondiente a abreviaturas en la Tabla 29 se muestra en la Tabla 30.

Tabla 29. Los genes correspondientes a ser eliminados para evitar que ocurra una reacción particular en E. coli.

Abreviatura de Reacción	Estequiometría de Reacción *	Genes que codifican el catalizador de enzimas de cada reacción
ACKr	[c] : ac + atp <==> actp + adp	(b3115 o b2296 o b1849)
ACS	[c] : ac + atp + coa --> accoa + amp + ppi	b4069
ACt6	ac[p] + h[p] <==> ac[c] + h[c]	Sin gen asociado
ADHEr	[c] : etoh + nad <==> acald + h + nadh [c] : acald + coa + nad <==> accoa + h + nadh	(b0356 o b1478 o b1241) (b1241 o b0351)
AKGD	[c] : akg + coa + nad --> co2 + nadh + succoa	(b0116 y b0726

		y b0727)
ASNS2	[c] : asp-L + atp + nh4 --> amp + asn-L + h + ppi	b3744
ASPT	[c] : asp-L --> fum + nh4	b4139
ATPS4r	adp[c] + (4) h[p] + pi[c] <==> atp[c] + (3) h[c] + h2o[c]	(((b3736 y b3737 y b3738) y (b3731 y b3732 y b3733 y b3734 y b3735)) o ((b3736 y b3737 y b3738) y (b3731 y b3732 y b3733 y b3734 y b3735) y b3739))
CBMK2	[c] : atp + co2 + nh4 <==> adp + cbp + (2) h	(b0521 o b0323 o b2874)
EDA	[c] : 2ddg6p --> g3p + pyr	b1850
ENO	[c] : 2pg <==> h2o + pep	b2779
FBA	[c] : fdp <==> dhap + g3p	(b2097 o b2925 o b1773)
FBP	[c] : fdp + h2o --> f6p + pi	(b4232 o b3925)
FDH2	for[p] + (2) h[c] + q8[c] --> co2[c] + h[p] + q8h2[c] for[p] + (2) h[c] + mqn8[c] --> co2[c] + h[p] + mql8[c]	((b3892 y b3893 y b3894) o (b1474 y b1475 y b1476))
FRD2	[c] : fum + mql8 --> mqn8 + succ [c] : 2dmmql8 + fum --> 2dmmq8 + succ	(b4151 y b4152 y b4153 y b4154)
FTHFD	[c] : 10fthf + h2o --> for + h + thf	b1232
FUM	[c] : fum + h2o <==> mal-L	(b1612 o b4122 o b1611)
G5SD	[c] : glu5p + h + nadph --> glu5sa + nadp + pi	b0243
G6PDHy	[c] : g6p + nadp <==> 6pgl + h + nadph	b1852
GLCpts	glc-D[p] + pep[c] --> g6p[c] + pyr[c]	((b2417 y b1101 y b2415 y b2416) o (b1817 y b1818 y b1819 y b2415 y b2416) o (b2417 y b1621 y b2415 y b2416))
GLU5K	[c] : atp + glu-L --> adp + glu5p	b0242
GLUDy	[c] : glu-L + h2o + nadp <==> akg + h + nadph + nh4	b1761
GLYCL	[c] : gly + nad + thf --> co2 + mlthf + nadh + nh4	(b2904 y b2903 y b2905 y b0116)
HEX1	[c] : atp + glc-D --> adp + g6p + h	b2388
ICL	[c] : icit --> glx + succ	b4015
LDH_D	[c] : lac-D + nad <==> h + nadh + pyr	(b2133 o b1380)
MALS	[c] : accoa + glx + h2o --> coa + h + mal-L	(b4014 o b2976)
MDH	[c] : mal-L + nad <==> h + nadh + oaa	b3236

ME2	[c] : mal-L + nadp --> co2 + nadph + pyr	b2463
MTHFC	[c] : h2o + methf <==> 10fthf + h	b0529
NADH12	[c] : h + mqn8 + nadh --> mql8 + nad [c] : h + nadh + q8 --> nad + q8h2 [c] : 2dmmq8 + h + nadh --> 2dmmql8 + nad	b1109
NADH6	(4) h[c] + nadh[c] + q8[c] --> (3) h[p] + nad[c] + q8h2[c] (4) h[c] + mqn8[c] + nadh[c] --> (3) h[p] + mql8[c] + nad[c] 2dmmq8[c] + (4) h[c] + nadh[c] --> 2dmmql8[c] + (3) h[p] + nad[c]	(b2276 y b2277 y b2278 y b2279 y b2280 y b2281 y b2282 y b2283 y b2284 y b2285 y b2286 y b2287 y b2288)
PFK	[c] : atp + f6p --> adp + fdp + h	(b3916 o b1723)
PFLi	[c] : coa + pyr --> accoa + for	(((b0902 y b0903) y b2579) o (b0902 y b0903) o (b0902 y b3114) o (b3951 y b3952))
PGDH	[c] : 6pgc + nadp --> co2 + nadph + ru5p-D	b2029
PGI	[c] : g6p <==> f6p	b4025
PGL	[c] : 6pgl + h2o --> 6pgc + h	b0767
PGM	[c] : 2pg <==> 3pg	(b3612 o b4395 o b0755)
PPC	[c] : co2 + h2o + pep --> h + oaa + pi	b3956
PPCK	[c] : atp + oaa --> adp + co2 + pep	b3403
PRO1z	[c] : fad + pro-L --> 1pyr5c + fadh2 + h	b1014
PYK	[c] : adp + h + pep --> atp + pyr	b1854 o b1676)
PYRt2	h[p] + pyr[p] <==> h[c] + pyr[c]	Sin gen asociado
RPE	[c] : ru5p-D <==> xu5p-D	(b4301 o b3386)
SO4t2	so4[e] <==> so4[p]	(b0241 o b0929 o b1377 o b2215)
SUCD4	[c] : q8 + succ --> fum + q8h2	(b0721 y b0722 y b0723 y b0724)
SUCOAS	[c] : atp + coa + succ <==> adp + pi + succoa	(b0728 y b0729)
SULabc	atp[c] + h2o[c] + so4[p] --> adp[c] + h[c] + pi[c] + so4[c]	((b2422 y b2425 y b2424 y b2423) o (b0763 y b0764 y b0765) o (b2422 y b2424 y b2423 y b3917))
TAL	[c] : g3p + s7p <==> e4p + f6p	(b2464 o b0008)
THD2	(2) h[p] + nadh[c] + nadp[c] --> (2) h[c] + nad[c] + nadph[c]	(b1602 y b1603)
THD5	[c] : nad + nadph --> nadh + nadp	(b3962 o (b1602 y b1603))
TPI	[c] : dhap <==> g3p	b3919

Tabla 30. Nombres de metabolitos que corresponden a abreviaturas usadas en la Tabla 29.

Abreviatura de metabolito	Nombre de Metabolito
10fthf	10-Formiltetrahidrofolato
1pyr5c	1-Pirrolina-5-carboxilato
2ddg6p	2-Deshidro-3-desoxi-D-gluconato 6-fosfato
2dmmq8	2-Demetilmenaquinona 8
2dmmql8	2-Demetilmenaquinol 8
2pg	D-Glicerato 2-fosfato
3pg	3-Fosfo-D-glicerato
6pgc	6-Fosfo-D-gluconato
6pgl	6-fosfo-D-glucono-1,5-lactona
ac	Acetato
acald	Acetaldehído
accoa	Acetil-CoA
actp	Acetil fosfato
adp	ADP
akg	2-Oxoglutarato
amp	AMP
asn-L	L-Asparagina
asp-L	L-Aspartato
atp	ATP
cbp	Carbamoil fosfato
co2	CO2
coa	Coenzima A
dhap	Dihidroxiacetona fosfato
e4p	D-Eritrosa 4-fosfato
etoh	Etanol
f6p	D-Fructosa 6-fosfato
fad	Flavina adenina dinucleotido oxidado
fadh2	Flavin adenina dinucleotido reducido
fdp	D-Fructosa 1,6-bisfosfato
for	Formato
fum	Fumarato
g3p	Gliceraldehído 3-fosfato
g6p	D-Glucosa 6-fosfato
glc-D	D-Glucosa
glu5p	L-Glutamato 5-fosfato
glu5sa	L-Glutamato 5-semialdehído
glu-L	L-Glutamato
glx	Glioxilato

gly	Glicina
h	H+
h2o	H2O
icit	Isocitrato
lac-D	D-Lactato
mal-L	L-Malato
methf	5,10-Meteniltetrahidrofolato
mql8	Menaquinol 8
mqn8	Menaquinona 8
nad	Nicotinamida adenina dinucleotido
nadh	Nicotinamida adenina dinucleotido - reducido
nadp	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
nadf	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato - reducido
nh4	Amonio
oaa	Oxaloacetato
pep	Fosfoenolpiruvato
pi	Fosfato
ppi	Difosfato
pro-L	L-Prolina
Pyr	Piruvato
q8	Ubiquinona-8
q8h2	Ubiquinol-8
5p-D	D-Ribuloso 5-fosfato
s7p	Sedoheptulosa 7-fosfato
so4	Sulfato
succ	Succinato
succoa	Succinil-CoA
thf	5,6,7,8-Tetrahidrofolato
xu5p-D	D-Xilulosa 5-fosfato

Ejemplo XX

Rutas ilustrativas para Producir BDO

Este ejemplo describe las rutas ilustrativas para producir 4-hidroxibutanal (4-HBal) y/o BDO utilizando una ácido carboxílico reductasa como una enzima de la ruta de BDO.

Una ruta ilustrativa para la producción de BDO incluye el uso de un NAD + o NADP + aril-aldehído-deshidrogenasa (E.C.: 1.2.1.29 y 1.2.1.30) para convertir 4-hidroxibutirato a 4-hidroxibutanal y un alcohol deshidrogenasa para convertir 4-hidroxibutanal a 1,4-butanodiol. 4-hidroxibutirato se puede derivar de los intermediarios del ciclo de ácidos tricarboxílicos succinil-CoA y/o alfa-cetoglutarato como se muestra en la Figura 58.

Arilo-aldehído deshidrogenasa (o ácido carboxílico reductasa). Un aldehído aril-deshidrogenasa, o equivalentemente una ácido carboxílico reductasa, se pueden encontrar en Nocardia iowensis. El ácido carboxílico reductasa cataliza el magnesio, reduce ácidos carboxílicos ATP y NADPH dependientes a sus aldehídos correspondientes (Venkitasubramanian et al., J. Biol. Chem. 282:478-485 (2007)) y es capaz de catalizar la conversión de 4-hidroxibutirato a 4-hidroxibutanal. Esta enzima, codificada por car, fue clonada y expresada funcionalmente en E. coli (Venkitasubramanian et al., J. Biol. Chem. 282:478-485 (2007)). La expresión de la actividad del producto del gen NPT mejorada de la enzima a través de la modificación post-transcripcional. El gen npt codifica una fosfopanteteína transferasa (PPTasa) específica que convierte la apo-enzima inactiva a la holo-enzima activa. El sustrato natural de esta

enzima es ácido vinílico y la enzima exhibe una amplia aceptación de sustratos aromáticos y alifáticos (Venkitasubramanian et al., en Biocatalisis enIndustrias Farmacética y Biotecnología, ed. RN Patel, capítulo 15, págs. 425-440, CRC Press LLC, Boca Raton, FL. (2006)).

Nombre de gen	**GI No.**	No. de Acceso de GenBank	Organismo
car	40796035	AAR91681.1	*Nocardia iowensis* (sp. NRRL 5646)
npt	114848891	ABI83656.1	*Nocardia iowensis* (sp. NRRL 5646)

Los genes adicionales car y npt pueden ser identificados sobre la base de homología de secuencia.

Nombre de gen	**GI No.**	No. de Acceso de 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*

Un candidato dee enzima adicional encontrado en Streptomyces griseus está codificado por los genes griC y griD. Se cree que esta enzima convierte 3-amino-4-hidroxibenzoico a 3-amino-4-hidroxibenzaldehído como supresión de cualquiera de griC o griD conduce a la acumulación de extracelular ácido 3-acetilamino-4-hidroxibenzoico, un producto de derivación de metabolismo de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico (Suzuki et al., J. Antibiot. 60 (6) :380-387 (2007)). Co-expresión de Gric y la rejilla con SGR_665, una enzima similar en la secuencia en el npt de Nocardia iowensis, puede ser benéfico.

Nombre de gen	**GI No.**	No. de Acceso de GenBank	Organismo
griC	182438036	YP_001825755.1	*Streptomyces griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350
griD	182438037	YP_001825756.1	*Streptomyces griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350

Una enzima con características similares, alfa-aminoadipato reductasa (AAR, EC 1.2.1.31), participa en la biosíntesis de la lisina en las rutas de algunas especies de hongos. Esta enzima reduce naturalmente alfa-aminoadipato al semialdehído alfa-aminoadipato. El grupo carboxilo se activa por primera vez a través de la formación dependiente de ATP de una adenilato que se reduce entonces por NAD(P)H para dar el aldehído y AMP. Como CAR, esta enzima utiliza magnesio y requiere la activación de un PPTasa. Los candidatos enzimáticos para AAR y su PPTasa correspondiente se encuentran en Saccharomyces cerevisiae (Morris et al., Gene 98: 141-145 (1991)), Candida albicans (Guo et al., Mol. Genet. Genómica 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 expresa en E. coli (Guo et al., 21 de levadura: 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 el P. chrysogenum PPTasa no ha sido identificado hasta la fecha.

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

Hay varias ventajas por el uso del ácido carboxílico reductasa para producción de BDO. Hay al menos dos ventajas de formar 4-hidroxibutanal partir de 4-hidroxibutirato a través de un ácido carboxílico reductasa en comparación con la formación de 4-hidroxibutanal de una versión activa de 4-hidroxibutirato (por ejemplo, 4-hidroxibutiril-CoA, 4-hidroxibutiril-Pi) a través de una acil-CoA acil-fosfato reductasa. En primer lugar, la formación de gamma-butirolactona (GBL) como un subproducto se reduce considerablemente. Se cree que las versiones activadas de 4-hidroxibutirato se ciclizan a GBL más fácilmente que 4-hidroxibutirato no activado. El uso del ácido carboxílico reductasa elimina la necesidad de pasar a través de un 4-hidroxibutirato intermedio libre activado, reduciendo así la formación de GBL como un subproducto que acompaña a la producción de BDO. En segundo lugar, la formación de etanol como un subproducto se reduce considerablemente. El etanol se forma a menudo en cantidades variables, cuando un aldehído o un formador de alcohol de 4-hidroxibutiril-CoA reductasa se

utiliza para convertir 4-hidroxibutiril-CoA a 4-hidroxibutanal o 1,4-butanodiol, respectivamente. Esto se debe a que la mayoría, si no es que todos, aldehído o 4-hidroxibutiril-CoA reductasa formador de alcohol puede aceptar acetil-CoA como sustrato, además de 4-hidroxibutiril-CoA. Las enzimas formadoras de aldehídos, por ejemplo, a menudo catalizan la conversión de acetil-CoA a acetaldehído, que luego se reduce a etanol por alcohol deshidrogenasas nativas o no nativas. Las 4-hidroxibutiril-CoA reductasas formadoras de alcohol que aceptan acetil-CoA como un sustrato convierten acetil-CoA directamente al etanol. Parece que las enzimas de ácidos carboxílicos reductasas tienen actividad mucho menos en enzimas acetil-CoA o acil-CoA-aldehído reductasa formadoras de alcohol y por lo tanto su aplicación producción de BDO da como resultado la formación mínima de subproducto etanol (véase más adelante).

Ejemplo XXI

Biosíntesis de 1,4-butanodiol usando una enzima de ácido carboxílico reductasa

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano que produce 1,4-butanodiol mediante una enzima de ácido carboxílico reductasa.

Escherichia coli se utiliza como un organismo diana para diseñar la ruta para el 1,4-butanodiol síntesis descrita

en la Figura 58. E. coli proporciona un buen huésped para la generación de un microorganismo de origen no natural capaz de producir 1,4-butanodiol. E. coli es susceptible de manipulación genética y se sabe que es capaz de producir varios productos, como el etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, y ácido succínico, efectivamente bajo las condiciones de oxigenación diferentes.

Integración de genes de la ruta 4-hidroxibutirato en Cromosoma: Construcción de ECKh-432. La enzima ácido carboxílico reductasa se expresó en una cepa de E. coli designados ECKh-432, cuya construcción se describe en el Ejemplo XVII. Esta cepa contuvo los componentes de la ruta de BDO, que conduce a 4HB, integrado en el cromosoma de E. coli en el sitio fimD.

Como se describió en el Ejemplo XVII, la rama succinato de la ruta de corriente arriba se integró en el cromosoma de E. coli utilizando el método de recombinación homóloga λ rojo (Datsenko y Wanner, Proc. Natl. Acad. E.U.A. 97:6640-6645 (2000)). Un fragmento de ADN policistrónico que contiene un promotor, el gen sucCD de E. coli que codifica succinil-CoA ligasa, la codificación del gen de sucD de succinil-CoA reductasa de Porphyromonas gingivalis (aldehído formador) (paso A de la Figura 58), el gen de codificación 4hbd Porphyromonas gingivalis 4-hidroxibutirato

deshidrogenasa (paso C de la Figura 58), y una secuencia de terminación se insertó en el sitio Afllll del plásmido PKD3.

Como se describió en el Ejemplo XVII, la rama alfa-cetoglutarato de la ruta corriente arriba se integró en el cromosoma por recombinación homóloga. El plásmido utilizado en esta modificación fue pRE118-V2 (pRE118 (ATCC87693) eliminada de secuencias oriT e IS), que contiene un gen resistente a la kanamicina, un gen que codifica la levanosacarosa (sacB) y una replicación condicional ori R6K. La integración del plásmido también contuvo una secuencia policistrónica con un promotor, el gen sucA de Mycobacterium bovis que codifica alfa-cetoglutarato descarboxilasa (paso B de la Figura 58), el gen de Clostridium kluyveri que codifica 4hbd de 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (paso C de la Figura 58) y un terminador que se inserta entre dos fragmentos de ADN de 1.5 kb que son homólogas a las regiones flanqueadas de la inserción del sitio destino. El plásmido resultante se utilizó para transformar la cepa de E. coli. El candidato integración se seleccionó en placas que contuvon kanamicina. El sitio de integración correcta se verificó por PCR. Para resolver el marcador antibiótico a partir del cromosoma, se seleccionaron las células para el crecimiento en medio que contuvo sacarosa. La cepa final fue verificada por PCR y secuenciación del ADN.

La cepa receptora E. coli fue ECKh-422 (ΔadhE ΔldhA ΔpfiB ΔlpdA :: K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L) cuya construcción se describe en el Ejemplo XV. ECKh-422 contiene una mutación que conduce a insensibilidad de NADH de gltAR163L del citrato sintasa codificado por gltA. Que contiene además una versión gen ipdA insensible a NADH Klebsiella pneumoniae integrado en el cromosoma como se describe a continuación.

La sustitución de ipdA nativo fue reemplazada con un ipdA NADH-insensible de Klebsiella pneumonie, como se describe en el Ejemplo XIV. El vector resultante se designó pRE118-V2 (véase Figura 34).

Clonación y expresión de ácido carboxílico reductasa y PPTasa. Para generar una cepa de E. coli modificada para producir 1,4-butanodiol, ácidos nucleicos que codifican una ácido carboxílico reductasa y fosfopanteteína transferasa se expresan en E. coli usando técnicas de biología molecular bien conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook, supra, 2001; Ausubel supra, 1999). En particular, los genes car (AAR91681.1) y npt (ABI83656.1) fueron clonados en los vectores pZS * 13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el promotor PA1/lacO. El gen car (GNM_720) fue clonado por PCR a partir de ADN genómico de Nocardia. Su ácido

nucleico y las secuencias de proteínas se muestran en las Figuras 59A y 59B, respectivamente.

Una versión optimizada con codón del gen NPT (GNM_721) se sintetizó por GeneArt (Regensburg, Alemania). Su ácido nucleico y las secuencias de proteínas se muestran en las Figuras 60A y 60B, respectivamente. El vector resultante de la clonación y GNM_720 GNM_721 en pZS * 13 se muestra en la Figura 61.

El plásmido se transformó en ECKh-432 para expresar las proteínas y enzimas requeridas para producción de 1,4-butanodiol. También se construyeron versiones alternativas que contienen el plásmido sólo GNM_720 GNM_721.

Demostración de la producción de 1,4-BDO con ácido carboxílico reductasa. Expresión funcional de la ruta 1,4-butanodiol se demostró usando E. coli entero de cultivo celular. Una sola colonia de E. coli ECKh-432 transformada con el plásmido pZS * 13 que contiene tanto GNM_720 y GNM_721 se inoculó en 5 ml de medio LB que contiene los antibióticos apropiados. De manera similar, las colonias individuales de E. coli ECKh-432 transformadas con los plásmidos pZS * 13 que contienen cualquiera de GNM_720 o GNM_721 fueron inoculados en alícuotas adicionales de 5 ml de medio LB que contienen los antibióticos apropiados. Los cultivos micro-aeróbicos de diez ml se inició mediante la inoculación en un medio fresco

de conversión mínima in vivo (véase más adelante) que contiene los antibióticos apropiados con 1% de los primeros cultivos.

La receta medio de conversión mínimo in vivo (por 1000 ml) es como sigue:

	concentración final
MOPS/KOH 1M solución reguladora	40 mM
La glucosa (40%)	1%
10XM9 sales de la solución	1X
MgS04 (1 M)	1 mM
minerales traza (x1000)	1X
1M $NaHCO_3$	10 mM

Se establecieron condiciones microaerobias establecidas por lavado inicialmente cubiertas de anaerobios con nitrógeno durante 5 minutos, luego perforan el diafragma con una aguja 18G de inoculación siguiente. La aguja se mantiene en la botella durante el crecimiento para permitir que se introduzca una pequeña cantidad de aire a las botellas. La expresión de proteínas se indujo con IPTG 0.2 mM cuando el cultivo alcanzó a mediados de registro de fase de crecimiento. Se considera: tiempo = 0 hr. Los sobrenadantes de cultivo se analizaron para BDO, 4HB y otros subproductos como los descritos anteriormente y en WO2008115840 (véase la Tabla 31).

Tabla 31. Producción de BDO, 4-HB y otros productos en varias cepas.

				mM						
Cepa	pZS*13S	OD600	OD600	PA	SA	LA	4HB	BDO	GBL	$ETOH_{Emx}$
ECKh-432	720	0.420	2.221	6.36	0.00	0.10	7.71	3.03	0.07	>LLOQ
ECKh-432	721	0.323	2.574	1.69	0.00	0.00	12.60	0.00	0.00	>LLOQ
ECKh-432	720/721	0.378	2.469	1.70	0.00	0.01	4.23	9.16	0.24	1.52

PA = piruvato, SA = succinato, LA = lactato, 4HB = 4-hidroxibutirato, BDO = 1,4-butanodiol, GBL = gamma-butirolactona, EtOH = etanol, LLOQ = límite inferior de cuantificación

Estos resultados demuestran que el gen ácido carboxílico reductasa, GNM_720, se requiere para la formación de BDO en ECKh-432 y su eficacia se incrementa cuando se co-expresada con la PPTasa, GNM_721. GBL y etanol fueron producidos en cantidades mucho más pequeñas que BDO en las cepas que expresan GNM_720 por sí mismo o en combinación con GNM_721.

Rutas adicionales para BDO emplean ácido carboxílico reductasa. Se espera que ácido carboxílico reductasa puede funcionar como un componente de muchos caminos a 1,4-butanodiol a partir de los metabolitos del ciclo TCA: succinato, succinil-CoA y alfa-cetoglutarato.

Varias de estas rutas se describen en la Figura 62. Todas las rutas pueden conducir a rendimientos teóricos BDO mayores o iguales a 1 mol/mol asumiendo la glucosa como fuente de carbono. Se pueden obtener rendimientos teóricos similares altos a partir de sustratos adicionales, incluyendo sacarosa, xilosa, arabinosa, gas de síntesis, entre muchos otros. Se espera que la expresión del ácido carboxílico reductasa solo o en combinación con PPTasa (es decir, para catalizar pasos F y D de la Figura 62) es suficiente para la producción 1,4-butanodiol de succinato siempre que esté presente suficiente actividad de alcohol deshidrogenasa endógena para catalizar los pasos C y E de la Figura 62. Las enzimas candidatos para los pasos de la A a la Z de la Figura 62 se describe en la sección XXIII.

Ejemplo XXII

Rutas hacia la putrescina que emplean ácido carboxílico reductasa

Este ejemplo describe las rutas ilustrativas de putrescina utilizando ácido carboxílico reductasa.

La putrescina, también conocida como 1,4-diaminobutano o butanodiamina, es un compuesto químico orgánico de la fórmula NH_2 (CH_2) $4NH_2$. Se puede hacer reaccionar con ácido adípico para dar la poliamida de Nylon-4,6, que es comercializada por DSM (Heerlen, Países Bajos)

bajo el nombre comercial Stanyl™. La putrescina es producida naturalmente, por ejemplo, por la descomposición natural de los aminoácidos en los organismos vivos y muertos. E. coli ha sido diseñada para producir putrescina por la sobreexpresión de la maquinaria biosintética de la ornitina nativa, así como un ornitina descarboxilasa (Qian, et al., Biotechnol. Bioeng. 104 (4) :651-662 (2009)).

La Figura 63 describe una serie de rutas de biosíntesis adicional que conduzcan a la producción de putrescina de succinato, succinil-CoA, o alfa-cetoglutarato y empleando una ácido carboxílico reductasa. Nótese que ninguna de estas rutas requieren la formación de una versión activa de 4-aminobutirato tal como 4-aminobutiril-CoA, que puede reducirse mediante un acil-CoA reductasa a 4-aminobutanal pero también fácilmente puede ciclarse a su lactama, 2-pirrolidinona (Ohsugi, et al., J. Biol. Chem. 256:7642-7651 (1981)). Todas las rutas pueden conducir a rendimientos teóricos de putrescina mayores o iguales a 1 mol/mol asumiendo la glucosa como fuente de carbono. Similares altos rendimientos teóricos se puede obtener a partir de sustratos adicionales, incluyendo sacarosa, xilosa, arabinosa, gas de síntesis, entre muchos otros. Enzimas candidatos para los pasos de la A a U de la figura 63 se describen en el Ejemplo XXIII.

Ejemplo XXIII

Las enzimas ilustrativas para la producción de compuestos C4

Este ejemplo describe enzimas ilustrativas para la producción de compuestos de C4 tales como 1,4-butanodiol, 4-hidroxibutanal y putrescina.

Clases de enzimas. Todas las transformaciones se muestran en las Figuras 58, 62 y 63 dentro de las categorías generales de transformaciones que se muestran en la Tabla 32. Este ejemplo describe un número de genes caracterizados bioquímicamente en cada categoría. Los genes específicamente enumerados pueden ser aplicados para catalizar las transformaciones adecuadas en las Figuras 58, 62 y 63 cuando se clonan y expresan. Los tres primeros dígitos de cada etiqueta se corresponden con los tres primeros dígitos del número de enzimas de la Comisión que denotan el tipo general de la transformación independiente de la especificidad por el sustrato.

Tabla 32. Las clases de las transformaciones enzimáticas representadas en las Figuras 58, 62 y 63.

ETIQUETA	FUNCION
1.1.1.a	Oxidoreductasa (oxo a alcohol)
1.1.1.c	Oxidoreductasa (paso 2, acil-CoA a alcohol)
1.2.1.b	Oxidoreductasa (acil-CoA a aldehido)
1.2.1.c	Oxidoreductasa (ácido 2-oxo a acil-CoA, descarboxilación
1.2.1.d	Oxidoreductasa (fosfonato reductasa)
1.2.1.e	Acido reductasa
1.4.1.a	Oxidoreductasa (aminación)
2.3.1.a	Aciltransferasa (transfiere grupo fosfato a CoA)
2.6.1.a	Aminotransferasa
2.7.2.a	Fosfotransferasa (acceptor carboxi)
2.8.3.a	CoA transferasa
3.1.2.a	CoA hydrolasa
4.1.1.a	Carboxi-liasa
6.2.1.a	CoA sintetasa

1.1.1.a Oxidorreductasa (oxo al alcohol)

Aldehído al alcohol. Tres transformaciones descritas en las Figuras 58, 62 y 63 implican la conversión de un aldehído con el alcohol. Estos son 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (paso C, las Figuras 58 y 62), 1,4-butanodiol deshidrogenasa (paso E, Figuras 58 y 62) y 5-hidroxi-2-pentanoico (paso Y, Figura 62). Los genes ilustrativos que codifican enzimas que catalizan la conversión de un aldehído con el alcohol, es decir, la alcohol deshidrogenasa o equivalentemente aldehído reductasa, incluyen aire A que codifica un alcohol deshidrogenasa de cadena media para C2-

C14 (Tani et al., Appl. Environ. Microbiol. 66 :5231-5235 (2000)), ADH2 de Saccharomyces cerevisiae (Atsumi et al., Nature 451 :86-89 (2008)), yqhD de E. coli, que tiene preferencia por moléculas ya que C(3) (Sulzenbacher et al., J. Mol. Biol. 342:489-502 (2004)) y BDH I y BDH II de C. acetobutylicum, que convierte butyryaldehyde en butanol (Walter et al., J. Bacteriol. 174:7149-7158 (1992)). Las secuencias de proteínas de cada uno de los productos de los genes ilustrativos se pueden encontrar con los siguientes números de acceso de GenBank:

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
alrA	BAB12273.1	9967138	*Acinetobacter* sp. Strain M-1
ADH2	NP_014032.1	6323961	*Saccharymyces cerevisiae*
yqhD	NP_417484.1	16130909	*Escherichia coli*
bdh I	NP_349892.1	15896543	*Clostridium acetobutylicum*
bdh II	NP_349891.1	15896542	*Clostridium acetobutylicum*

Las enzimas que exhiben actividad de 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (EC 1.1.1.61) también entran en esta categoría. Estas enzimas se han caracterizado en Ralstonia eutropha (Bravo et al., J. Ciencia Forense. 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 a 41556 (2003)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
4hbd	YP_726053.1	113867564	*Ralstonia eutropha* H16
4hbd	EDK35022.1	146348486	*Clostridium kluyveri* DSM 555
4hbd	Q94B07	75249805	*Arabidopsis thaliana*

El gen de adh1 de Geobacillus thermoglucosidasius M10EXG (Jeon y otros, J. Biotechnol. 135: 127-133 (2008)) se demostró que exhiben una alta actividad tanto en 4-hidroxibutanal como butanal (véase antes). Por lo tanto, esta enzima exhibe actividad de 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
adh1	AAR91477.1	40795502	*Geobacillus thermoglucosidasius M10EXG*

Otra enzima ilustrativa es isobutirato 3-hidroxi-deshidrogenasa, que cataliza la oxidación reversible de 3-hidroxiisobutirato de metilo a semialdehído metilmalonato. Esta enzima participa en la degradación de valina, leucina e isoleucina y ha sido identificado en bacterias, eucariotas, y mamíferos. La enzima codificada por P84067 de Thermus thermophilus HB8 se ha caracterizado estructuralmente (Lokanath et al., J. Mol. Biol. 352:905-17 (2005)). La reversibilidad de la 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa humana se demostró usando sustrato isotópicamente marcado con (Manning et al., Biochem. J. 231:481-484 (1985)). Genes adicionales que codifican esta enzima incluyen 3hidh en el

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 y otros, J. Chem. Soc. [Perkin 1] 6: 1404-1406 (1979); Chowdhury et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 67:438-441 (2003); Chowdhury et al., Biochem. Biosci. Biotechnol. 60:2043-2047 (1996)).

Gen	Acceso No.	GI No.	Organismo
P84067	P84067	75345323	*Thermus thermophilus*
mmsb	P28811.1	127211	*Pseudomonas aeruginosa*
dhat	Q59477.1	2842618	*Pseudomonas putida*
3hidh	P31937.2	12643395	*Homo sapiens*
3hidh	P32185.1	416872	*Oryctolagus cuniculus*

Varios 3-hidroxiisobutirato de enzimas deshidrogenasa también se han mostrado para convertir semialdehído malónico a ácido hidroxipropionico 3-(3-HP). Tres genes candidatos que presentan esta actividad son MMSB de Pseudomonas aeruginosa PA01 (62), MMSB de Pseudomonas putida KT2440 (Liao et al., Publicación de E.U.A. 2005/0221466) y MMSB de Pseudomonas putida E23 (Chowdhury et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 60:2043-2047 (1996)). Una enzima con 3-hidroxibutirato deshidrogenasa actividad en Alcaligenes faecalis M3A también ha sido identificado (Gokam

et al., Patente de E.U.A. No. 7,393,676; Liao et al., E.U.A. Publicación No. 2005/0221466). Los candidatos adicionales de genes de otros organismos, incluyendo spaeroides Rhodobacter puede ser inferida por la similitud de secuencias.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
mmsB	AAA25892.1	151363	*Pseudomonas aeruginosa*
mmsB	NP_252259.1	15598765	*Pseudomonas aeruginosa* PAO1
mmsB	NP_746775.1	26991350	*Pseudomonas putida* KT2440
mmsB	JC7926	60729613	*Pseudomonas putida* E23
orfB1	AAL26884	16588720	*Rhodobacter spaeroides*

La conversión de semialdehído malónico a 3-HP también puede llevarse a cabo por dos otras enzimas, dependiente de NADH deshidrogenasa 3-hidroxipropionato y dependiente de NADPH malonato semialdehído reductasa. Un dependiente de NADH de 3-hidroxipropionato deshidrogenasa se cree que participan en la biosíntesis de las rutas de la beta-alanina a partir del propionato en bacterias y plantas (Rathinasabapathi, J. Patología Vegetal 159:671-674 (2002); Stadtman, J. Am. Chem. Soc. 77:5765-5766 (1955)). Esta enzima no se ha asociado con un gen en cualquier organismo hasta la fecha. Malonato semialdehído reductasa NADPH-dependiente cataliza la reacción inversa en la fijación autotrófica bacterias de CO_2. Aunque la actividad de la enzima se ha detectado en Metallosphaera sedula, la identidad del gen no

es conocido (Alber y col., J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006)).

1.1.1.c. Oxidorreductasa (2 paso, acil-CoA a alcohol).

Los Pasos S y W de la Figura 62 representan las enzimas bifuncionales que pueden formar 4-hidroxibutirato reductasa y 1,4-butanodiol, respectivamente. Ejemplos de paso 2-oxidoreductasas convierten un acil-CoA a alcohol incluyen aquellos que transforman sustratos tales como acetil-CoA a etanol (por ejemplo, adhesivos a partir de E. coli (Kessler et al., FEBS. Lett. 281:59-63 (1991)) y butiril CoA a butanol (por ejemplo, adhE2 de C. acetobutylicum (Fontaine et al., J. Bacteriol. 184:821-830 (2002)). El gen adhE2 de C. acetobutylicum se muestra para convertir 4-hidroxibutiril-CoA a 1,4-butanodiol (véase más arriba). Además de la reducción de acetil-CoA a etanol, la enzima codificada por adhesivo en Leuconostoc mesenteroides se ha demostrado que oxidan el isobutiraldehído cadena ramificada compuesto de isobutiril-CoA (Kazahaya et al., J., Gen. Microbiol Appl. 18:43..-55 (1972); Koo et al, Biotechnol Lett 27:505-510 (2005)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
adhE	NP_415757.1	16129202	*Escherichia coli*
adhE2	AAK09379.1	12958626	*Clostridium acetobutylicum*
adhE	AAV66076.1	55818563	*Leuconostoc mesenteroides*

Otra enzima ilustrativa puede convertir malonil-CoA a 3-HP. Una enzima NADPH-dependiente, con esta actividad se ha caracterizado en Chloroflexus aurantiacus, donde participa en el 3-hidroxipropionato cíclico (Hugler et al., J. Bacteriol. 184:2404-2410 (2002), Strauss y Fuchs, Eur. J. Biochem. 215:633-643 (1993)). Esta enzima, con una masa de 300 kDa, es altamente específica del sustrato y muestra similitud de poca secuencia a otras oxidorreductasas conocidas (Hugler et al., J. Bacteriol. 184:2404-2410 (2002)). No se han de mostrado que las enzimas en otros organismos catalicen esta reacción específica, sin embargo hay evidencia bioinformática de que otros organismos pueden tener rutas similares (Klatt et al., Environ. Microbiol. 9:2067-2078 (2007)). Los candidatos de la enzima en otros organismos, incluyendo Roseiflexus castenholzii, Erythrobacter sp. NAP1 y gamma proteobacteria marina HTCC2080 puede ser inferida por la similitud de secuencias.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
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	Gama Proteobacteria marina HTCC2080

Largas cadenas de moléculas de acil-CoA se pueden reducir por enzimas tales como la jojoba FAR (Simmondsia chinensis), que codifica un alcohol graso formador de acil-CoA reductasa. Su sobreexpresión en E. coli como resultado de la actividad FAR y la acumulación de alcohol graso (Metz et al., Plant. Physiol. 122: 635-644 2000)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
FAR	AAD38039.1	5020215	*Simmondsia chinensis*

1.2.1.b Oxidorreductasa (acil-CoA a aldehído).

El Paso A de las Figuras 58, 62 y 63 implica la conversión de succinil-CoA a succinato semialdehído por un aldehído formando succinil-CoA reductasa. El Paso Q de la Figura 62 muestra la conversión de 4-hidroxibutiril-CoA a 4-hidroxibutanal por un aldehído formador de 4-hidroxibutiril-CoA reductasa. Varias acil-CoA deshidrogenasas son capaces de reducir una acil-CoA a su aldehído correspondiente. Ejemplos de genes que codifican estas enzimas incluyen la Acinetobacter calcoaceticus acrI que codifica una acil-CoA

reductasa (Reiser y Somerville, J. Bacteriol. 179:2969-2975 (1997)), la acil-CoA reductasa grasa de Acinetobacter sp. Ml (Ishige et al., Appl. Environ. Microbiol. 68: 1192-1195 (2002)), y un succinato semialdehído CoA- y NADP-dependiente deshidrogenasa codificada por el gen sucD en Clostridium kluyveri (Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-80 (1996); Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996)). SucD de P. gingivalis es otro aldehído formador de succinil-CoA reductasa (Takahashi et al., J. Bacteriol. 182:4704-4710 (2000)). La enzima acetaldehído deshidrogenasa acilante en Pseudomonas sp, codificada por bphG, es diferente a como se ha demostrado para oxidar y acilar acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, isobutiraldehído y formaldehído (Powlowski et al., J. Bacteriol. 175:377-385 (1993)). Además de la reducción de acetil-CoA a etanol, la enzima codificada por adhesivo en Leuconostoc mesenteroides se ha demostrado que oxida el compuesto cadena ramificada isobutiraldehído de isobutiril-CoA (Koo et al., Biotechnol. Lett. 27:505-510 (2005)). La butiraldehído deshidrogenasa cataliza una reacción similar, la conversión de butirilo-CoA a butiraldehído, en los organismos solventogénicos tales como Clostridium saccharoperbutylacetonicum (Kosaka et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 71:58-68 (2007)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
acr1	YP_047869.1	50086359	*Acinetobacter calcoaceticus*
acr1	AAC45217	1684886	*Acinetobacter baylyi*
acr1	BAB85476.1	18857901	*Acinetobacter* sp. Strain M-1
sucD	P38947.1	730847	*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*

Un tipo de enzima adicional que convierte una acil-CoA a su correspondiente aldehído es malonil-CoA reductasa, que transforma el malonil-CoA a malónico semialdehído. Malonil-CoA reductasa es una enzima clave en la fijación autotrófica de carbono a través del ciclo de 3 hidroxipropionato en termoacidofílicos bacterias archael (Berg et al, Science 318: 1782-1786 (2007); Thauer, Ciencia 318:1732-1733 (2007)). La enzima utiliza NADPH como cofactor y se ha caracterizado en Metallosphaera y Suljolobus spp (Alber y col., J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006); Hugler et al., J. Bacteriol. 184:2404-2410 (2002)). La enzima es codificada por Msed_0709 en Metallosphaera sedula (Alber y col., J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006); Berg y otros, Science 318: 1782-1786 (2007)). Un gen que codifica una

malonil-CoA reductasa de Suljolobus tokodaii fue clonado y expresado heterólogamente en E. coli (Alber y col., J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006)). Aunque la funcionalidad de aldehído deshidrogenasa de estas enzimas es similar a la deshidrogenasa bifuncional de Chloroflexus aurantiacus, existe poca similitud de secuencia. Los dos candidatos de la enzima malonil-CoA reductasa tienen alta similitud de secuencia de semialdehído aspartato deshidrogenasa, una enzima que cataliza la reducción y desfosforilación simultánea de aspartil-4-fosfato a aspartato semialdehído. Los candidatos adicionales de genes se pueden encontrar por homología de secuencia a las proteínas en otros organismos, incluyendo Suljolobus soljataricus y acidocaldarius Suljolobus. Sin embargo, otro candidato para aldehído deshidrogenasa CoA-acilante es el gen ayuda a partir de Clostridium beijerinckii (Toth et al., Appl. Environ. Microbiol. 65:4973-4980 (1999)). Se ha reportado que esta enzima reduce acetil-CoA y CoA-butirilo a sus aldehídos correspondientes. Este gen es muy similar a eutE que codifica acetaldehído deshidrogenasa de Salmonella typhimurium y Escherichia coli (Toth et al., Appl. Environ. Microbiol. 65:4973-4980 (1999)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
Msed_0709	YP_001190808.1	146303492	*Metallosphaera sedula*
mcr	NP_378167.1	15922498	*Sulfolobus tokodaii*
asd-2	NP_343563.1	15898958	*Sulfolobus solfataricus*
Saci_2370	YP_256941.1	70608071	*Sulfolobus acidocaldarius*
Ald	AAT66436	49473535	*Clostridium beijerinckii*
eutE	AAA80209	687645	*Salmonella typhimurium*
eutE	P77445	2498347	*Escherichia coli*

1.2.1.c Oxidorreductasa (2-oxo ácido de la acil-CoA, descarboxilación).

El Paso AA en la Figura 62 muestra la conversión de 5-hidroxi-2-oxopentanoico a 4-hidroxibutiril-CoA. Las enzimas candidatas para esta transformación incluyen: 1) cadena ramificada de 2-ceto-ácido deshidrogenasa, 2) deshidrogenasa alfa-cetoglutarato, y 3) complejo piruvato deshidrogenasa multienzimático (PDHC). Estas enzimas son complejos multi-enzima que catalizan una serie de reacciones parciales que dan como resultado descarboxilación oxidativa acilante de 2-ceto-ácidos. Cada uno de los complejos 2-ceto-ácido deshidrogenasa ocupa posiciones clave en el metabolismo intermediario y la actividad enzimática de manera normal es estrechamente regulado (Fries et al. Bioquímica 42:6996-7002 (2003)). Las enzimas comparten una estructura compleja, pero

compuesto común de múltiples copias de tres componentes catalíticos: alfa-cetoácido descarboxilasa (E1), deshidrogenasa dihidrolipoamida acil transferasa (E2) y dihidrolipoamida (E3). El componente E3 es compartido entre todos los complejos de 2-ceto-ácido deshidrogenasa en un organismo, mientras que los componentes El y E2 están codificados por genes diferentes. Los componentes enzimáticos están presentes en numerosas copias en el complejo y utilizar múltiples cofactores para catalizar una secuencia dirigida a través de la canalización de las reacciones de sustrato. El tamaño total de estos complejos de deshidrogenasa es muy grande, con masas moleculares entre 4 y 10 millones de Da (es decir, más grande que un ribosoma).

La actividad de las enzimas de la familia 2-ceto-ácido deshidrogenasa es normalmente bajo o limitado en condiciones anaeróbicas en E. coli. El aumento de la producción de NADH (o NADPH) podría conducir a un desequilibrio redox y NADH sí sirve como un inhibidor de la función enzimática. Los esfuerzos de ingeniería han aumentado la actividad anaeróbica del complejo piruvato deshidrogenasa de E. coli (Kim et al., Appl. Environ. Microbiol 73: 1766-1771 (2007), Kim et al., J. Bacteriol. 190:3851-3858) 2008); Zhou et al., Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008)). Por ejemplo, el efecto inhibidor de NADH puede ser superado por ingeniería una mutación H322Y en el componente E3 (Kim et

al., J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008)). Los estudios estructurales de los componentes individuales y cómo trabajan juntos en el complejo de dar una idea de los mecanismos catalíticos y la arquitectura de las enzimas de esta familia (Aevarsson et al., Nat. Struct. Biol. 6:785-792 (1999); Zhou et al., Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 98: 14802-14807 (2001)). La especificidad de sustrato de los complejos deshidrogenasa varía en diferentes organismos, pero en general, de cadena ramificada ceto-ácido deshidrogenasa tiene el rango de sustrato más amplio.

La alfa-cetoglutarato deshidrogenasa (AKGD) se convierte en el alfa-cetoglutarato a succinil-CoA y es el sitio primario de control de flujo metabólico a través del ciclo de Krebs (Hansford, RG Curr. Top. Bioenerg. 10:217-278 (1980)). Codificada por los genes sucA, sucB y lpd en E. coli, la expresión de genes AKGD es desregulada bajo condiciones anaeróbicas y durante el crecimiento de la glucosa (Park et al., Mol. Microbiol. 15:473-482 (1995)). Aunque es estrecha la gama de sustrato de AKGD, estudios estructurales del núcleo catalítico de residuos específicos del componente E2 identifica a los responsables de la especificidad por el sustrato (Knapp y cols. J. Mol. 280:655-668 (1998)). Los Bacillus subtilis de AKGD, codificados por odhAB (El y E2) y pdhD (E3, dominio compartido), está regulado a nivel transcripcional y depende de la fuente de

carbono y fase de crecimiento del organismo (Resnekov et al., Mol. Gen. Genet. 234:285-296 (1992)). En la levadura, el gen que codifica el componente LPD1 E3 está regulada a nivel transcripcional por la glucosa (Roy y Dawes, J. Gen.Microbiol. 133:925-933 (1987)). El componente de El, codificado por KGDl, también está regulado por la glucosa y se activa por los productos de HAP2 y HAP3 (Cell Biol. Repetto y Mol. Tzagoloff. 9:2695-2705 (1989)). El complejo enzimático AKGD, inhibido por los productos de NADH y succinil-CoA, está bien estudiado en los sistemas de mamíferos, como deterioro de la función de se ha relacionado con varias enfermedades neurológicas y de la presa-Tretter Vizi Philos. Trans.R.Soc.Lond B Biol. Sci. 360:2335-2345 (2005)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
sucA	NP_415254.1	16128701	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
sucB	NP_415255.1	16128702	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
lpd	NP_414658.1	16128109	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
odhA	P23129.2	51704265	*Bacillus subtilis*
odhB	P16263.1	129041	*Bacillus subtilis*
pdhD	P21880.1	118672	*Bacillus subtilis*
KGD1	NP_012141.1	6322066	*Saccharomyces cerevisiae*
KGD2	NP_010432.1	6320352	*Saccharomyces cerevisiae*
LPD1	NP_116635.1	14318501	*Saccharomyces cerevisiae*

El complejo de cadena ramificada 2-ceto-ácido deshidrogenasa (BCKAD), también conocido como 2-oxoisovalerato deshidrogenasa, participa en rutas de cadena ramificada de degradación de aminoácidos, la conversión de 2-cetoácidos derivados de valina, leucina e isoleucina a sus derivados acil-CoA y CO_2. El complejo ha sido estudiado en muchos organismos incluyendo Bacillus subtilis (Wang et al., Eur. J. Biochem. 213: 1091-1099 (1993)), Rattus norvegicus (Namba et al., J. Biol. Chem. 244:4437-4447 (1969)) y Pseudomonas putida (Sokatch J. Bacteriol. 148:647-652 (1981)). En Bacillus subtilis la enzima está codificada por los genes pdhD (componente E3), bfmBB (componente E2), bjmBAA y bfmBAB (componente El) (Wang et al., Eur. J. Biochem 213: 1091-1099 (1993)). En los mamíferos, el complejo está regulado por la fosforilación de las fosfatasas y las proteínas quinasas específicas. El complejo ha sido estudiado en hepatocitos de rata (Chicco et al., J. Biol. Chem. 269: 19427 a 19434 (1994)) y está codificado por los genes Bckdha (E1 alfa), Bckdhb (E1 beta), DBT (E2) y Did (E3). Los componentes E1 y E3 del complejo de la Pseudomonas putida BCKAD se han cristalizado (Aevarsson et al., Nat. Struct. Biol 6:785-792 (1999); Mattevi Sci. 255: 1544-1550 (1992)) y ha estudiado el complejo enzimático (Sokatch et al., J. Bacteriol. 148:647-652 (1981)). La transcripción de los genes de P. putida BCKAD es activada por el producto del gen de

bkdR (Hester et al., Eur. J. Biochem. 233:828-836 (1995)). En algunos organismos incluyendo Rattus norvegicus (Paxton et al., Biochem. 234:295-303 (1986)) y Saccharomyces cerevisiae (Sinclair et al., Biochem. Mol. Biol. Ini. 31:911-922 (1993)), se ha demostrado que este complejo tiene un sustrato de amplia gama que incluye oxo-ácidos lineales tales como 2-oxobutanoato y alfa-cetoglutarato, además de los aminoácidos precursores de ácidos de cadena ramificada. El sitio activo de la BCKAD de bovinos fue diseñado para favorecer el sustrato alternativo acetil-CoA (Meng y Chuang, Biochemistry 33: 12879-12885 (1994)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
bfmBB	NP_390283.1	16079459	*Bacillus subtilis*
bfmBAA	NP_390285.1	16079461	*Bacillus subtilis*
bfmBAB	NP_390284.1	16079460	*Bacillus subtilis*
pdhD	P21880.1	118672	*Bacillus subtilis*
lpdV	P09063.1	118677	*Pseudomonas putida*
bkdB	P09062.1	129044	*Pseudomonas putida*
bkdA1	NP_746515.1	26991090	*Pseudomonas putida*
bkdA2	NP_746516.1	26991091	*Pseudomonas putida*
Bckdha	NP_036914.1	77736548	*Rattus norvegicus*
Bckdhb	NP_062140.1	158749538	*Rattus norvegicus*
Dbt	NP_445764.1	158749632	*Rattus norvegicus*
Dld	NP_955417.1	40786469	*Rattus norvegicus*

El complejo de la piruvato deshidrogenasa, que cataliza la conversión de piruvato a acetil-CoA, también ha sido ampliamente estudiado. En la enzima de E. coli, los

residuos específicos en el componente de E1 son responsables de la especificidad de sustrato (Bisswanger, H. J. Biol. Chem. 256:815-822 (1981); Bremer, J. Biochem. Eur. J. 8:535-540. (1969); Gong et al., J. Biol. Chem. 275: 13645-13653 (2000)). Como se mencionó anteriormente, los esfuerzos de la enzima de ingeniería han mejorado la actividad de la enzima de E. coli PDH en condiciones anaeróbicas (Kim et al., Appl. Environ. Microbiol 73: 1766-1771 (2007); Kim J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008); Zhou et al., Biotechnol. Lett 30:335-342 (2008)). En contraste con la PDH E. coli, el complejo de B. subtilis es activa y necesaria para el crecimiento en condiciones anaerobias (Nakano J. Bacteriol. 179:6749-6755 (1997)). La Klebsiella pneumoniae PDH, que se caracteriza durante el crecimiento en glicerol, también está activo en condiciones anaeróbicas (Menzel et al., J. Biotechnol. 56: 135-142 (1997)). Las estructuras cristalinas del complejo enzima de riñón bovino (Zhou et al., Proc E.U.A. 98: 14802-14807 (2001)) y el dominio catalítico de E2 Azotobacter vinelandii están disponibles (Mattevi y otros, Science 255.: 1544-1550 (1992)). Algunas enzimas de mamíferos PDH complejos pueden reaccionar sobre sustratos alternativos tales como 2-oxobutanoato, aunque la cinética comparativas de Rattus norvegicus PDH y BCKAD indican que BCKAD tiene mayor actividad en 2-oxobutanoato como un sustrato (Paxton et al. J. Biochem. 234:295-303 (1986)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
aceE	NP_414656.1	16128107	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
aceF	NP_414657.1	16128108	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
lpd	NP_414658.1	16128109	*Escherichia coli str. K12 substr. MG1655*
pdhA	P21881.1	3123238	*Bacillus subtilis*
pdhB	P21882.1	129068	*Bacillus subtilis*
pdhC	P21883.2	129054	*Bacillus subtilis*
pdhD	P21880.1	118672	*Bacillus subtilis*
aceE	YP_001333808.1	152968699	*Klebsiella pneumonia MGH78578*
aceF	YP_001333809.1	152968700	*Klebsiella pneumonia MGH78578*
lpdA	YP_001333810.1	152968701	*Klebsiella pneumonia MGH78578*
Pdha1	NP_001004072.2	124430510	*Rattus norvegicus*
Pdha2	NP_446446.1	16758900	*Rattus norvegicus*
Dlat	NP_112287.1	78365255	*Rattus norvegicus*
Dld	NP_955417.1	40786469	*Rattus norvegicus*

Como una alternativa a los complejos grandes multienzimáticos 2-ceto-ácido deshidrogenasa descritos anteriormente, algunos organismos anaerobios utilizan enzimas de la familia 2-cetoácido oxidorreductasa (OFOR) para catalizar descarboxilación oxidativa acilante de 2-ceto-ácidos. A diferencia de los complejos de deshidrogenasa, estas enzimas contienen hierro-azufre, utilizan diferentes cofactores y utilizan ferredoxina o flavodixina como aceptores de electrones en lugar de NAD(P)H. Aunque la mayoría de las enzimas de esta familia son específicas del piruvato como sustrato (POR) se ha demostrado que algunas 2-

ceto-ácido: ferredoxina oxidorreductasas aceptan una amplia gama de 2-cetoácidos como sustratos, incluyendo alfa-cetoglutarato y 2-oxobutanoato (Fukuda y Wakagi Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002); Zhang et al., J. Biochem. 120:587-599 (1996)). Una de estas enzimas como es la OFOR de archaea termoacidofílica Sulfolobus tokodaii 7, que contiene una subunidad alfa y beta codificada por el gen ST2300 (Fukuda y Wakagi Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002); Zhang et al., J. Biochem. 120:587-599 (1996)). Un sistema de expresión basado en plásmidos se ha desarrollado para expresar eficazmente esta proteína en E. coli (Fukuda et al., Eur. J. Biochem. 268:5639 - 5646 (2001)) y los residuos implicados en la especificidad del sustrato se determinaron (Fukuda y Wakagi Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002)). Dos OFORs de Aeropyrum pernix str. Kl también han sido recientemente clonados en E. coli, lo que se caracteriza y se encontró que reaccionan con una amplia gama de 2-oxoácidos (Nishizawa et al., FEBS Lett. 579:2319-2322 (2005)). Las secuencias de genes de estos candidatos OFOR están disponibles, aunque no tienen identificadores GenBank asignados hasta la fecha. Hay evidencia de que las enzimas bioinformáticas similares están presentes en todas las arqueas, bacterias anaerobias y algunas eucariotas amitocondriales (Fukuda y Wakagi Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2005)). Esta clase de enzimas también es

interesante desde un punto de vista energético, dado ferredoxina reducida podría ser utilizada para generar NADH por ferredoxina-NAD reductasa (Petitdemange et al., Biochim.Biophys.Acta 421:334-337 (1976)). También, puesto que la mayoría de las enzimas están diseñadas para funcionar bajo condiciones anaeróbicas, puede ser requerido enzimas menos tratadas mediante ingeniería de en relación con las enzimas de la familia del complejo 2-ceto-ácido deshidrogenasa para la actividad en un ambiente anaerobio.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
ST2300	NP_378302.1	15922633	*Sulfolobus tokodaii 7*

1.2.1.d Oxidorreductasa (fosfonato reductasa).

La conversión de 4-hidroxibutiril-fosfato a 4-hidroxibutanal puede ser catalizada por una oxidorreductasa en la clase CE 1.2.1. Aspartato semialdehído deshidrogenasa (ASD, EC 1.2.1.11) cataliza la reducción dependiente de NADPH de 4-aspartil fosfato a aspartato-4-semialdehído. ASD participa en la biosíntesis de aminoácidos y, recientemente, ha sido estudiado como un objetivo antimicrobiano (Hadfield et al., Biochemistry 40:.. 14475 a 14,483 (2001) de E. coli ASD estructura ha sido resuelto (Hadfield et al., J. Mol. Biol. 289:991-1002 (1999)) y se ha demostrado que la enzima acepta el sustrato alternativo beta-3-fosfato metilaspartilo (Shames et al., J. Biol. Chem. 259: 15331 a 15339 (1984)). La

enzima de Haemophilus influenzae ha sido objeto de estudios de enzimas tratadas por ingeniería para alterar las afinidades de unión a sustratos en el sitio activo (Blanco et al., Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 60: 1388-1395 (2004); Blanco et al., Acta. Crystallogr. D. Crystallogr. Biol. 60: 1808-1815 (2004)). Otras ASD candidatas se encuentran en Mycobacterium tuberculosis (Shafiani et al., J. Appl. Microbiol. 98:832-838 (2005).Methanococcus jannaschii (Faehnle et al., J. Mol Biol. 353: 1055-1068 (2005)) y los microorganismos infecciosos Vibrio cholerae y Helicobacter pylori (Moore et al., Protein Expr. Purif. 25: 189-194 (2002)). Un candidato de enzima relacionada es acetilglutamilfosfato reductasa (EC 1.2.1.38), una enzima que reduce naturalmente acetilglutamilfosfato a acetilglutamato-5-semialdehído, que se encuentra en S. cerevisiae (Pauwels et al., Eur. J. Biochem. 270: 1014-1024 (2003), B. subtilis (O'Reilly y Devine, Microbiología 140 (Pt. 5): 1023-1025 (1994)) y otros organismos.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
asd	NP_417891.1	16131307	*Escherichia coli*
asd	YP_248335.1	68249223	*Haemophilus influenzae*
asd	AAB49996	1899206	*Mycobacterium tuberculosis*
VC2036	NP_231670	15642038	*Vibrio cholera*
asd	YP_002301787.1	210135348	*Heliobacter pylori*
ARG5,6	NP_010992.1	6320913	*Saccharomyces cerevisiae*
argC	NP_389001.1	16078184	*Bacillus subtilis*

Otras enzimas ilustrativas de esta clase incluyen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa que convierte gliceraldehído-3-fosfato en D-glicerato 1,3-bifosfato (por ejemplo, E. coli gapA (Branlant y Branlant, Eur. J. Biochem 150: 61-66 (1985)), N-acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa que convierte la N-acetil-L-glutamato-5-semialdehído en N-acetil-L-glutamil-5-fosfato (por ejemplo, E. coli argC (Parsot et al., Gene 68:275-283 (1988)), y el glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa, que convierte la L-glutamato-5-semialdehído en L-glutamil-5-fosfato (por ejemplo, E. coli. Pro A (Smith et al., J. Bacteriol 157:545-551 (1984)). Los genes que codifican enzimas glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa de Salmonella typhimurium (Mahan y Csonka, J. Bacteriol 156: 1249-1262 (1983)) y Campylobacter jejuni (Louie y Chan, Mol. Gen. Genet. 240:29-35 (1993)) fueron clonados y expresados en E. coli.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
gapA	P0A9B2.2	71159358	*Escherichia coli*
argC	NP_418393.1	16131796	*Escherichia coli*
proA	NP_414778.1	16128229	*Escherichia coli*
proA	NP_459319.1	16763704	*Salmonella typhimurium*
proA	P53000.2	9087222	*Campylobacter jejuni*

1.2.1.e. Reductasa ácida

Varios pasos en las Figuras 58, 62 y 63 representan la conversión de ácidos no activados a aldehídos por una ácido reductasa. Estos incluyen la conversión de 4-hidroxibutirato, succinato, alfa-cetoglutarato y 4-aminobutirato de 4-hidroxibutanal, succinato semialdehído, 2,5-dioxopentanoato y 4-aminobutanal, respectivamente. Una ácido carboxílico reductasa notable se puede encontrar en Nocardia iowensis que cataliza el magnesio, la reducción de ácidos carboxílicos ATP y NADPH dependientes de sus aldehídos correspondientes (Venkitasubramanian et al., J. Biol. Chem. 282:478-485 (2007)). Esta enzima está codificada por el gen car funcionalmente clonado y expresado en E. coli (Venkitasubramanian et al., J. Biol. Chem. 282:478-485 (2007)). La expresión de la actividad del producto del gen NPT mejorada de la enzima a través de la modificación post-transcripcional. El gen codifica una TNPN fosfopanteteína transferasa (PPTasa) específica que convierte la apo-enzima inactiva a la holo-enzima activa. El sustrato natural de esta enzima es el ácido vanílico y la enzima exhibe una amplia aceptación de sustratos aromáticos y alifáticos (Venkitasubramanian et al., Biocatalizadores e Industrias Farmacéutica y Biotecnológica, ed. RN Patel, capítulo 15, págs.. 425-440, CRC Press LLC, Boca Raton, FL. (2006)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
car	AAR91681.1	40796035	*Nocardia iowensis* (sp. NRRL 5646)
npt	ABI83656.1	114848891	*Nocardia iowensis* (sp. NRRL 5646)

El vehículo adicional y los genes npt pueden ser identificados sobre la base de homología de secuencia.

Gen	Acceso No.	**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

Un enzima candidata adicional encontrada en Streptomyces griseus está codificada por los genes griC y la griD. Se piensa que esta enzima convierte ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico a 3-amino-4-hidroxibenzaldehído como supresión de cualquiera de griC y la griD que conduce a la acumulación de ácido 3-acetilamino-4-hidroxibenzoico extracelular, un producto de derivación de metabolismo de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico (Suzuki et al., J. Antibiot.

60 (6) :380-387 (2007)). Co-expresión de griC y la griD con SGR_665, una enzima similar en la secuencia en el TNP Nocardia iowensis, puede ser benéfica.

Gen	Acceso No.	**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*

Una enzima con características similares, alfa-aminoadipato reductasa (AAR, EC 1.2.1.31), participa en la biosíntesis de la lisina en las rutas de algunas especies de hongos. Esta enzima reduce naturalmente alfa-aminoadipato al alfa-aminoadipato semialdehído. El grupo carboxilo se activa por primera vez a través de la formación dependiente de ATP de una adenilato que se reduce entonces por NAD(P)H para dar el aldehído y AMP. Como car, esta enzima utiliza magnesio y requiere la activación de un PPTasa. Las enzimas candidatos 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. Genómica 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 expresa 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 el P. chrysogenum PPTasa no ha sido identificado hasta la fecha.

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

1.4.1.a Oxidoreductasa (aminación)

El glutamato deshidrogenasa (Paso J, Figuras 62 y 63), 4-aminobutirato deshidrogenasa (Paso M, Figuras 62 y 63), putrescina deshidrogenasa (Paso D, Figura 63), 5-amino-2-oxopentanoato deshidrogenasa (Paso P, Figura 63) y ornitina deshidrogenasa (Paso S, Figura 63) puede ser catalizada por aminación de oxidorreductasas. Las enzimas de esta clase CE catalizan la desaminación oxidativa de alfa-aminoácidos con NAD + o NADP + como aceptor y las reacciones son normalmente reversibles. Las oxidoreductasas ilustrativas que operan en los aminoácidos incluyen glutamato deshidrogenasa (desaminante), codificada por gdhA, leucina deshidrogenasa (desaminante), codificada por el IDH, y aspartato deshidrogenasa (desaminante), codificada por nadX. El producto del gen gdhA de Escherichia coli (Korber et al., J. Mol. Biol. 234: 1270-1273 (1993); McPherson y Wootton, Nucleic Acids Res. 11:5257-5266 (1983)), GDH de Thermotoga maritima (Kort y otros, los extremófilos 1:52-60 (1997); LEBBINK, et al., J. Mol. Biol. 280:287-296 (1998); Lebbink et al., J. Mol. Biol. 289:357 - 369 (1999)) y gdhAl de

Halobacterium salinarum (Ingoldsby et al., Gene 349:237-244 (2005)) catalizan la interconversión reversible de glutamato a 2-oxoglutarato y amoníaco, mientras que favorecen NADP (H), NAD(H), o ambos, respectivamente. El gen Idh de Bacillus cereus codifica la proteína LeuDH que tiene una variedad de gama de substratos incluyendo leucina, isoleucina, valina, y 2-aminobutanoato (Ansorge y Kula, Biotechnol. Bioeng. 68:557-562 (2000); Stoyan et al., J. Biotechnol. 54:77-80 (1997)). El gen de nadX de Thermotoga marítima que codifica para la aspartato deshidrogenasa está implicado en la biosíntesis de NAD (Yang et al., J. Biol. Chem. 278:8804-8808 (2003)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
gdhA	P00370	118547	*Escherichia coli*
gdh	P96110.4	6226595	*Thermotoga maritima*
gdhA1	NP_279651.1	15789827	*Halobacterium salinarum*
ldh	P0A393	61222614	*Bacillus cereus*
nadX	NP_229443.1	15644391	*Thermotoga maritima*

Otros genes candidatos de glutamato deshidrogenasa se encuentran en Bacillus subtilis (Khan et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 69: 1861-1870 (2005)), Nicotiana tabacum (Purnell y otros, Planta 222:. 167-180 (2005)), Oryza sativa (Abiko y otros, Physiol. Plant. Cell. 46:.. 1724-1734 (2005)), Haloferax mediterranei (Díaz et al., 10: Extremophyles 105-115 (2006)) y Halobactreium salinarum

(Hayden et al., FEMS Microbiol. Lett. 211:37-41 (2002)). La enzima Nicotiana tabacum está compuesto por subunidades alfa y beta codificadas por gdhl y gdhl (Purnell y otros, Planta 222: 167-180 (2005)). Se encontró que la sobreexpresión de la glutamato dependiente de NADH deshidrogenasa mejora la producción de etanol en las cepas de ingeniería de S. cerevisiae (Roca et al., Appl. Environ. Microbiol. 69:4732-4736 (2003)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
rocG	NP_391659.1	16080831	*Bacillus subtilis*
gdh1	AAR11534.1	38146335	*Nicotiana tabacum*
gdh2	AAR11535.1	38146337	*Nicotiana tabacum*
GDH	Q852M0	75243660	*Oryza sativa*
GDH	Q977U6	74499858	*Haloferax mediterranei*
GDH	P29051	118549	*Halobactreium salinarum*
GDH2	NP_010066.1	6319986	*Saccharomyces cerevisiae*

Una enzima ilustrativa para catalizar la conversión de aldehídos a sus aminas primarias correspondientes es lisina 6-deshidrogenasa (EC 1.4.1.18), codificadas por los genes lysDH. La lisina 6-deshidrogenasa (desaminante), codificada por el gen lysDH, cataliza la desaminación oxidativa del grupo ε-amino de L-lisina para formar 2-aminoadipato-6-semialdehído, que a su vez no se cicla enzimáticamente para formar ΔI-piperideina-6-carboxilato (Misono y Nagasaki, J. Bacteriol. 150:398-401 (1982)). El gen

de lysDH Geobacillus stearothermophilus codifica una termófila de lisina NAD-dependiente 6-deshidrogenasa (Heydari et al., Appl. Environ. Microbiología 70:937-942 (2004)). El gen de lysDH Aeropyrum pernix Kl se identifica a través de los proyectos de homología del genoma. Las enzimas adicionales se pueden encontrar en Agrobacterium tumefaciens (Hashimoto et al., J. Biochem. 106:76-80 (1989); Misono y Nagasaki, J. Bacteriol. 150:398-401 (1982)) y Achromobacter denitrificans (Ruldeekulthamrong et al., BMB. Rep. 41:790-795 (2008)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
lysDH	BAB39707	13429872	*Geobacillus stearothermophilus*
lysDH	NP_147035.1	14602185	*Aeropyrum pernix K1*
lysDH	NP_353966	15888285	*Agrobacterium tumefaciens*
lysDH	AAZ94428	74026644	*Achromobacter denitrificans*

Una enzima que convierte a los 3-oxoácidos de 3-aminoácidos es 3,5-diaminohexanoato deshidrogenasa (EC 1.4.1.11), una enzima que se encuentra en los organismos que fermentan la lisina. El gen que codifica esta enzima, KDD, fue identificado recientemente en Fusobacterium nucleatum (Kreimeyer et al., J. Biol. Chem. 282:7191-7197 (2007)). La enzima se ha purificado y caracterizado en otros organismos (Baker et al., J. Biol. Chem. 247:7724-7734 (1972); Baker y Van der Drift, Bioquímica 13:292-299 (1974)), pero los genes asociados con estas enzimas no se conocen. Los candidatos en

Myxococcus xanthus, Porphyromonas gingivalis W83 y otros organismos secuenciados puede ser inferida por homología de secuencia.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
kdd	AAL93966.1	19713113	*Fusobacterium nucleatum*
mxan_4391	ABF87267.1	108462082	*Myxococcus xanthus*
pg_1069	AAQ66183.1	34397119	*Porphyromonas gingivalis*

2.3.1.a Aciltransferasa (transferencia de fosfato a CoA).

El Paso P de la Figura 62 muestra la transformación de 4-hidroxibutiril-CoA a 4-hidroxibutiril-Pi. El fosfato ilustrativo incluyen las aciltransferasas que transfieren fosfotransacetilasa codificadas, por pta y fosfotransbutirilasa, codificada por ptb. El gen pta de E. coli codifica una enzima que puede convertir acetil-CoA en acetil-fosfato y viceversa (Suzuki, Biochim. Biophys. Acta 191:559-569 (1969)). Esta enzima también puede utilizar propionil-CoA en lugar de acetil-CoA formando propionato en el proceso (Hesslinger et al., Mol. Microbiol. 27:477-492 (1998)). De manera similar, el gen ptb de C. acetobutylicum codifica una enzima que puede convertir butiril-CoA en butirilo-fosfato (Walter et al., Gene 134:. 107-111 (1993)); Huang et al., Mol. J. Microbiol. Biotechnol. 2,33-38 (2000).

Los genes adicionales ptb puede ser encontrados en bacteria productora de butirato L2-50 (Louis et al., J. Bacteriol. 186:2099-2106 (2004)), Bacillus megaterium (Vázquez et al., Curr Microbiol 42:345-349 (2001)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
pta	NP_416800.1	16130232	*Escherichia coli*
ptb	NP_349676	15896327	*Clostridium acetobutylicum*
ptb	AAR19757.1	38425288	bacterias productoras de butirato L2-50
ptb	CAC07932.1	10046659	*Bacillus megaterium*

2.6.1. Aminotransferasa.

Las aminotransferasas que convierten reversiblemente un aldehído o cetona a un grupo amino. Los aminoácidos comunes de las combinaciones donadores/receptores incluyen el glutamato/alfa-cetoglutarato, alanina/piruvato y aspartato/oxalacetato. Se ha demostrado que varias enzimas convierten aldehídos a aminas primarias, y viceversa, tales como 4-aminobutirato, putrescina, y 5-amino-2-oxopentanoato. Estas enzimas son particularmente adecuados para llevar a cabo las siguientes transformaciones: Paso N en las Figuras 62 y 63, pasos E y Q en la Figura 63. Lisina-6-aminotransferasa (EC 2.6.1.36) es una enzima ilustrativa capaz de formar una amina primaria. Esta función de la enzima, se ha demostrado la conversión de lisina a semialdehído alfa-aminoadipato, en levaduras y bacterias. Se

han caracterizado los candidatos de Candida utilis (Hammer y Bode, J. y Microbiología Básica. 32:21-27 (1992)), Flavobacterium lutescens (Fujii et al., J. Biochem. 128:391-397 (2000)) y Streptomyces clavuligenus (Romero et al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 18:241-246 (1997)). Una lisina-6-aminotransferasa recombinante de S. clavuligenus fue expresada funcionalmente en E. coli (Tobin et al., J. Bacteriol. 173:6223-6229 (1991)). La enzima de F. lutescens es específico de alfa-cetoglutarato como el aceptor amino (Soda y Misono, Bioquímica 7:4110-4119 (1968)). Otras enzimas que convierten los aldehídos en aminas terminales son el producto del gen DAT en Acinetobacter baumanii de codificación de 2,4-diaminobutanoato:2-cetoglutarato 4-transaminasa (Ikai y Yamamoto, J. Bacteriol. 179:5118-5125 (1997)). Además de su sustrato natural, 2,4-diaminobutirato, DAT transamina las aminas terminales de lisina, 4-aminobutirato y ornitina.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
lat	BAB13756.1	10336502	*Flavobacterium lutescens*
lat	AAA26777.1	153343	*Streptomyces clavuligenus*
dat	P56744.1	6685373	*Acinetobacter baumanii*

La conversión de un aldehído a una amina terminal también puede ser catalizada por ácido gamma-aminobutirato transaminasa (GABA-transaminasa o 4-aminobutirato transaminasa). Esta enzima natural interconvierte

semialdehído succínico y glutamato de 4-aminobutirato y alfa-cetoglutarato y se sabe que tiene un rango amplio de sustrato (Liu et al., Biochemistry 43: 10896 a 10905, 2004); Schulz et al., Appl. Environ.. Microbiol. 56: 1-6 (1990)). Las dos transaminasas GABA en E. coli son codificadas por gabT (Bartsch et al., J. Bacteriol. 172:7035-7042 (1990)) y puuE (Kurihara y col., J. Biol. Chem. 280:4602-4608. (2005)). Se ha demostrado que las transaminasas GABA en Mus musculus, Pseudomonas fluorescens, y Sus scrofa reaccionan con una gama de sustratos alternativos incluyendo ácido 6-aminocaproico (Cooper, Methods Enzymol 113:80-82 (1985); Scott y Jakoby, J. Biol. Chem. 234:932-936 (1959)).

Gen	Acceso No.	GI No.	Organismo
gabT	NP_417148.1	16130576	*Escherichia coli*
puuE	NP_415818.1	16129263	*Escherichia coli*
abat	NP_766549.2	37202121	*Mus musculus*
gabT	YP_257332.1	70733692	*Pseudomonas fluorescens*
abat	NP_999428.1	47523600	*Sus scrofa*

Los candidatos adicionales de enzimas para convertir un aldehído y aminas primarias son putrescina transminases o diamina aminotransferasas. La putrescina aminotransferasa de E. coli está codificada por el gen ygjG, y la enzima purificada también fue capaz de transaminar cadaverina y espermidina (Samsonova et al., BMC Microbiol. 03:02 (2003)). Además, la actividad de esta enzima en 1,7-diaminoheptano y con aceptores amino distintos de 2-

oxoglutarato (por ejemplo, piruvato, 2-oxobutanoato) se ha informado (Kim, J. Biol. Chem. 239:783-786 (1964); Samsonova et al., BMC Microbiol. 3:2 (2003)). Una putrescina aminotransferasa con mayor actividad con piruvato como el aceptor amino que el alfa-cetoglutarato es el gen SPUC de Pseudomonas aeruginosa (Lu y col., J. Bacteriol. 184:3765-3773 (2002)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
ygjG	NP_417544	145698310	*Escherichia coli*
spuC	AAG03688	9946143	*Pseudomonas aeruginosa*

Las enzimas que transaminan 3-oxoácidos incluyen aminotransferasa GABA (descrito anteriormente), beta-alanina/alfa-cetoglutarato aminotransferasa y 3-amino-2-metilpropionato aminotransferasa. La beta-alanina/alfa-cetoglutarato aminotransferasa (WO08027742) reacciona con beta-alanina para formar semialdehído malónico, una 3-oxoácido. Se muestra que el producto del gen de SkPYD4 en Saccharomyces kluyveri utiliza preferentemente beta-alanina como el grupo amino donador (Andersen y Hansen, Gene 124: 105-109 (1993)). SkUGAl codifica un homólogo de aminotransferasa GABA de Saccharomyces cerevisiae, UGA1 (Ramos et al.., Eur. J. Biochem. 149:401-404 (1985)), mientras que SkPYD4 codifica una enzima implicada en la transaminación tanto de la beta-alanina como GABA (Andersen y

Hansen, Gene 124:105-109 (1993)). 3-amino-2-metilpropionato transaminasa cataliza la transformación de semialdehído metilmalonato de 3-amino-2-metilpropiónico. La enzima se ha caracterizado en Rattus norvegicus y scrofa y es codificada por Abat (Kakimoto et al., Biochim. Biophys. Acta 156:374-380 (1968); Tamaki et al., Methods Enzymol 324:376-389 (2000)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
SkyPYD4	ABF58893.1	98626772	*Lachancea kluyveri*
SkUGA1	ABF58894.1	98626792	*Lachancea kluyveri*
UGA1	NP_011533.1	6321456	*Saccharomyces cerevisiae*
Abat	P50554.3	122065191	*Rattus norvegicus*
Abat	P80147.2	120968	*Sus scrofa*

Varias aminotransferasas transaminan los grupos amino de los aminoácidos para formar 2-oxoácidos. Aspartato aminotransferasa es una enzima que transfiere naturalmente un grupo oxo de oxaloacetato al glutamato, formando alfa-cetoglutarato y aspartato. El aspartato es similar en estructura a OHED y AHD-2. La actividad aspartato aminotransferasa es catalizada por, por ejemplo, los productos génicos de 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 y Hanson/Exp. Bot. 55:595-604 (2004); Wilkie y Warren, Protein Expr. Purif. 12:381-389 (1998)). Se ha demostrado que

la enzima de Rattus norvegicus transamina sustratos alternativos tales como ácido 2-aminohexanedioico y ácido 2,4-diaminobutírico (Recasens et al., Bioquímica 19:4583-4589 (1980)). Las aminotransferasas que trabajan en otros sustratos de aminoácidos también pueden ser capaces de catalizar esta transformación. La valina aminotransferasa cataliza la conversión de valina y piruvato a 2-cetoisovalerato y alanina. El gen de E. coli, AvtA, codifica dicha enzima (Whalen y Berg, J. Bacteriol. 150:739-746 (1982)). Este producto génico también cataliza la transaminación de α-cetobutirato para generar una α-aminobutirato, aunque la amina donadora en esta reacción no se ha identificado (Whalen y Berg, J. Bacteriol. 158: 571-574 1984)). El producto del gen de la E. coli serC cataliza dos reacciones, fosfoserina aminotransferasa y fosfohidroxitreonina aminotransferasa (Lam y Winkler, J. Bacteriol. 172:6518-6528 (1990)) y la actividad en los sustratos no fosforilados no puede ser detectada (Drewke y otros, FEBS Lett 390: 179-182 (1996)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
aspC	NP_415448.1	16128895	*Escherichia coli*
AAT2	P23542.3	1703040	*Saccharomyces cerevisiae*
ASP5	P46248.2	20532373	*Arabidopsis thaliana*
Got2	P00507	112987	*Rattus norvegicus*
avtA	YP_026231.1	49176374	*Escherichia coli*
serC	NP_415427.1	16128874	*Escherichia coli*

Otro candidato es la enzima alfa-aminoadipato aminotransferasa (EC 2.6.1.39), una enzima que participa en la biosíntesis de la lisina y la degradación en algunos organismos. Esta enzima interconvierte 2-aminoadipato y 2-oxoadipato, usando alfa-cetoglutarato como el aceptor amino. Los candidatos de genes se encuentran en el Homo sapiens (Okuno et al, proteína enzimática 47: 136-148 (1993)) y Thermus thermophilus (Miyazaki et al., Microbiología 150:2327-2334 (2004).). La enzima de Thermus thermophilus, codificada por lysN, es activo con varios sustratos alternativos incluyendo oxaloacetato, 2-oxoisocaproato, 2-oxoisovalerato y 2-oxo-3-metilvalerato.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
lysN	BAC76939.1	31096548	*Thermus thermophilus*
AadAT-II	Q8N5Z0.2	46395904	*Homo sapiens*

2.7.2.a Fosfotransferasa (aceptor carboxi).

Las enzimas fosfotransferasa en la clase EC 2.7.2 transforman los ácidos carboxílicos a los ácidos fosfónicos con hidrólisis simultánea de un ATP. El Paso S de la Figura 62 implica la conversión de 4-hidroxibutirato a 4-hidroxibutiril-fosfato por ejemplo una enzima. El butirato cinasa (EC 2.7.2.7) lleva a cabo la conversión reversible de butiril-fosfato de butirato en acidogénesis en C. acetobutylicum (Cary et al., Appl. Environ. Microbiol. 56:

1576-1583 (1990)). Esta enzima está codificada por cualquiera de los dos productos génicos buk (Huang et al., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2:33-38 (2000)). Otras enzimas butirato quinasa se encuentran en C. butyricum y C. tetanomorphum (Twarog y Wolfe, J. Bacteriol. 86: 112-117 (1963)). La enzima quinasa relacionada de isobutirato de Thermotoga maritima también se ha expresado en E. coli y se cristalizó (Diao et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 59: 1100-1102 (2003); Diao y Hasson, J. Bacteriol 191:2521-2529 (2009)). La aspartoquinasa cataliza la fosforilación dependiente de ATP de aspartato y participa en la síntesis de varios aminoácidos. La enzima aspartoquinasa III en E. coli, codificada por lysC, tiene un rango amplio de sustrato y los residuos catalíticos que intervienen en la especificidad del sustrato se han dilucidado (Keng y Viola, Arch. Biochem. Biophys. 335:73-81 (1996)). Dos quinasas adicionales en E. coli son también buenas candidatas: acetato quinasa y la quinasa gamma-glutamil. La acetato quinasa de E. coli, codificada por ackA (Skarstedt y Silverstein, J. Biol. Chem. 251:6775-6783 (1976)), fosforila propionato además de acetato (Hesslinger et al., Mol. Microbiol. 27:477 -492 (1998)). La gamma-glutamil-quinasa de E. coli, codificada por proB (Smith et al., J. Bacteriol. 157:545-551 (1984)), fosforila el grupo gamma-ácido carbónico de glutamato.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	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*

La acetilglutamato quinasa fosforila glutamato acetilado en la biosíntesis de la arginina. No se sabe que esta enzima acepte sustratos alternativos, sin embargo, varios residuos de la enzima de E. coli implicados en la unión del sustrato y la fosforilación se han dilucidado por mutagénesis dirigida al sitio (Marco-Marín et al., J. Mol. Biol. 334: 459-476 (2003); Ramon-Maiques y otros, Estructura 10:329-342 (2002)). La enzima es codificada por argB en Bacillus subtilis y E. coli (Parsot et al., Gene 68:275-283 (1988)), y ARG5,6 en S. cerevisiae (Pauwels et al., Eur. J. Biochem. 270: 1014-1024 (2003)). El ARG5,6 gen de S. cerevisiae codifica un precursor de poliproteína que se haya madurado en la matriz mitocondrial para convertirse en acetilglutamato quinasa y acetilglutamilfosfato reductasa.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
argB	NP_418394.3	145698337	*Escherichia coli*
argB	NP_389003.1	16078186	*Bacillus subtilis*
ARG5,6	NP_010992.1	6320913	*Saccharomyces cerevisiae*

2.8.3.a CoA transferasa.

Los productos génicos de cat1, cat2 y cat3 de Clostridium kluyveri han demostrado que la exposición succinil-CoA (Paso G, Figuras 62 y 63), 4-hidroxibutiril-CoA (paso T, Figura 62), y actividad de butirilo-CoA acetiltransferasa, respectivamente (Seedorf y otros, Proc Natl. Acad. Sci. E.U.A. 105:2128-2133 (2008); Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996)). Las actividades similares de CoA transferasa también están presentes en Trichomonas vaginalis (van Grinsven et al., J. Biol. Chem. 283: 1411-1418 (2008)) y Trypanosoma brucei (Riviere et al., J. Biol. Chem. 279: 45337-45346 (2004)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
cat1	P38946.1	729048	*Clostridium kluyveri*
cat2	P38942.2	1705614	*Clostridium kluyveri*
cat3	EDK35586.1	146349050	*Clostridium kluyveri*
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	*Trichomonas vaginalis G3*
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	*Trypanosoma brucei*

Una enzima adicionalmente útil para este tipo de transformación es la acil-CoA: acetato-CoA transferasa, también conocida como acetato-CoA transferasa (EC 2.8.3.8), que se ha demostrado que transfiere el resto CoA a acetato de una variedad de ramificada y lineal de sustratos acil-CoA, incluyendo isobutirato (Matthies y Schink, Appl. Environ. Microbiol. 58: 1435-1439 (1992)), valerato (Vanderwinkel et

al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902-908 (1968)) y butanoato (Vanderwinkel, supra (1968)). Esta enzima está codificada por atoA (subunidad alfa) y atoD (subunidad beta) en E. coli sp. K12 (Korolev y otros, Acta Crystallogr. D. Crystallogr. Biol. 58:2116-2121 (2002); Vanderwinkel, supra (1968)). Existen enzimas similares 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	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
atoA	P76459.1	2492994	*Escherichia coli K12*
atoD	P76458.1	2492990	*Escherichia coli K12*
actA	YP_226809.1	62391407	*Corynebacterium glutamicum*
cg0592	YP_224801.1	62389399	*Corynebacterium glutamicum*
ctfA	NP_149326.1	15004866	*Clostridium acetobutylicum*
ctfB	NP_149327.1	15004867	*Clostridium acetobutylicum*
ctfA	AAP42564.1	31075384	*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*
ctfB	AAP42565.1	31075385	*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*

El glutaconato-CoA-transferasa (EC 2.8.3.12) enzima de bacteria anaerobia Fermentans acidaminococcus reacciona con el diácido glutaconyl-CoA y 3-butenoil-CoA (Mack y Buckel, FEBS Lett. 405:209-212 (1997)). Los genes que

codifican esta enzima son gctA y gctB. Esta enzima tiene una actividad reducida pero detectable con otros derivados CoA incluyendo glutaril-CoA, 2-CoA-hidroxiglutarilo, adipilo-CoA y acrililo-CoA (Buckel et al., Eur. J. Biochem. 118:315-321 (1981)). La enzima ha sido clonado y expresado en E. coli (Mac et al., Eur. J. Biochem. 226:41-51 (1994)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
gctA	CAA57199.1	559392	*Acidaminococcus fermentans*
gctB	CAA57200.1	559393	*Acidaminococcus fermentans*

3.1.2.a CoA-hidrolasa.

Las enzimas en los 3.1.2 de la familia hidrolizan las moléculas de acil-CoA a sus ácidos correspondientes. Sin embargo, estas enzimas puede modificarse para impartir funcionalidad a CoA-ligasa o sintetasa acoplada a una fuente de energía tal como una bomba de protones o directa hidrólisis de ATP. Varias acetil-CoA hidrolasas (EC 3.1.2.1) eucariotas tienen amplia especificidad de sustrato. Por ejemplo, la enzima de Rattus norvegicus de cerebro (Robinson et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 71:959-965 (1976)) puede reaccionar con butiril-CoA, hexanoílo-CoA y malonil-CoA. Aunque su secuencia no se ha reportado, la enzima de la mitocondria de la hoja de guisante también tiene una amplia especificidad de sustrato, con actividad demostrada en acetil-CoA, propionil-CoA, butirilo-CoA, palmitoil-CoA,

oleoil CoA, succinil- CoA y crotonil-CoA (Zeiher y Randall, Planta. Physiol. 94:20-27 (1990)). El acetil-CoA-hidrolasa, ACH1, de S. cerevisiae representa otro candidato hidrolasa (Bu et al., J. Biol. Chem. 278: 17203 - 17209 (2003)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
acot12	NP_570103.1	18543355	*Rattus norvegicus*
ACH1	NP_009538	6319456	*Saccharomyces cerevisiae*

Otra hidrolasa candidato de del ácido dicarboxílico tioesterasa humana, acot8, que exhibe la actividad en glutaril-CoA, adipilo-CoA, suberil-CoA, sebacilo-CoA y dodecanedioil-CoA (Westin et al., J. Biol. Chem. 280: 38125-38132 (2005)) y el más cercano homólogo de E. coli, tesB, que también puede hidrolizar una amplia gama de tioésteres CoA (Naggert et al., J. Biol. Chem. 266:11044-11050 (1991)). Una enzima similar también se ha caracterizado en el hígado de la rata (Deana, Biochem. Int. 26:767-773 (1992)). Otras posibles tioéster hidrolasas de E. coli incluyen los productos génicos de tesA (Bonner y Bloch., J. Biol. Chem. 247:3123-3133 (1972)), ybgC (Kuznetsova et al., FEMS Microbiol Rev. 29:263-279 (2005); Zhuang et al., FEBS Lett. 516: 161-163 (2002)), paaI (Song et al., J. Biol. Chem. 281: 11028-11038 (2006)), y ybdB (Leduc et al., J. Bacteriol. 189:7112-7126 (2007)).

Gen	Acceso No.	GI No.	Organismo
acot8	CAA15502	3191970	*Homo sapiens*
tesB	NP_414986	16128437	*Escherichia coli*
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*

Sin embargo, otra hidrolasa candidata es el glutaconato CoA-transferasa de Acidaminococcus fermentans. Esta enzima se transformó por mutagénesis dirigida al sitio en una hidrolasa de acil-CoA con actividad en glutaril-CoA, acetil-CoA y 3-butenoil-CoA (Mack y Buckel, FEBS Lett. 405:209-212 (1997)). Esto indica que las enzimas de codificación succinil-CoA:3-cetoácido-CoA transferasas y acetoacetil CoA-acetil-CoA: transferasas también pueden servir como candidatos para esta etapa de reacción, pero es probable que requieren ciertas mutaciones para cambiar su función.

Gen	Acceso No.	GI No.	Organismo
gctA	CAA57199.1	559392	*Acidaminococcus fermentans*
gctB	CAA57200.1	559393	*Acidaminococcus fermentans*

Las enzimas hidrolasa adicionales incluyen 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa que se ha descrito para

catalizar eficazmente la conversión de 3-hidroxiisobutiril-CoA a 3-hidroxiisobutirato durante degradación de valina (Shimomura y col., J. Biol. Chem. 269: 14248 a 14253 (1994)). Los genes que codifican esta enzima incluyen hibch de Rattus norvegicus (Shimomura et al., supra (1994); Shimomura et al., Methods Enzymol. 324:229-240 (2000)) y Homo sapiens (Shimomura et al., supra (1994). Los genes candidatos por homología de secuencia incluyen hibch de Saccharomyces cerevisiae y BC_2292 de Bacillus cereus.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	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*

4.1.1.a carboxi-liasa.

Descarboxilación de alfa-cetoácidos. El alfa-cetoglutarato descarboxilasa (Paso B, Figuras 58, 62 y 63), ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa (Paso Z, Figura 62) y 5-amino-2-oxopentanoato descarboxilasa (Paso I, Figura 63) implican todos la descarboxilación de un alfa-cetoácido. La descarboxilación de ceto-ácidos es catalizada por una variedad de enzimas con diversas especificidades de sustrato, incluyendo la piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1),

benzoilformato descarboxilasa (EC 4.1.1.7), alfa-cetoglutarato descarboxilasa y alfa-cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada.

La piruvato descarboxilasa (PDC), también denominada ceto-ácido descarboxilasa, una enzima clave en la fermentación alcohólica que cataliza la descarboxilación del piruvato a acetaldehído. La enzima de Saccharomyces cerevisiae tiene un rango amplio de sustrato para 2-ceto ácidos alifáticos incluyendo 2-cetobutirato, 2-cetovalerato, 3-hidroxipiruvato y 2-fenilpiruvato (Davie y otros, J. Biol. Chem. 267: 16601 - 16606 (1992)). Esta enzima ha sido ampliamente estudiada, diseñada para la modificación de la actividad y expresada funcionalmente en E. coli (Killenberg-Jabs y otros, Eur. J. Biochem. 268:1698-1704 (2001); Li y Jordania, Biochemestry 38: 10004 -10012 (1999); ter Schure et al., Appl. Environ. Microbiol. 64: 1303-1307 (1998)). El PDC de Zymomonas Mobilus, codificada por el PDC, también tiene una gama amplia de sustrato ha sido objeto de estudios de ingeniería dirigidas a alterar la afinidad por diferentes sustratos (Siegert et al., Protein. Eng. Des. Sel. 18:345-357 (2005)). La estructura cristalina de esta enzima se encuentra disponible (Killenberg-Jabs y col., Eur. J. Biochem. 268: 1698-1704 (2001)). Otros candidatos de PDC bien caracterizados incluyen las enzimas de Acetobacter pasteurianos (Chandra et al., Arch. Microbiol. 176:443-451

(2001)) y Kluyveromyces lactis (Krieger et al., Eur. J. Biochem. 269:3256-3263 (2002)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
pdc	P06672.1	118391	*Zymomonas mobilus*
pdc1	P06169	30923172	*Saccharomyces cerevisiae*
pdc	AM21208	20385191	*Acetobacter pasteurians*
pdc1	Q12629	52788279	*Kluyveromyces lactis*

Al igual que el PDC, benzoilformato descarboxilasa (EC 4.1.1.7) tiene un rango amplio de sustrato y ha sido objeto de estudios de ingeniería de enzimas. La enzima de Pseudomonas putida ha sido ampliamente estudiada y están disponibles las estructuras cristalinas de esta enzima (Hasson et al., Biohemistry 37:9918-9930 (1998); Polovnikova y otros, Biochemistry 42: 1820-1830 (2003). La mutagénesis dirigida de dos residuos en el sitio activo de la enzima de Pseudomonas putida alteró la afinidad (Km) de forma natural y sustratos de origen no natural (Siegert et al., Protein Eng. Des. Sel. 18:345-357 (2005)). Las propiedades de esta enzima han sido modificadas por la ingeniería dirigida (Lingen et al., Protein. Eng. 15:585-593 (2002); Lingen et al., Chembiochem 4:721-726 (2003)). La enzima de Pseudomonas aeruginosa, codificada por MDLC, también se ha caracterizado experimentalmente (Barrowman et al., FEMS Microbiol. Lett.

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

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
mdlC	P20906.2	3915757	*Pseudomonas putida*
mdlC	Q9HUR2.1	81539678	*Pseudomonas aeruginosa*
dpgB	ABN80423.1	126202187	*Pseudomonas stutzeri*
ilvB-1	YP_260581.1	70730840	*Pseudomonas fluorescens*

Una tercera enzima capaz de descarboxilación de 2-oxoácidos es alfa-cetoglutarato descarboxilasa (KGD). El rango de sustrato de esta clase de enzimas no se ha estudiado hasta la fecha. El KDC de Mycobacterium tuberculosis (Tian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 102: 10670 a 10675 (2005)) ha sido clonada y expresada funcionalmente. Sin embargo, no es un candidato ideal para la ingeniería de cepas cebido a que es grande (~130 kD) y rica en GC. La actividad de la enzima KDC ha sido detectada en varias especies de rizobios incluyendo Bradyrhizobium japonicum y Mesorhizobium loti (Green et al., J. Bacteriol. 182:2838-2844 (2000). Aunque el gen que codifica KDC (s) no ha sido aislado en estos organismos, las secuencias del genoma están disponibles y de

varios genes en cada genoma son anotados como KDC putativos. Un KDC de Euglena gracilis también se ha caracterizado, pero el gen asociado a esta actividad no ha sido identificado hasta la fecha (Shigeoka y Nakano, Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28 (1991)) Los primeros veinte aminoácidos a partir del extremo N-terminal fueron secuenciados (MTYKAPVKDVKFLLDKVFKV; SEC ID NO :) (Shigeoka y Nakano, Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28 (1991)). El gen puede ser identificado por pruebas genes candidatos que contienen esta secuencia N-terminal para la actividad KDC.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
kgd	O50463.4	160395583	*Mycobacterium tuberculosis*
kgd	NP_767092.1	27375563	*Bradyrhizobium japonicum*
kgd	NP_105204.1	13473636	*Mesorhizobium loti*

Un cuarto candidato de enzima para catalizar esta reacción es alfa-cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada (BCKA). Se ha demostrado que esta clase de enzima actúa sobre una variedad de compuestos que varían en longitud de cadena de 3 a 6 átomos de carbono (Oku y Kaneda, J. Biol. Chem. 263: 18386 - 18396 (1988); Smit et al., B.A., J.E. HylckamA Vlieg, W.J. Engels, Meijer L., J.T. Wouters, y Smit G. La identificación, clonación y caracterización de un Lactococcus lactis de cadena ramificada, la alfa-ceto ácido

descarboxilasa involucrada en la formación del sabor. Appl. Environ. Microbiol. 71: 303-311 (2005)). La enzima en Lactococcus lactis se ha caracterizado en una variedad de sustratos ramificados y lineales, incluyendo 2-oxobutanoato, 2-oxohexanoato, 2-oxopentanoato, 3-metil-2-oxobutanoato, 4-metil-2-oxobutanoato e isocaproato (Smit et al., Appl. Environ. Microbiol. 71:303-311 (2005)). La enzima se ha caracterizado estructuralmente (Berg et al., Science 318: 1782-1786 (2007)). Las alineaciones de secuencia entre la enzima de Lactococcus lactis y la piruvato descarboxilasa de Zymomonas mobilus indican que los residuos catalíticos de reconocimiento y el sustrato son casi idénticos (Siegert et al., Protein Eng. Des. Sel. 18:345-357 (2005)), por lo que esta enzima sería una candidata prometedora para la ingeniería dirigida. La descarboxilación de alfa-cetoglutarato por un BCKA se detectó en Bacillus subtilis, sin embargo, esta actividad fue baja (5%) en relación con la actividad en otros sustratos de cadena ramificada (Oku y Kaneda, Biosíntesis de cadena ramificada de ácidos grasos en Bacillus subtilis. Una descarboxilasa es esencial para sintetasa de ácidos grasos de cadena ramificada. J. Biol. Chem. 263: 18386-18396 (1988)), y el gen que codifica esta enzima no ha sido identificada hasta la fecha. Los genes candidatos BCKA adicionales pueden ser identificados por homología con la secuencia de la proteína de Lactococcus

lactis. Muchos de los accesos de alta puntuación BLASTp, para esta enzima son anotados como indolpiruvato descarboxilasas (EC 4.1.1.74). La indolpiruvato descarboxilasa (IPDA) es una enzima que cataliza la descarboxilación de indolpiruvato a indoleacetaldehyde en plantas y bacterias de las plantas.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
kdcA	AAS49166.1	44921617	*Lactococcus lactis*

Los recombinantes de enzimas de alfa-ceto ácido descarboxilasa de cadena ramificada derivadas de las subunidades de El del complejo deshidrogenaa de ceto ácido de cadena ramificada mitocondrial del Homo sapiens y Bos taurus se han clonado y expresado funcionalmente en E. coli (Davie et al., J. Biol. Chem. 267: 16601 - 16606, 1992); Wynn et al., J. Biol. Chem. 267: 1881-1887 (1992), Wynn y otros, J. Biol. Chem. 267:12400-12403 (1992)). En estos estudios, los autores encontraron que la co-expresión de chaperoninas GroEL y GroEs mejoró la actividad específica de la descarboxilasa de 500 veces (Wynn y otros, J. Biol. Chem. 267: 12400 - 12403 (1992)). Estas enzimas se componen de dos subunidades alfa y dos beta.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
BCKDHB	NP_898871.1	34101272	*Homo sapiens*
BCKDHA	NP_000700.1	11386135	*Homo sapiens*
BCKDHB	P21839	115502434	*Bos taurus*
BCKDHA	P11178	129030	*Bos taurus*

Descarboxilación de alfa-cetoácidos. Varias enzimas de ornitina descarboxilasa (Paso U, Figura 63) también presentan actividad sobre compuestos similares de lisina y otros. Estas enzimas se encuentran en la Nicotiana glutinosa (Lee y Cho, Biochem. J. 360:657-665 (2001)), Lactobacillus sp. 30a (Guirard y Snell, J. Biol. Chem. 255:5960-5964 (1980)) y Vibrio vulnificus (Lee et al., J. Biol. Chem. 282: 27115 a 27125 (2007)). Las enzimas de Lactobacillus sp. 30a (Momany et al., J. Mol. Biol. 252:643-655 (1995)) y V. vulnificus se han cristalizado. La enzima cataliza eficazmente descarboxilación de lisina de V. vulnificus y los residuos implicados en la especificidad del sustrato se han dilucidado (Lee et al., J. Biol. Chem. 282: 27115-27125 (2007)). Una enzima similar se ha caracterizado en Trichomonas vaginalis, pero el gen que codifica esta enzima no es conocido (Yarlett et al., Biochem. J. 293 (Pt 2):487-493 (1993)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
AF323910.1:1..1299	AAG45222.1	12007488	*Nicotiana glutinosa*
odc1	P43099.2	1169251	*Lactobacillus sp. 30a*
VV2_1235	NP_763142.1	27367615	*Vibrio vulnificus*

Las enzimas glutamato descarboxilasa (Paso L, Figuras 62 y 63) también son bien caracterizadas. glutamato Las descarboxilasas ilustrativas se pueden encontrar en E. coli (De Biase et al., Protein Expr. Purif. 8:430-438 (1996)), S. cerevisiae (Coleman et al., J. Biol. Chem. 276: 244-250 (2001)) y Homo sapiens (Bu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 89:2115-2119 (1992), Bu y Tobin, Genómica 21 :222-228 (1994)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
GAD1	NP_000808	58331246	*Homo sapiens*
GAD2	NP_001127838	197276620	*Homo sapiens*
gadA	NP_417974	16131389	*Escherichia coli*
gadB	NP_416010	16129452	*Escherichia coli*
GAD1	NP_013976	6323905	*Saccharomyces cerevisiae*

La lisina descarboxilasa (EC 4.1.1.18) cataliza la descarboxilación de la lisina a cadaverina. Dos isoenzimas de esta enzima se codifican en el genoma de E. coli por los genes cadA y idcC. La cadA participa en la resistencia a los ácidos y está sujeta a regulación positiva por el producto del gen cadC (Lemonnier y Lane, Microbiology 144 (Pt 3) :751-

760 (1998)). La cadC acepta hidroxilisina y S-aminoetilcisteina como sustratos alternativos y 2-Aminopimelato y 6-ACA actúan como inhibidores competitivos para esta enzima (Sabo et al., Biochemistry 13:662-670 (1974)). La evolución dirigida u otros métodos de ingeniería de enzimas puede ser utilizada para aumentar la actividad de esta enzima para descarboxilar 2-aminopimelato. Los productos de genes Idc expresados constitutivamente son menos activos que el CadA (Lemonnier y Lane, Microbiología 144 (Pt 3) :751-760 (1998)). Un lisina descarboxilasa análoga a CadA fue identificada recientemente en Vibrio parahaemolyticus (Tanaka et al., J. Appl. Microbiol. 104: 1283-1293 (2008)). La lisina descarboxilasa de Selenomonas ruminantium, codificada por IDC, tiene similitud de secuencia con ornitina descarboxilasas eucariotas y acepta L-lisina y L-ornitina como sustratos (Takatsuka et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 63: 1843-1846 (1999)). Los residuos en sitio activo fueron identificados y diseñados para alterar la especificidad por el sustrato de la enzima (Takatsuka et al., J. Bacteriol. 182:6732-6741 (2000)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
cadA	AAA23536.1	145458	*Escherichia coli*
ldcC	AAC73297.1	1786384	*Escherichia coli*
ldc	O50657.1	13124043	*Selenomonas ruminantium*
cadA	AB124819.1	44886078	*Vibrio parahaemolyticus*

6.2.1.a CoA sintetasa.

Las reacciones de CoA sintetasa o ligasa son requeridas por el Paso I de las Figuras 62 y 63, y Paso V de la Figura 62. El succinato o 4-hidroxibutirato son los sustratos requeridos. Ejemplos de genes que codifican enzimas que puedan llevar a cabo estas transformaciones incluyen los genes sucCD de E. coli, que, naturalmente, forman un complejo succinil-CoA sintetasa. Este complejo de enzima natural cataliza la formación de succinil-CoA de succinato con el consumo concomitante de un ATP, una reacción que es reversible in vivo (Buck y col., Biochem. 24:6245-6252 (1985)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
sucC	NP_415256.1	16128703	*Escherichia coli*
sucD	AAC73823.1	1786949	*Escherichia coli*

Las CoA-ligasas adicionales ilustrativas incluyen la dicarboxilato-CoA ligasa de rata para el cual está todavía sin caracterizar la secuencia (Vamecq et al., Biochemistry J. 230:683-693 (1985)), cualquiera de las dos fenilacetato-CoA

ligasas caracterizadas de P. chrysogenum (Lamas-Maceiras y otros, Biochem J. 395: 147-155 (2005); Wang et al, Biochem Biophy. Res. Commun. 360 (2) :453-458 (2007)), la fenilacetato-CoA ligasa a partir Pseudomonas putida (Martínez-Bianco et al., J. Biol. Chem. 265:7084-7090 (1990)), y la ligasa 6-carboxihexanoato-CoA a partir Bacilis subtilis (Boweret al., J. Bacteriol. 178 (14) :4122-4130 (1996)). Enzimas adicionales son acetoacetil-CoA sintetasas candidatas de Mus musculus (Hasegawa et al., Biochim. Biophy s. Acta 1779:414-419 (2008)) y Homo sapiens (Ohgami et al., Biochem. Pharmacol. 65:989-994 (2003)), que, naturalmente, catalizan la conversión ATP-dependiente de acetoacetato en acetoacetil-CoA. La 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa se ha demostrado en Metallosphaera sedula (Berg y otros, Science 318: 1782-1786 (2007)). Esta función se ha asignado provisionalmente al gen Msed_1422.

Gen	Acceso No.	**GI No.**	Organismo
phl	CAJ15517.1	77019264	*Penicillium chrysogenum*
phlB	ABS19624.1	152002983	*Penicillium chrysogenum*
paaΓ	AAC24333.2	22711873	*Pseudomonas putida*
bioW	NP_390902.2	50812281	*Bacillus subtilis*
AACS	NP_084486.1	21313520	*Mus musculus*
AACS	NP_076417.2	31982927	*Homo sapiens*
Msed_1422	YP_001191504	146304188	*Metallosphaera sedula*

El ADP formador de acetil-CoA sintetasa (ACD, EC 6.2.1.13) es otra enzima candidata que acopla la conversión de ésteres de acil-CoA a sus correspondientes ácidos con la síntesis simultánea de ATP. Varias enzimas con amplias especificidades de sustrato han sido descritas en la literatura. ACD I de Archaeoglobus fulgidus, codificada por AF1211, se demostró que opera en una variedad de sustratos lineales y de cadena ramificada incluyendo acetil-CoA, propionil-CoA, butirilo-CoA, acetato, propionato, butirato, isobutirato, isovalerato, succinato, fumarato, fenilacetato, indoleacetato (Musfeldt et al., J. Bacteriol. 184:636-644 (2002)). La enzima de Haloarcula marismortui (anotada como una succinil-CoA sintetasa) acepta ácidos propionato, butirato y de cadena ramificada (isovalerato y isobutirato) como sustratos y se demostró que operan en las direcciones hacia adelante y hacia atrás (Brasen et al., Arch. Microbiol. 182:277-287 (2004)). La ACD codificada por PAE3250 de Pyrobaculum aerophilum crenarchaeon hipertermófilas mostró el rango más amplio sustrato de todos los ACDs caracterizados, reaccionando con acetil-CoA, isobutirilo CoA- (sustrato preferido) y fenilacetil-CoA (Brasen et al., Supra (2004)). Las enzimas de A. fulgidus, H.marismortui y P. aerophilum han sido clonado, expresado funcionalmente y caracterizado en E. coli (Musfeldt et al., supra; Brasen et al., supra (2004)).

Gen	Acceso No.	**GI No.**	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*

Ejemplo XXIII

Producción de BDO Utilizando Acido Carboxílico Reductasa

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano que produce 1,4-butanodiol mediante enzimas de ácido carboxílicos reductasa.

Escherichia coli se utiliza como un organismo blanco para diseñar la ruta de síntesis de 1,4-butanodiol descrita en la Figura 58. E. coli proporciona un buen huésped para la generación de un microorganismo de origen no natural capaz de producir 1,4-butanodiol. E. coli es susceptible de manipulación genética y se sabe que es capaz de producir varios productos, como el etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, efectivamente bajo las condiciones de oxigenación diferentes.

Integración de genes de la ruta 4-hidroxibutirato en Cromosoma: Construcción de ECKh-432. Los enzimas de ácidos carboxílicos reductasa se expresaron en una cepa de E. coli designadas ECKh-761, que es un ECKh-432 descendente con las supresiones adicionales de los genes sad y gabD que codifican enzimas semialdehído succinato deshidrogenasa. Esta

cepa contuvo los componentes de la ruta de BDO, dando lugar a 4HB, integrados en el cromosoma de E. coli en el sitio fimD como se describe en el Ejemplo XXI.

Clonación y expresión de ácido carboxílico reductasa y PPTasa. Para generar una cepa de E. coli modificadas para producir 1,4-butanodiol, ácidos nucleicos que codifican una ácido carboxílico reductasa y fosfopanteteína transferasa se expresan en E. coli usando bien conocidas técnicas de biología molecular (véase, por ejemplo, Sambrook, supra, 2001; Ausubel supra, 1999). En particular, los genes car, de Nocardia iowensis (designado 720), Mycobacterium smegmatis mc (2) 155 (eesignado 890), Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis K-10 (designado 891) y Mycobacterium marinum M (designado 892) fueron vectores clonados en pZS * 13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el control de PA1/lacO promotores. El gen TNP (AB 183656.1) (es decir, 721) fue clonado en el vector pKJL33S, un derivado del original vector plasmídico mini-F PML31 bajo el control de promotores y sitios de unión ribosomal similares a los utilizados en pZS * 13.

El gen car (GNM_720) fue clonado por PCR a partir de ADN genómico Nocardia. Su ácido nucleico y las secuencias de proteínas se muestran en las Figuras 59A y 59B, respectivamente. Una versión optimizada para el codón del gen

npt (GNM_721) fue sintetizado por GeneArt (Regensburg, Alemania). Su ácido nucleico y las secuencias de proteínas se muestran en las figuras 60A y 60B, respectivamente. El ácido nucleico y las secuencias de proteínas para los genes de Mycobacterium smegmatis mc (2) 155 (designado 890), Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis K-10 (designado 891) y Mycobacterium marinum M (designado 892) y las enzimas se pueden encontrar en las Figuras 64, 65 y 66, respectivamente. Los plásmidos se transformaron en ECKh-761 para expresar las proteínas y enzimas requeridas para producción de 1,4-butanodiol.

Demostración de la producción de 1,4-BDO con ácido carboxílico reductasa. La expresión funcional de la ruta 1,4-butanodiol se demostró usando E. coli entero de cultivo celular. Las colonias individuales de E. coli ECKh-761 transformadas con plásmidos pZS * 13 y pKJL33S que contiene un gen de car y GNM_721, respectivamente, se inocularon en 5 ml de medio LB que contiene los antibióticos apropiados. De manera similar, las colonias individuales de E. coli ECKh-761 transformadas con car que contienen plásmidos pZS * 13 y plásmidos pKJL33S sin inserto fueron inoculados en alícuotas adicionales de 5 ml de medio LB que contienen los antibióticos apropiados. Diez ml de cultivos micro-aeróbicos se iniciaron mediante la inoculación en un medio fresco

mínimo de conversión in vivo (véase más adelante) que contiene los antibióticos apropiados con 1.5% de los primeros cultivos.

La receta de la mínima en un medio de conversión in vivo (por 1000 ml) es como sigue:

C	Concentración final
Solución reguladora MOPS/KOH 1M	100 mM
Glucosa (40%)	1%
Solución de sales 10XM9	IX
$MgSO_4$ (1 M)	1 mM
Minerales traza (xlOOO)	1X
1M $NaHCO_3$	10 mM

Las condiciones microaerobias fueron establecidas por lavado inicialmente cubiertas de anaerobios con nitrógeno durante 5 minutos, luego de perforar el septo con una aguja 18G siguiendo inoculación. La aguja se mantiene en la botella durante el crecimiento para introducir una pequeña cantidad de aire en las botellas. La expresión de proteínas se indujo con IPTG 0.2 mM cuando el cultivo alcanzó la fase de crecimiento de registro medio. Se considera: tiempo = 0 hr. Los sobrenadantes de cultivo se analizaron para BDO, 4H, y otros subproductos como los descritos anteriormente y en WO2008115840 (véase la Tabla 31).

La Tabla 33 muestra la producción de diversos productos en las cepas que expresan diferentes reductasas de ácido carboxílico, incluyendo la producción de BDO.

Tabla 33. La producción de diversos productos en las cepas que expresan diferentes reductasas de ácido carboxílico.

		Cm10	Carb100	Carb100	0 h	
	Cepa	**pKLJ33S**	**pZS*13S**	**pZShc13S**	**OD600**	**OD600**
1	761	034rbs55	no insert		0.54	2.13
5	761	721	720		0.48	1.88
7	761	721	890		0.45	1.63
8	761	721	891		0.48	1.65
9	761	721	892		0.45	1.31
12	761	sin inserto	720		0.50	1.72
14	761	sin inserto	890		0.51	1.96
15	761	sin inserto	891		0.19	2.36
16	761	sin inserto	892		0.05	1.40

48 h

48 h, mM

	PA	Su	La	4HB	BDO	GBL	$EtOH_{Enz}$
1	10.60	0.00	0.20	8.08	2.40	2.97	0.65
5	3.41	0.00	0.02	6.93	8.53	0.24	1.82
7	0.00	0.00	0.00	6.26	12.30	0.47	5.85
8	2.16	0.00	0.00	7.61	9.08	0.46	2.84
9	0.36	0.00	0.00	5.89	7.83	0.15	2.89
12	8.30	0.00	0.13	9.91	1.99	0.14	0.64
14	2.57	0.00	0.01	9.77	3.53	0.14	1.44
15	1.73	0.00	0.00	9.71	2.68	0.10	0.79
16	0.02	0.00	0.00	10.80	1.30	0.07	0.55

48 h, mM/OD

	PA	Su	La	4HB	BDO	GBL	$EtOH_{Enz}$
1	4.98	0.00	0.09	3.80	1.13	1.40	0.31
5	1.81	0.00	0.01	3.69	4.54	0.13	0.97
7	0.00	0.00	0.00	3.84	7.55	0.29	3.59
8	1.31	0.00	0.00	4.61	5.50	0.28	1.72
9	0.27	0.00	0.00	4.50	5.99	0.12	2.21
12	4.83	0.00	0.07	5.76	1.16	0.08	0.37
14	1.31	0.00	0.01	4.99	1.80	0.07	0.74
15	0.73	0.00	0.00	4.11	1.13	0.04	0.33
16	0.01	0.00	0.00	7.71	0.93	0.05	0.39

PA = piruvato, SA = succinato, LA = lactato, 4HB = 4-hidroxibutirato, BDO = 1,4-butanodiol, GBL = gamma-

butirolactona, EtOH = etanol, LLOQ = límite inferior de cuantificación

Estos resultados muestran que diversas ácido carboxílico reductasas pueden funcionar en una ruta de BDO para producir BDO.

A lo largo de esta solicitud se han referenciado varias publicaciones. Las descripciones de estas publicaciones en su totalidad, incluyendo GenBank y publicaciones número de GI, se incorporan por referencia en esta solicitud con el fin de describir más completamente el estado de la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque la invención ha sido descrita con referencia a los ejemplos proporcionados anteriormente, debe entenderse que pueden hacerse varias modificaciones sin apartarse del espíritu de la invención.

RESUMEN

La invención provee organismos microbianos de origen no natural que comprenden una ruta de 1,4-butanodiol (BDO), 4-hidroxibutiril-CoA, 4-hidroxibutanal o putrescina que comprende por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de ruta de BDO, 4-hidroxibutiril-CoA, 4-hidroxibutanal o putrescina expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, A-hidroxibutiril-CoA, 4-hidroxibutanal o purtrescina y además optimizada para la expresión de BDO. La invención adicionalmente provee métodos para usar dichos organismos microbianos para producir BDO, 4-hidroxibutiril-CoA, 4-hidroxibutanal o putrescina.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENOMATICA, INC.

<120> MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE 1,4-BUTANEDIOL, 4-HIDROXIBUTANAL, 4-HIDROXIBUTIRIL-COA, PUTRESCINA Y COMPUESTOS Y MÉTODOS RELACIONADOS CON LOS MISMOS

<130> 066662-0352

<140> PCT/US2010/052570
<141> 2010-10-13

<150> 61/251,287
<151> 2009-10-13

<160> 99

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 59
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 1
gacgaattcg ctagcaagag gagaagtcga catgtccaat tcactggccg tcgttttac 59

<210> 2
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 2
gaccctagga agctttctag agtcgaccta tgcggcatca gagcaga 47

<210> 3
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 3
atgtaccgca agttccgc 18

<210> 4
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 4
caatttgccg atgcccag 18

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 5
gctgaccact gaagactttg 20

<210> 6
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 6
gatcagggct tcggtgtag 19

<210> 7
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 7
ttggtgcggg ccaagcagga tctgctc 27

<210> 8
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 8
tcagccgaac gcctcgtcga ggatctcctg 30

<210> 9
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 9
tggccaacat aagttcacca ttcgggcaaa ac 32

<210> 10
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 10
tctcttcaac cagccattcg ttttgcccg 29

<210> 11
<211> 27
<212> ADN
<213> Clostridium acetobutylicum

<400> 11
attaaagtta agtggaggaa tgttaac 27

<210> 12
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 12
acacgcggat ccaacgtccc gg 22

<210> 13
<211> 23

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 13
agcggctccg ctagccgctt atg 23

<210> 14
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 14
aagccgttgc tgcagctctt gagc 24

<210> 15
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 15
atctccggcg gtcggatccg tcg 23

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 16
aaagcggcta gccacgccgc 20

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 17
attacacgag gtacccaacg 20

<210> 18
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 18
atgctggcgt acaaaggtgt cc 22

<210> 19
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 19
ggacaccttt gtacgccagc at 22

<210> 20
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 20
atcgcctaca ctaaaccaga agtgg 25

<210> 21
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 21
ccacttctgg tttagtgtag gcgat 25

<210> 22

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 22
aggcagttcc ataggatggc 20

<210> 23
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 23
tgacatgtaa cacctacctt ctgtgcctgt gccagtggtt gctgtgatat agaag 55

<210> 24
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 24
ataataatac atatgaacca tgcgagttac gggcctataa gccaggcg 48

<210> 25
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 25
agtttttcga tatctgcatc agacaccggc acattgaaac gg 42

<210> 26
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 26
ctggcacagg cacagaaggt aggtgttaca tgtcagaacg tttacacaat gacgtggatc 60

<210> 27
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 27
agacaaatcg gttgccgttt gttaagccag gcgagatatg atctatatc 49

<210> 28
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 28
gagttttgat ttcagtactc atcatgtaac acctaccttc ttgctgtgat atag 54

<210> 29
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 29
ctatatcaca gcaagaaggt aggtgttaca tgatgagtac tgaaatcaaa actc 54

<210> 30
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 30
gatatagatc atatctcgcc tggcttaaca aacggcaacc gatttgtct 49

<210> 31
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 31
tattgtgcat acagatgaat ttttatgcaa acagtcagcc ctgaagaagg gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 32
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 32
caaaaaaccg gagtctgtgc tccggttttt tattatccgc taatcaatta catatgaata 60

tcctccttag 70

<210> 33
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 33
ataataatag aattcgtttg ctacctaaat tgccaactaa atcgaaacag g 51

<210> 34
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 34
tattattatg gtaccaatat catgcagcaa acggtgcaac attgccg 47

<210> 35
<211> 47

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 35
tgatctggaa gaattcatcg gctttaccac cgtcaaaaaa aacggcg 47

<210> 36
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 36
ataaaaccct gcagcggaaa cgaagtttta tccatttttg gttacctg 48

<210> 37
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 37
ggaagagagg ctggtaccca gaagccacag cagga 35

<210> 38
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 38
gtaatcactg cgtaagcgcc atgccccggc gttaattc 38

<210> 39
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 39
attgccgcgt tcctcctgct gtcga 25

<210> 40
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 40
cgacagcagg aggaacgcgg caat 24

<210> 41
<211> 75
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 41
gtttgcacgc tatagctgag gttgttgtct tccagcaacg taccgtatac aataggcgta 60

tcacgaggcc ctttc 75

<210> 42
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético

<400> 42
gctacagcat gtcacacgat ctcaacggtc ggatgaccaa tctggctggt atgggaatta 60

gccatggtcc 70

<210> 43
<211> 73
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 43
tgtgagtgaa agtcacctgc cttaatatct caaaactcat cttcgggtga cgaaatatgg 60

cgtgactcga tac 73

<210> 44
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 44
tctgtatcag gctgaaaatc ttctctcatc cgccaaaaca gcttcggcgt taagatgcgc 60

gctcaaggac 70

<210> 45
<211> 20
<212> PRT
<213> Euglena gracilis

<400> 45
Met Thr Tyr Lys Ala Pro Val Lys Asp Val Lys Phe Leu Leu Asp Lys
1 5 10 15

Val Phe Lys Val
20

<210> 46
<211> 2036
<212> ADN
<213> Escherichia coli

<400> 46
atgaacttac atgaatatca ggcaaaacaa ctttttgccc gctatggctt accagcaccg 60

gtgggttatg cctgtactac tccgcgcgaa gcagaagaag ccgcttcaaa aatcggtgcc 120

ggtccgtggg tagtgaaatg tcaggttcac gctggtggcc gcggtaaagc gggcggtgtg 180

aaagttgtaa acagcaaaga agacatccgt gcttttgcag aaaactggct gggcaagcgt 240

ctggtaacgt atcaaacaga tgccaatggc caaccggtta accagattct ggttgaagca 300

gcgaccgata tcgctaaaga gctgtatctc ggtgccgttg ttgaccgtag ttcccgtcgt 360

gtggtcttta tggcctccac cgaaggcggc gtggaaatcg aaaaagtggc ggaagaaact 420

ccgcacctga tccataaagt tgcgcttgat ccgctgactg gcccgatgcc gtatcaggga 480

cgcgagctgg cgttcaaact gggtctggaa ggtaaactgg ttcagcagtt caccaaaatc 540

ttcatgggcc tggcgaccat tttcctggag cgcgacctgg cgttgatcga aatcaacccg 600

ctggtcatca ccaaacaggg cgatctgatt tgcctcgacg gcaaactggg cgctgacggc 660

aacgcactgt tccgccagcc tgatctgcgc gaaatgcgtg accagtcgca ggaagatccg 720

cgtgaagcac aggctgcaca gtgggaactg aactacgttg cgctggacgg taacatcggt 780

tgtatggtta acggcgcagg tctggcgatg ggtacgatgg acatcgttaa actgcacggc 840

ggcgaaccgg ctaacttcct tgacgttggc ggcggcgcaa ccaaagaacg tgtaaccgaa 900

gcgttcaaaa tcatcctctc tgacgacaaa gtgaaagccg ttctggttaa catcttcggc 960

ggtatcgttc gttgcgacct gatcgctgac ggtatcatcg gcgcggtagc agaagtgggt 1020

gttaacgtac cggtcgtggt acgtctggaa ggtaacaacg ccgaactcgg cgcgaagaaa 1080

ctggctgaca gcggcctgaa tattattgca gcaaaaggtc tgacggatgc agctcagcag 1140

gttgttgccg cagtggaggg gaaataatgt ccattttaat cgataaaaac accaaggtta 1200

tctgccaggg ctttaccggt agccagggga ctttccactc agaacaggcc attgcatacg 1260

gcactaaaat ggttggcggc gtaaccccag gtaaaggcgg caccacccac ctcggcctgc 1320

cggtgttcaa caccgtgcgt gaagccgttg ctgccactgg cgctaccgct tctgttatct 1380

acgtaccagc accgttctgc aaagactcca ttctggaagc catcgacgca ggcatcaaac 1440

tgattatcac catcactgaa ggcatcccga cgctggatat gctgaccgtg aaagtgaagc 1500

tggatgaagc aggcgttcgt atgatcggcc cgaactgccc aggcgttatc actccgggtg 1560

aatgcaaaat cggtatccag cctggtcaca ttcacaaacc gggtaaagtg ggtatcgttt 1620

cccgttccgg tacactgacc tatgaagcgg ttaaacagac cacggattac ggtttcggtc 1680

agtcgacctg tgtcggtatc ggcggtgacc cgatcccggg ctctaacttt atcgacattc 1740

tcgaaatgtt cgaaaaagat ccgcagaccg aagcgatcgt gatgatcggt gagatcggcg 1800

gtagcgctga agaagaagca gctgcgtaca tcaaagagca cgttaccaag ccagttgtgg 1860

gttacatcgc tggtgtgact gcgccgaaag gcaaacgtat gggccacgcg ggtgccatca 1920

ttgccggtgg gaaagggact gcggatgaga aattcgctgc tctggaagcc gcaggcgtga 1980

aaaccgttcg cagcctggcg gatatcggtg aagcactgaa aactgttctg aaataa 2036

<210> 47
<211> 388
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 47

```
Met Asn Leu His Glu Tyr Gln Ala Lys Gln Leu Phe Ala Arg Tyr Gly
1               5                  10                  15

Leu Pro Ala Pro Val Gly Tyr Ala Cys Thr Thr Pro Arg Glu Ala Glu
            20                  25                  30

Glu Ala Ala Ser Lys Ile Gly Ala Gly Pro Trp Val Val Lys Cys Gln
        35                  40                  45

Val His Ala Gly Gly Arg Gly Lys Ala Gly Gly Val Lys Val Val Asn
    50                  55                  60

Ser Lys Glu Asp Ile Arg Ala Phe Ala Glu Asn Trp Leu Gly Lys Arg
65                  70                  75                  80

Leu Val Thr Tyr Gln Thr Asp Ala Asn Gly Gln Pro Val Asn Gln Ile
                85                  90                  95

Leu Val Glu Ala Ala Thr Asp Ile Ala Lys Glu Leu Tyr Leu Gly Ala
            100                 105                 110

Val Val Asp Arg Ser Ser Arg Arg Val Val Phe Met Ala Ser Thr Glu
        115                 120                 125

Gly Gly Val Glu Ile Glu Lys Val Ala Glu Glu Thr Pro His Leu Ile
    130                 135                 140

His Lys Val Ala Leu Asp Pro Leu Thr Gly Pro Met Pro Tyr Gln Gly
145                 150                 155                 160

Arg Glu Leu Ala Phe Lys Leu Gly Leu Glu Gly Lys Leu Val Gln Gln
                165                 170                 175

Phe Thr Lys Ile Phe Met Gly Leu Ala Thr Ile Phe Leu Glu Arg Asp
            180                 185                 190

Leu Ala Leu Ile Glu Ile Asn Pro Leu Val Ile Thr Lys Gln Gly Asp
        195                 200                 205

Leu Ile Cys Leu Asp Gly Lys Leu Gly Ala Asp Gly Asn Ala Leu Phe
    210                 215                 220

Arg Gln Pro Asp Leu Arg Glu Met Arg Asp Gln Ser Gln Glu Asp Pro
225                 230                 235                 240
```

```
Arg Glu Ala Gln Ala Ala Gln Trp Glu Leu Asn Tyr Val Ala Leu Asp
                245                 250                 255

Gly Asn Ile Gly Cys Met Val Asn Gly Ala Gly Leu Ala Met Gly Thr
            260                 265                 270

Met Asp Ile Val Lys Leu His Gly Gly Glu Pro Ala Asn Phe Leu Asp
        275                 280                 285

Val Gly Gly Gly Ala Thr Lys Glu Arg Val Thr Glu Ala Phe Lys Ile
    290                 295                 300

Ile Leu Ser Asp Asp Lys Val Lys Ala Val Leu Val Asn Ile Phe Gly
305                 310                 315                 320

Gly Ile Val Arg Cys Asp Leu Ile Ala Asp Gly Ile Ile Gly Ala Val
                325                 330                 335

Ala Glu Val Gly Val Asn Val Pro Val Val Val Arg Leu Glu Gly Asn
            340                 345                 350

Asn Ala Glu Leu Gly Ala Lys Lys Leu Ala Asp Ser Gly Leu Asn Ile
        355                 360                 365

Ile Ala Ala Lys Gly Leu Thr Asp Ala Ala Gln Gln Val Val Ala Ala
    370                 375                 380

Val Glu Gly Lys
385
```

<210> 48
<211> 289
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 48

```
Met Ser Ile Leu Ile Asp Lys Asn Thr Lys Val Ile Cys Gln Gly Phe
1               5                   10                  15

Thr Gly Ser Gln Gly Thr Phe His Ser Glu Gln Ala Ile Ala Tyr Gly
            20                  25                  30

Thr Lys Met Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Thr Thr His
        35                  40                  45
```

```
Leu Gly Leu Pro Val Phe Asn Thr Val Arg Glu Ala Val Ala Ala Thr
    50                  55                  60

Gly Ala Thr Ala Ser Val Ile Tyr Val Pro Ala Pro Phe Cys Lys Asp
65                  70                  75                  80

Ser Ile Leu Glu Ala Ile Asp Ala Gly Ile Lys Leu Ile Ile Thr Ile
                85                  90                  95

Thr Glu Gly Ile Pro Thr Leu Asp Met Leu Thr Val Lys Val Lys Leu
            100                 105                 110

Asp Glu Ala Gly Val Arg Met Ile Gly Pro Asn Cys Pro Gly Val Ile
        115                 120                 125

Thr Pro Gly Glu Cys Lys Ile Gly Ile Gln Pro Gly His Ile His Lys
    130                 135                 140

Pro Gly Lys Val Gly Ile Val Ser Arg Ser Gly Thr Leu Thr Tyr Glu
145                 150                 155                 160

Ala Val Lys Gln Thr Thr Asp Tyr Gly Phe Gly Gln Ser Thr Cys Val
                165                 170                 175

Gly Ile Gly Gly Asp Pro Ile Pro Gly Ser Asn Phe Ile Asp Ile Leu
            180                 185                 190

Glu Met Phe Glu Lys Asp Pro Gln Thr Glu Ala Ile Val Met Ile Gly
        195                 200                 205

Glu Ile Gly Gly Ser Ala Glu Glu Glu Ala Ala Ala Tyr Ile Lys Glu
    210                 215                 220

His Val Thr Lys Pro Val Val Gly Tyr Ile Ala Gly Val Thr Ala Pro
225                 230                 235                 240

Lys Gly Lys Arg Met Gly His Ala Gly Ala Ile Ile Ala Gly Gly Lys
                245                 250                 255

Gly Thr Ala Asp Glu Lys Phe Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Val Lys
            260                 265                 270
```

Thr Val Arg Ser Leu Ala Asp Ile Gly Glu Ala Leu Lys Thr Val Leu
275 280 285

Lys

<210> 49
<211> 3696
<212> ADN
<213> Mycobacterium bovis

<400> 49
atggccaaca taagttcacc attcgggcaa aacgaatggc tggttgaaga gatgtaccgc 60

aagttccgcg acgacccctc ctcggtcgat cccagctggc acgagttcct ggttgactac 120

agccccgaac ccacctccca accagctgcc gaaccaaccc gggttacctc gccactcgtt 180

gccgagcggg ccgctgcggc cgccccgcag gcacccccca agccggccga caccgcggcc 240

gcgggcaacg gcgtggtcgc cgcactggcc gccaaaactg ccgttccccc gccagccgaa 300

ggtgacgagg tagcggtgct gcgcggcgcc gccgcggccg tcgtcaagaa catgtccgcg 360

tcgttggagg tgccgacggc gaccagcgtc cgggcggtcc cggccaagct actgatcgac 420

aaccggatcg tcatcaacaa ccagttgaag cggacccgcg gcggcaagat ctcgttcacg 480

catttgctgg gctacgccct ggtgcaggcg gtgaagaaat tcccgaacat gaaccggcac 540

tacaccgaag tcgacggcaa gcccaccgcg gtcacgccgg cgcacaccaa tctcggcctg 600

gcgatcgacc tgcaaggcaa ggacgggaag cgttccctgg tggtggccgg catcaagcgg 660

tgcgagacca tgcgattcgc gcagttcgtc acggcctacg aagacatcgt acgccgggcc 720

cgcgacggca agctgaccac tgaagacttt gccggcgtga cgatttcgct gaccaatccc 780

ggaaccatcg gcaccgtgca ttcggtgccg cggctgatgc ccggccaggg cgccatcatc 840

ggcgtgggcg ccatggaata ccccgccgag tttcaaggcg ccagcgagga acgcatcgcc 900

gagctgggca tcggcaaatt gatcactttg acctccacct acgaccaccg catcatccag 960

ggcgcggaat cgggcgactt cctgcgcacc atccacgagt tgctgctctc ggatggcttc 1020

tgggacgagg tcttccgcga actgagcatc ccatatctgc cggtgcgctg gagcaccgac 1080

aaccccgact cgatcgtcga caagaacgct cgcgtcatga acttgatcgc ggcctaccgc 1140

aaccgcggcc atctgatggc cgataccgac ccgctgcggt tggacaaagc tcggttccgc 1200

agtcaccccg acctcgaagt gctgacccac ggcctgacgc tgtgggatct cgatcgggtg 1260

ttcaaggtcg acggctttgc cggtgcgcag tacaagaaac tgcgcgacgt gctgggcttg 1320

ctgcgcgatg cctactgccg ccacatcggc gtggagtacg cccatatcct cgaccccgaa 1380

caaaaggagt ggctcgaaca acgggtcgag accaagcacg tcaaacccac tgtggcccaa 1440

cagaaataca tcctcagcaa gctcaacgcc gccgaggcct ttgaaacgtt cctacagacc 1500

aagtacgtcg gccagaagcg gttctcgctg gaaggcgccg aaagcgtgat cccgatgatg 1560

gacgcggcga tcgaccagtg cgctgagcac ggcctcgacg aggtggtcat cgggatgccg 1620

caccggggcc ggctcaacgt gctggccaac atcgtcggca agccgtactc gcagatcttc 1680

accgagttcg agggcaacct gaatccgtcg caggcgcacg gctccggtga cgtcaagtac 1740

cacctgggcg ccaccgggct gtacctgcag atgttcggcg acaacgacat tcaggtgtcg 1800

ctgaccgcca acccgtcgca tctggaggcc gtcgacccgg tgctggaggg attggtgcgg 1860

gccaagcagg atctgctcga ccacggaagc atcgacagcg acggccaacg ggcgttctcg 1920

gtggtgccgc tgatgttgca tggcgatgcc gcgttcgccg gtcagggtgt ggtcgccgag 1980

acgctgaacc tggcgaatct gccgggctac cgcgtcggcg gcaccatcca catcatcgtc 2040

aacaaccaga tcggcttcac caccgcgccc gagtattcca ggtccagcga gtactgcacc 2100

gacgtcgcaa agatgatcgg ggcaccgatc tttcacgtca acggcgacga cccggaggcg 2160

tgtgtctggg tggcgcggtt ggcggtggac ttccgacaac ggttcaagaa ggacgtcgtc 2220

atcgacatgc tgtgctaccg ccgccgcggg cacaacgagg gtgacgaccc gtcgatgacc 2280

aacccctaca tgtacgacgt cgtcgacacc aagcgcgggg cccgcaaaag ctacaccgaa 2340

gccctgatcg gacgtggcga catctcgatg aaggaggccg aggacgcgct gcgcgactac 2400

cagggccagc tggaacgggt gttcaacgaa gtgcgcgagc tggagaagca cggtgtgcag 2460

ccgagcgagt cggtcgagtc cgaccagatg attcccgcgg ggctggccac tgcggtggac 2520

aagtcgctgc tggcccggat cggcgatgcg ttcctcgcct tgccgaacgg cttcaccgcg 2580

cacccgcgag tccaaccggt gctggagaag cgccgggaga tggcctatga aggcaagatc 2640

gactgggcct ttggcgagct gctggcgctg ggctcgctgg tggccgaagg caagctggtg 2700

cgcttgtcgg ggcaggacag ccgccgcggc accttctccc agcggcattc ggttctcatc 2760

gaccgccaca ctggcgagga gttcacacca ctgcagctgc tggcgaccaa ctccgacggc 2820

agcccgaccg gcggaaagtt cctggtctac gactcgccac tgtcggagta cgccgccgtc 2880

ggcttcgagt acggctacac tgtgggcaat ccggacgccg tggtgctctg ggaggcgcag 2940

ttcggcgact tcgtcaacgg cgcacagtcg atcatcgacg agttcatcag ctccggtgag 3000

gccaagtggg gccaattgtc caacgtcgtg ctgctgttac cgcacgggca cgaggggcag 3060

ggacccgacc acacttctgc ccggatcgaa cgcttcttgc agttgtgggc ggaaggttcg 3120

atgaccatcg cgatgccgtc gactccgtcg aactacttcc acctgctacg ccggcatgcc 3180

ctggacggca tccaacgccc gctgatcgtg ttcacgccca agtcgatgtt gcgtcacaag 3240

gccgccgtca gcgaaatcaa ggacttcacc gagatcaagt tccgctcagt gctggaggaa 3300

cccacctatg aggacggcat cggagaccgc aacaaggtca gccggatcct gctgaccagt 3360

ggcaagctgt attacgagct ggccgcccgc aaggccaagg acaaccgcaa tgacctcgcg 3420

atcgtgcggc ttgaacagct cgccccgctg cccaggcgtc gactgcgtga aacgctggac 3480

cgctacgaga acgtcaagga gttcttctgg gtccaagagg aaccggccaa ccagggtgcg 3540

tggccgcgat tcgggctcga actacccgag ctgctgcctg acaagttggc cgggatcaag 3600

cgaatctcgc gccgggcgat gtcagccccg tcgtcaggct cgtcgaaggt gcacgccgtc 3660

gaacagcagg agatcctcga cgaggcgttc ggctaa 3696

<210> 50
<211> 1231
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

<400> 50

Met	Ala	Asn	Ile	Ser	Ser	Pro	Phe	Gly	Gln	Asn	Glu
1				5				10			

Trp	Leu	Val	Glu	Glu	Met	Tyr	Arg	Lys	Phe	Arg	Asp
			15				20				25

Asp	Pro	Ser	Ser	Val	Asp	Pro	Ser	Trp	His	Glu	Phe
			30				35				40

Leu	Val	Asp	Tyr	Ser	Pro	Glu	Pro	Thr	Ser	Gln	Pro
			45				50				55

Ala	Ala	Glu	Pro	Thr	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	Leu	Val
			60				65				70

Ala	Glu	Arg	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	Gln	Ala	Pro
			75				80				85

Pro	Lys	Pro	Ala	Asp	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Asn	Gly
			90				95				100

Val	Val	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Val	Pro
			105				110				115

Pro	Pro	Ala	Glu	Gly	Asp	Glu	Val	Ala	Val	Leu	Arg
			120				125				130

Gly	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Ala
			135				140				145

```
Ala Val Val Lys Asn Met Ser Ala Ser Leu Glu Val Pro Thr Ala Thr
        115                 120                 125

Ser Val Arg Ala Val Pro Ala Lys Leu Leu Ile Asp Asn Arg Ile Val
    130                 135                 140

Ile Asn Asn Gln Leu Lys Arg Thr Arg Gly Gly Lys Ile Ser Phe Thr
145                 150                 155                 160

His Leu Leu Gly Tyr Ala Leu Val Gln Ala Val Lys Lys Phe Pro Asn
                165                 170                 175

Met Asn Arg His Tyr Thr Glu Val Asp Gly Lys Pro Thr Ala Val Thr
            180                 185                 190

Pro Ala His Thr Asn Leu Gly Leu Ala Ile Asp Leu Gln Gly Lys Asp
        195                 200                 205

Gly Lys Arg Ser Leu Val Val Ala Gly Ile Lys Arg Cys Glu Thr Met
    210                 215                 220

Arg Phe Ala Gln Phe Val Thr Ala Tyr Glu Asp Ile Val Arg Arg Ala
225                 230                 235                 240

Arg Asp Gly Lys Leu Thr Thr Glu Asp Phe Ala Gly Val Thr Ile Ser
                245                 250                 255

Leu Thr Asn Pro Gly Thr Ile Gly Thr Val His Ser Val Pro Arg Leu
            260                 265                 270

Met Pro Gly Gln Gly Ala Ile Ile Gly Val Gly Ala Met Glu Tyr Pro
        275                 280                 285

Ala Glu Phe Gln Gly Ala Ser Glu Glu Arg Ile Ala Glu Leu Gly Ile
    290                 295                 300

Gly Lys Leu Ile Thr Leu Thr Ser Thr Tyr Asp His Arg Ile Ile Gln
305                 310                 315                 320

Gly Ala Glu Ser Gly Asp Phe Leu Arg Thr Ile His Glu Leu Leu Leu
                325                 330                 335

Ser Asp Gly Phe Trp Asp Glu Val Phe Arg Glu Leu Ser Ile Pro Tyr
            340                 345                 350
```

```
Leu Pro Val Arg Trp Ser Thr Asp Asn Pro Asp Ser Ile Val Asp Lys
        355                 360                 365

Asn Ala Arg Val Met Asn Leu Ile Ala Ala Tyr Arg Asn Arg Gly His
    370                 375                 380

Leu Met Ala Asp Thr Asp Pro Leu Arg Leu Asp Lys Ala Arg Phe Arg
385                 390                 395                 400

Ser His Pro Asp Leu Glu Val Leu Thr His Gly Leu Thr Leu Trp Asp
                405                 410                 415

Leu Asp Arg Val Phe Lys Val Asp Gly Phe Ala Gly Ala Gln Tyr Lys
            420                 425                 430

Lys Leu Arg Asp Val Leu Gly Leu Leu Arg Asp Ala Tyr Cys Arg His
        435                 440                 445

Ile Gly Val Glu Tyr Ala His Ile Leu Asp Pro Glu Gln Lys Glu Trp
    450                 455                 460

Leu Glu Gln Arg Val Glu Thr Lys His Val Lys Pro Thr Val Ala Gln
465                 470                 475                 480

Gln Lys Tyr Ile Leu Ser Lys Leu Asn Ala Ala Glu Ala Phe Glu Thr
                485                 490                 495

Phe Leu Gln Thr Lys Tyr Val Gly Gln Lys Arg Phe Ser Leu Glu Gly
            500                 505                 510

Ala Glu Ser Val Ile Pro Met Met Asp Ala Ala Ile Asp Gln Cys Ala
        515                 520                 525

Glu His Gly Leu Asp Glu Val Val Ile Gly Met Pro His Arg Gly Arg
    530                 535                 540

Leu Asn Val Leu Ala Asn Ile Val Gly Lys Pro Tyr Ser Gln Ile Phe
545                 550                 555                 560

Thr Glu Phe Glu Gly Asn Leu Asn Pro Ser Gln Ala His Gly Ser Gly
                565                 570                 575
```

```
Asp Val Lys Tyr His Leu Gly Ala Thr Gly Leu Tyr Leu Gln Met Phe
            580                 585                 590

Gly Asp Asn Asp Ile Gln Val Ser Leu Thr Ala Asn Pro Ser His Leu
        595                 600                 605

Glu Ala Val Asp Pro Val Leu Glu Gly Leu Val Arg Ala Lys Gln Asp
    610                 615                 620

Leu Leu Asp His Gly Ser Ile Asp Ser Asp Gly Gln Arg Ala Phe Ser
625                 630                 635                 640

Val Val Pro Leu Met Leu His Gly Asp Ala Ala Phe Ala Gly Gln Gly
                645                 650                 655

Val Val Ala Glu Thr Leu Asn Leu Ala Asn Leu Pro Gly Tyr Arg Val
            660                 665                 670

Gly Gly Thr Ile His Ile Ile Val Asn Asn Gln Ile Gly Phe Thr Thr
        675                 680                 685

Ala Pro Glu Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Tyr Cys Thr Asp Val Ala Lys
    690                 695                 700

Met Ile Gly Ala Pro Ile Phe His Val Asn Gly Asp Asp Pro Glu Ala
705                 710                 715                 720

Cys Val Trp Val Ala Arg Leu Ala Val Asp Phe Arg Gln Arg Phe Lys
                725                 730                 735

Lys Asp Val Val Ile Asp Met Leu Cys Tyr Arg Arg Arg Gly His Asn
            740                 745                 750

Glu Gly Asp Asp Pro Ser Met Thr Asn Pro Tyr Met Tyr Asp Val Val
        755                 760                 765

Asp Thr Lys Arg Gly Ala Arg Lys Ser Tyr Thr Glu Ala Leu Ile Gly
    770                 775                 780

Arg Gly Asp Ile Ser Met Lys Glu Ala Glu Asp Ala Leu Arg Asp Tyr
785                 790                 795                 800

Gln Gly Gln Leu Glu Arg Val Phe Asn Glu Val Arg Glu Leu Glu Lys
                805                 810                 815
```

```
His Gly Val Gln Pro Ser Glu Ser Val Glu Ser Asp Gln Met Ile Pro
            820                 825                 830

Ala Gly Leu Ala Thr Ala Val Asp Lys Ser Leu Leu Ala Arg Ile Gly
        835                 840                 845

Asp Ala Phe Leu Ala Leu Pro Asn Gly Phe Thr Ala His Pro Arg Val
    850                 855                 860

Gln Pro Val Leu Glu Lys Arg Arg Glu Met Ala Tyr Glu Gly Lys Ile
865                 870                 875                 880

Asp Trp Ala Phe Gly Glu Leu Leu Ala Leu Gly Ser Leu Val Ala Glu
                885                 890                 895

Gly Lys Leu Val Arg Leu Ser Gly Gln Asp Ser Arg Arg Gly Thr Phe
            900                 905                 910

Ser Gln Arg His Ser Val Leu Ile Asp Arg His Thr Gly Glu Glu Phe
        915                 920                 925

Thr Pro Leu Gln Leu Leu Ala Thr Asn Ser Asp Gly Ser Pro Thr Gly
    930                 935                 940

Gly Lys Phe Leu Val Tyr Asp Ser Pro Leu Ser Glu Tyr Ala Ala Val
945                 950                 955                 960

Gly Phe Glu Tyr Gly Tyr Thr Val Gly Asn Pro Asp Ala Val Val Leu
                965                 970                 975

Trp Glu Ala Gln Phe Gly Asp Phe Val Asn Gly Ala Gln Ser Ile Ile
            980                 985                 990

Asp Glu Phe Ile Ser Ser Gly Glu  Ala Lys Trp Gly Gln  Leu Ser Asn
        995                 1000                1005

Val Val  Leu Leu Leu Pro His  Gly His Glu Gly Gln  Gly Pro Asp
    1010                1015                1020

His Thr  Ser Ala Arg Ile Glu  Arg Phe Leu Gln Leu  Trp Ala Glu
    1025                1030                1035
```

```
Gly Ser  Met Thr Ile Ala Met  Pro Ser Thr Pro Ser  Asn Tyr Phe
    1040                1045                1050

His Leu  Leu Arg Arg His Ala  Leu Asp Gly Ile Gln  Arg Pro Leu
    1055                1060                1065

Ile Val  Phe Thr Pro Lys Ser  Met Leu Arg His Lys  Ala Ala Val
    1070                1075                1080

Ser Glu  Ile Lys Asp Phe Thr  Glu Ile Lys Phe Arg  Ser Val Leu
    1085                1090                1095

Glu Glu  Pro Thr Tyr Glu Asp  Gly Ile Gly Asp Arg  Asn Lys Val
    1100                1105                1110

Ser Arg  Ile Leu Leu Thr Ser  Gly Lys Leu Tyr Tyr  Glu Leu Ala
    1115                1120                1125

Ala Arg  Lys Ala Lys Asp Asn  Arg Asn Asp Leu Ala  Ile Val Arg
    1130                1135                1140

Leu Glu  Gln Leu Ala Pro Leu  Pro Arg Arg Arg Leu  Arg Glu Thr
    1145                1150                1155

Leu Asp  Arg Tyr Glu Asn Val  Lys Glu Phe Phe Trp  Val Gln Glu
    1160                1165                1170

Glu Pro  Ala Asn Gln Gly Ala  Trp Pro Arg Phe Gly  Leu Glu Leu
    1175                1180                1185

Pro Glu  Leu Leu Pro Asp Lys  Leu Ala Gly Ile Lys  Arg Ile Ser
    1190                1195                1200

Arg Arg  Ala Met Ser Ala Pro  Ser Ser Gly Ser Ser  Lys Val His
    1205                1210                1215

Ala Val  Glu Gln Gln Glu Ile  Leu Asp Glu Ala Phe  Gly
    1220                1225                1230
```

<210> 51
<211> 1356
<212> ADN
<213> Porphyromonas gingivalis

<400> 51

atggaaatca aagaaatggt gagccttgca cgcaaggctc agaaggagta tcaagctacc 60

cataaccaag aagcagttga caacatttgc cgagctgcag caaaagttat ttatgaaaat 120

gcagctattc tggctcgcga agcagtagac gaaaccggca tgggcgttta cgaacacaaa 180

gtggccaaga atcaaggcaa atccaaaggt gtttggtaca acctccacaa taaaaaatcg 240

attggtatcc tcaatataga cgagcgtacc ggtatgatcg agattgcaaa gcctatcgga 300

gttgtaggag ccgtaacgcc gacgaccaac ccgatcgtta ctccgatgag caatatcatc 360

tttgctctta agacctgcaa tgccatcatt attgcccccc accccagatc caaaaaatgc 420

tctgcacacg cagttcgtct gatcaaagaa gctatcgctc cgttcaacgt accggaaggt 480

atggttcaga tcatcgaaga acccagcatc gagaagacgc aggaactcat gggcgccgta 540

gacgtagtag ttgctacggg tggtatgggc atggtgaagt ctgcatattc ttcaggaaag 600

ccttctttcg gtgttggagc cggtaacgtt caggtgatcg tggatagcaa catcgatttc 660

gaagctgctg cagaaaaaat catcaccggt cgtgctttcg acaacggtat catctgctca 720

ggcgaacaga gcatcatcta caacgaggct gacaaggaag cagttttcac agcattccgc 780

aaccacggtg catatttctg tgacgaagcc gaaggagatc gggctcgtgc agctatcttc 840

gaaaatggag ccatcgcgaa agatgtagta ggtcagagcg ttgccttcat tgccaagaaa 900

gcaaacatca atatccccga gggtacccgt attctcgttg ttgaagctcg cggcgtagga 960

gcagaagacg ttatctgtaa ggaaaagatg tgtcccgtaa tgtgcgccct cagctacaag 1020

cacttcgaag aaggtgtaga aatcgcacgt acgaacctcg ccaacgaagg taacggccac 1080

acctgtgcta tccactccaa caatcaggca cacatcatcc tcgcaggatc agagctgacg 1140

gtatctcgta tcgtagtgaa tgctccgagt gccactacag caggcggtca catccaaaac 1200

ggtcttgccg taaccaatac gctcggatgc ggatcatggg gtaataactc tatctccgag 1260

aacttcactt acaagcacct cctcaacatt tcacgcatcg caccgttgaa ttcaagcatt 1320

cacatccccg atgacaaaga aatctgggaa ctctaa 1356

<210> 52
<211> 451
<212> PRT
<213> Porphyromonas gingivalis

<400> 52
Met Glu Ile Lys Glu Met Val Ser Leu Ala Arg Lys Ala Gln Lys Glu
1 5 10 15

Tyr Gln Ala Thr His Asn Gln Glu Ala Val Asp Asn Ile Cys Arg Ala
20 25 30

```
Ala Ala Lys Val Ile Tyr Glu Asn Ala Ala Ile Leu Ala Arg Glu Ala
        35                  40                  45

Val Asp Glu Thr Gly Met Gly Val Tyr Glu His Lys Val Ala Lys Asn
    50                  55                  60

Gln Gly Lys Ser Lys Gly Val Trp Tyr Asn Leu His Asn Lys Lys Ser
65                  70                  75                  80

Ile Gly Ile Leu Asn Ile Asp Glu Arg Thr Gly Met Ile Glu Ile Ala
                85                  90                  95

Lys Pro Ile Gly Val Val Gly Ala Val Thr Pro Thr Thr Asn Pro Ile
            100                 105                 110

Val Thr Pro Met Ser Asn Ile Ile Phe Ala Leu Lys Thr Cys Asn Ala
        115                 120                 125

Ile Ile Ile Ala Pro His Pro Arg Ser Lys Lys Cys Ser Ala His Ala
    130                 135                 140

Val Arg Leu Ile Lys Glu Ala Ile Ala Pro Phe Asn Val Pro Glu Gly
145                 150                 155                 160

Met Val Gln Ile Ile Glu Glu Pro Ser Ile Glu Lys Thr Gln Glu Leu
                165                 170                 175

Met Gly Ala Val Asp Val Val Val Ala Thr Gly Gly Met Gly Met Val
            180                 185                 190

Lys Ser Ala Tyr Ser Ser Gly Lys Pro Ser Phe Gly Val Gly Ala Gly
        195                 200                 205

Asn Val Gln Val Ile Val Asp Ser Asn Ile Asp Phe Glu Ala Ala Ala
    210                 215                 220

Glu Lys Ile Ile Thr Gly Arg Ala Phe Asp Asn Gly Ile Ile Cys Ser
225                 230                 235                 240

Gly Glu Gln Ser Ile Ile Tyr Asn Glu Ala Asp Lys Glu Ala Val Phe
                245                 250                 255
```

```
Thr Ala Phe Arg Asn His Gly Ala Tyr Phe Cys Asp Glu Ala Glu Gly
            260                 265                 270

Asp Arg Ala Arg Ala Ala Ile Phe Glu Asn Gly Ala Ile Ala Lys Asp
        275                 280                 285

Val Val Gly Gln Ser Val Ala Phe Ile Ala Lys Lys Ala Asn Ile Asn
    290                 295                 300

Ile Pro Glu Gly Thr Arg Ile Leu Val Val Glu Ala Arg Gly Val Gly
305                 310                 315                 320

Ala Glu Asp Val Ile Cys Lys Glu Lys Met Cys Pro Val Met Cys Ala
                325                 330                 335

Leu Ser Tyr Lys His Phe Glu Glu Gly Val Glu Ile Ala Arg Thr Asn
            340                 345                 350

Leu Ala Asn Glu Gly Asn Gly His Thr Cys Ala Ile His Ser Asn Asn
        355                 360                 365

Gln Ala His Ile Ile Leu Ala Gly Ser Glu Leu Thr Val Ser Arg Ile
    370                 375                 380

Val Val Asn Ala Pro Ser Ala Thr Thr Ala Gly Gly His Ile Gln Asn
385                 390                 395                 400

Gly Leu Ala Val Thr Asn Thr Leu Gly Cys Gly Ser Trp Gly Asn Asn
                405                 410                 415

Ser Ile Ser Glu Asn Phe Thr Tyr Lys His Leu Leu Asn Ile Ser Arg
            420                 425                 430

Ile Ala Pro Leu Asn Ser Ser Ile His Ile Pro Asp Asp Lys Glu Ile
        435                 440                 445

Trp Glu Leu
    450
```

<210> 53
<211> 1116
<212> ADN
<213> Porphyromonas gingivalis

<400> 53
atgcaacttt tcaaactcaa gagtgtaaca catcactttg acacttttgc agaatttgcc 60

aaggaattct gtcttggaga acgcgacttg gtaattacca acgagttcat ctatgaaccg 120

tatatgaagg catgccagct cccctgccat tttgttatgc aggagaaata tgggcaaggc 180

gagccttctg acgaaatgat gaataacatc ttggcagaca tccgtaatat ccagttcgac 240

cgcgtaatcg gtatcggagg aggtacggtt attgacatct ctaaactttt cgttctgaaa 300

ggattaaatg atgtactcga tgcattcgac cgcaaaatac ctcttatcaa agagaaagaa 360

ctgatcattg tgcccacaac atgcggaacg ggtagcgagg tgacgaacat ttctatcgca 420

gaaatcaaaa gccgtcacac caaaatggga ttggctgacg atgccattgt tgcagaccat 480

gccatcatca tacctgaact tctgaagagc ttgcctttcc acttctacgc atgcagtgca 540

atcgatgctc ttatccatgc catcgagtca tacgtatctc ctaaagccag tccatattct 600

cgtctgttca gtgaggcggc ttgggacatt atcctggaag tattcaagaa aatcgccgaa 660

cacggccctg aataccgctt cgaaaagctg ggagaaatga tcatggccag caactatgcc 720

ggtatagcct tcggaaatgc aggagtagga gccgtccacg cactatccta cccgttggga 780

ggcaactatc acgtgccgca tggagaagca aactatcagt tcttcacaga ggtattcaaa 840

gtataccaaa agaagaatcc tttcggctat atagtcgaac tcaactggaa gctctccaag 900

atactgaact gccagcccga atacgtatat ccgaagctgg atgaacttct cggatgcctt 960

cttaccaaga aacctttgca cgaatacggc atgaaggacg aagaggtaag aggctttgcg 1020

gaatcagtgc ttaagacaca gcaaagattg ctcgccaaca actacgtaga gcttactgta 1080

gatgagatcg aaggtatcta cagaagactc tactaa 1116

<210> 54
<211> 371
<212> PRT
<213> Porphyromonas gingivalis

<400> 54
Met Gln Leu Phe Lys Leu Lys Ser Val Thr His His Phe Asp Thr Phe
1 5 10 15

Ala Glu Phe Ala Lys Glu Phe Cys Leu Gly Glu Arg Asp Leu Val Ile
20 25 30

Thr Asn Glu Phe Ile Tyr Glu Pro Tyr Met Lys Ala Cys Gln Leu Pro
35 40 45

```
Cys His Phe Val Met Gln Glu Lys Tyr Gly Gln Gly Glu Pro Ser Asp
    50                  55                  60

Glu Met Met Asn Asn Ile Leu Ala Asp Ile Arg Asn Ile Gln Phe Asp
65                  70                  75                  80

Arg Val Ile Gly Ile Gly Gly Gly Thr Val Ile Asp Ile Ser Lys Leu
                85                  90                  95

Phe Val Leu Lys Gly Leu Asn Asp Val Leu Asp Ala Phe Asp Arg Lys
            100                 105                 110

Ile Pro Leu Ile Lys Glu Lys Glu Leu Ile Ile Val Pro Thr Thr Cys
        115                 120                 125

Gly Thr Gly Ser Glu Val Thr Asn Ile Ser Ile Ala Glu Ile Lys Ser
    130                 135                 140

Arg His Thr Lys Met Gly Leu Ala Asp Asp Ala Ile Val Ala Asp His
145                 150                 155                 160

Ala Ile Ile Ile Pro Glu Leu Leu Lys Ser Leu Pro Phe His Phe Tyr
                165                 170                 175

Ala Cys Ser Ala Ile Asp Ala Leu Ile His Ala Ile Glu Ser Tyr Val
            180                 185                 190

Ser Pro Lys Ala Ser Pro Tyr Ser Arg Leu Phe Ser Glu Ala Ala Trp
        195                 200                 205

Asp Ile Ile Leu Glu Val Phe Lys Lys Ile Ala Glu His Gly Pro Glu
    210                 215                 220

Tyr Arg Phe Glu Lys Leu Gly Glu Met Ile Met Ala Ser Asn Tyr Ala
225                 230                 235                 240

Gly Ile Ala Phe Gly Asn Ala Gly Val Gly Ala Val His Ala Leu Ser
                245                 250                 255

Tyr Pro Leu Gly Gly Asn Tyr His Val Pro His Gly Glu Ala Asn Tyr
            260                 265                 270

Gln Phe Phe Thr Glu Val Phe Lys Val Tyr Gln Lys Lys Asn Pro Phe
        275                 280                 285
```

Gly Tyr Ile Val Glu Leu Asn Trp Lys Leu Ser Lys Ile Leu Asn Cys
290 295 300

Gln Pro Glu Tyr Val Tyr Pro Lys Leu Asp Glu Leu Leu Gly Cys Leu
305 310 315 320

Leu Thr Lys Lys Pro Leu His Glu Tyr Gly Met Lys Asp Glu Glu Val
325 330 335

Arg Gly Phe Ala Glu Ser Val Leu Lys Thr Gln Gln Arg Leu Leu Ala
340 345 350

Asn Asn Tyr Val Glu Leu Thr Val Asp Glu Ile Glu Gly Ile Tyr Arg
355 360 365

Arg Leu Tyr
370

<210> 55
<211> 1296
<212> ADN
<213> Porphyromonas gingivalis

<400> 55
atgaaagacg tattagcgga atatgcctcc cgaattgttt cggccgaaga agccgtaaaa 60

catatcaaaa atggagaacg ggtagctttg tcacatgctg ccggagttcc tcagagttgt 120

gttgatgcac tggtacaaca ggccgacctt ttccagaatg tcgaaattta tcacatgctt 180

tgtctcggcg aaggaaaata tatggcacct gaaatggccc ctcacttccg acacataacc 240

aattttgtag gtggtaattc tcgtaaagca gttgaggaaa atagagccga cttcattccg 300

gtattctttt atgaagtgcc atcaatgatt cgcaaagaca tccttcacat agatgtcgcc 360

atcgttcagc tttcaatgcc tgatgagaat ggttactgta gttttggagt atcttgcgat 420

tatagcaaac cggcagcaga aagcgctcat ttagttatag gggaaatcaa ccgtcaaatg 480

ccatatgtac atggcgacaa cttgattcac atatcgaagt tggattacat cgtgatggca 540

gactacccta tctattctct tgcaaagccc aaaatcggag aagtagaaga agctatcggg 600

cgtaattgtg ccgagcttat tgaagatggt gccacactcc aactcggtat cggcgcgatt 660

cctgatgcag ccctgttatt cctcaaggac aaaaaagatc tggggatcca taccgagatg 720

ttctccgatg gtgttgtcga attagttcgc agtggagtaa ttacaggaaa gaaaaagaca 780

cttcaccccg gaaagatggt cgcaaccttc ttaatgggaa gcgaagacgt atatcatttc 840

atcgacaaaa atcccgatgt agaactttat ccggtagatt acgtcaatga tccgcgagta 900

atcgctcaaa atgataatat ggtcagcatc aatagctgta tcgaaatcga tcttatggga 960

caagtcgtgt ccgaatgtat aggaagcaag caattcagcg gaaccggcgg tcaagtagat 1020

tatgttcgtg gagcagcatg gtctaaaaac ggcaaaagca tcatggcaat tccctcaaca 1080

gccaaaaacg gtactgcatc tcgaattgta cctataattg cagagggagc tgctgtaaca 1140

accctccgca acgaagtcga ttacgttgta accgaatacg gtatagcaca actcaaagga 1200

aagagtttgc gccagcgagc agaagctctt attgccatag cccacccgga tttcagagag 1260

gaactaacga aacatctccg caaacgtttc ggataa 1296

<210> 56
<211> 431
<212> PRT
<213> Porphyromonas gingivalis

<400> 56

```
Met Lys Asp Val Leu Ala Glu Tyr Ala Ser Arg Ile Val Ser Ala Glu
1               5                  10                  15

Glu Ala Val Lys His Ile Lys Asn Gly Glu Arg Val Ala Leu Ser His
            20                  25                  30

Ala Ala Gly Val Pro Gln Ser Cys Val Asp Ala Leu Val Gln Gln Ala
        35                  40                  45

Asp Leu Phe Gln Asn Val Glu Ile Tyr His Met Leu Cys Leu Gly Glu
    50                  55                  60

Gly Lys Tyr Met Ala Pro Glu Met Ala Pro His Phe Arg His Ile Thr
65                  70                  75                  80

Asn Phe Val Gly Gly Asn Ser Arg Lys Ala Val Glu Glu Asn Arg Ala
                85                  90                  95

Asp Phe Ile Pro Val Phe Phe Tyr Glu Val Pro Ser Met Ile Arg Lys
            100                 105                 110

Asp Ile Leu His Ile Asp Val Ala Ile Val Gln Leu Ser Met Pro Asp
        115                 120                 125
```

```
Glu Asn Gly Tyr Cys Ser Phe Gly Val Ser Cys Asp Tyr Ser Lys Pro
    130                 135                 140

Ala Ala Glu Ser Ala His Leu Val Ile Gly Glu Ile Asn Arg Gln Met
145                 150                 155                 160

Pro Tyr Val His Gly Asp Asn Leu Ile His Ile Ser Lys Leu Asp Tyr
                165                 170                 175

Ile Val Met Ala Asp Tyr Pro Ile Tyr Ser Leu Ala Lys Pro Lys Ile
            180                 185                 190

Gly Glu Val Glu Glu Ala Ile Gly Arg Asn Cys Ala Glu Leu Ile Glu
        195                 200                 205

Asp Gly Ala Thr Leu Gln Leu Gly Ile Gly Ala Ile Pro Asp Ala Ala
    210                 215                 220

Leu Leu Phe Leu Lys Asp Lys Lys Asp Leu Gly Ile His Thr Glu Met
225                 230                 235                 240

Phe Ser Asp Gly Val Val Glu Leu Val Arg Ser Gly Val Ile Thr Gly
                245                 250                 255

Lys Lys Lys Thr Leu His Pro Gly Lys Met Val Ala Thr Phe Leu Met
            260                 265                 270

Gly Ser Glu Asp Val Tyr His Phe Ile Asp Lys Asn Pro Asp Val Glu
        275                 280                 285

Leu Tyr Pro Val Asp Tyr Val Asn Asp Pro Arg Val Ile Ala Gln Asn
    290                 295                 300

Asp Asn Met Val Ser Ile Asn Ser Cys Ile Glu Ile Asp Leu Met Gly
305                 310                 315                 320

Gln Val Val Ser Glu Cys Ile Gly Ser Lys Gln Phe Ser Gly Thr Gly
                325                 330                 335

Gly Gln Val Asp Tyr Val Arg Gly Ala Ala Trp Ser Lys Asn Gly Lys
            340                 345                 350

Ser Ile Met Ala Ile Pro Ser Thr Ala Lys Asn Gly Thr Ala Ser Arg
        355                 360                 365
```

Ile Val Pro Ile Ile Ala Glu Gly Ala Ala Val Thr Thr Leu Arg Asn
370 375 380

Glu Val Asp Tyr Val Val Thr Glu Tyr Gly Ile Ala Gln Leu Lys Gly
385 390 395 400

Lys Ser Leu Arg Gln Arg Ala Glu Ala Leu Ile Ala Ile Ala His Pro
405 410 415

Asp Phe Arg Glu Glu Leu Thr Lys His Leu Arg Lys Arg Phe Gly
420 425 430

<210> 57
<211> 906
<212> ADN
<213> Clostridium acetobutylicum

<400> 57
atgattaaga gttttaatga aattatcatg aaggtaaaga gcaaagaaat gaaaaaagtt 60

gctgttgctg tagcacaaga cgagccagta cttgaagcag taagagatgc taagaaaaat 120

ggtattgcag atgctattct tgttggagac catgacgaaa tcgtgtcaat cgcgcttaaa 180

ataggaatgg atgtaaatga ttttgaaata gtaaacgagc ctaacgttaa gaaagctgct 240

ttaaaggcag tagagcttgt atcaactgga aaagctgata tggtaatgaa gggacttgta 300

aatacagcaa ctttcttaag atctgtatta aacaaagaag ttggacttag aacaggaaaa 360

actatgtctc acgttgcagt atttgaaact gagaaatttg atagactatt atttttaaca 420

gatgttgctt tcaatactta tcctgaatta aaggaaaaaa ttgatatagt aaacaattca 480

gttaaggttg cacatgcaat aggaattgaa aatccaaagg ttgctccaat ttgtgcagtt 540

gaggttataa accctaaaat gccatcaaca cttgatgcag caatgctttc aaaaatgagt 600

gacagaggac aaattaaagg ttgtgtagtt gacggacctt tagcacttga tatagcttta 660

tcagaagaag cagcacatca taagggagta acaggagaag ttgctggaaa agctgatatc 720

ttcttaatgc caaacataga aacaggaaat gtaatgtata agactttaac atatacaact 780

gattcaaaaa atggaggaat cttagttgga acttctgcac cagttgtttt aacttcaaga 840

gctgacagcc atgaaacaaa aatgaactct atagcacttg cagctttagt tgcaggcaat 900

aaataa 906

<210> 58
<211> 301
<212> PRT
<213> Clostridium acetobutylicum

<400> 58
Met Ile Lys Ser Phe Asn Glu Ile Ile Met Lys Val Lys Ser Lys Glu
1 5 10 15

Met Lys Lys Val Ala Val Ala Val Ala Gln Asp Glu Pro Val Leu Glu
20 25 30

Ala Val Arg Asp Ala Lys Lys Asn Gly Ile Ala Asp Ala Ile Leu Val
35 40 45

Gly Asp His Asp Glu Ile Val Ser Ile Ala Leu Lys Ile Gly Met Asp
50 55 60

Val Asn Asp Phe Glu Ile Val Asn Glu Pro Asn Val Lys Lys Ala Ala
65 70 75 80

Leu Lys Ala Val Glu Leu Val Ser Thr Gly Lys Ala Asp Met Val Met
85 90 95

Lys Gly Leu Val Asn Thr Ala Thr Phe Leu Arg Ser Val Leu Asn Lys
100 105 110

Glu Val Gly Leu Arg Thr Gly Lys Thr Met Ser His Val Ala Val Phe
115 120 125

Glu Thr Glu Lys Phe Asp Arg Leu Leu Phe Leu Thr Asp Val Ala Phe
130 135 140

Asn Thr Tyr Pro Glu Leu Lys Glu Lys Ile Asp Ile Val Asn Asn Ser
145 150 155 160

Val Lys Val Ala His Ala Ile Gly Ile Glu Asn Pro Lys Val Ala Pro
165 170 175

Ile Cys Ala Val Glu Val Ile Asn Pro Lys Met Pro Ser Thr Leu Asp
180 185 190

Ala Ala Met Leu Ser Lys Met Ser Asp Arg Gly Gln Ile Lys Gly Cys
195 200 205

Val Val Asp Gly Pro Leu Ala Leu Asp Ile Ala Leu Ser Glu Glu Ala
210 215 220

Ala His His Lys Gly Val Thr Gly Glu Val Ala Gly Lys Ala Asp Ile
225 230 235 240

Phe Leu Met Pro Asn Ile Glu Thr Gly Asn Val Met Tyr Lys Thr Leu
245 250 255

Thr Tyr Thr Thr Asp Ser Lys Asn Gly Gly Ile Leu Val Gly Thr Ser
260 265 270

Ala Pro Val Val Leu Thr Ser Arg Ala Asp Ser His Glu Thr Lys Met
275 280 285

Asn Ser Ile Ala Leu Ala Ala Leu Val Ala Gly Asn Lys
290 295 300

<210> 59
<211> 1068
<212> ADN
<213> Clostridium acetobutylicum

<400> 59
atgtatagat tactaataat caatcctggc tcgacctcaa ctaaaattgg tatttatgac 60

gatgaaaaag agatatttga gaagacttta agacattcag ctgaagagat agaaaaatat 120

aacactatat ttgatcaatt tcaattcaga aagaatgtaa ttttagatgc gttaaaagaa 180

gcaaacatag aagtaagttc tttaaatgct gtagttggaa gaggcggact cttaaagcca 240

atagtaagtg gaacttatgc agtaaatcaa aaaatgcttg aagaccttaa agtaggagtt 300

caaggtcagc atgcgtcaaa tcttggtgga attattgcaa atgaaatagc aaaagaaata 360

aatgttccag catacatagt tgatccagtt gttgtggatg agcttgatga agtttcaaga 420

atatcaggaa tggctgacat tccaagaaaa agtatattcc atgcattaaa tcaaaaagca 480

gttgctagaa gatatgcaaa agaagttgga aaaaaatacg aagatcttaa tttaatcgta 540

gtccacatgg gtggaggtac ttcagtaggt actcataaag atggtagagt aatagaagtt 600

aataatacac ttgatggaga aggtccattc tcaccagaaa gaagtggtgg agttccaata 660

ggagatcttg taagattgtg cttcagcaac aaatatactt atgaagaagt aatgaaaaag 720

ataaacggca aaggcggagt tgttagttac ttaaatacta tcgattttaa ggctgtagtt 780

gataaagctc ttgaaggaga taagaaatgt gcacttatat atgaagcttt cacattccag 840

gtagcaaaag agataggaaa atgttcaacc gttttaaaag gaaatgtaga tgcaataatc 900

ttaacaggcg gaattgcgta caacgagcat gtatgtaatg ccatagagga tagagtaaaa 960

ttcatagcac ctgtagttag atatggtgga gaagatgaac ttcttgcact tgcagaaggt 1020

ggacttagag ttttaagagg agaagaaaaa gctaaggaat acaaataa 1068

<210> 60
<211> 355
<212> PRT
<213> Clostridium acetobutylicum

<400> 60

```
Met Tyr Arg Leu Leu Ile Ile Asn Pro Gly Ser Thr Ser Thr Lys Ile
1               5                  10                  15

Gly Ile Tyr Asp Asp Glu Lys Glu Ile Phe Glu Lys Thr Leu Arg His
            20                  25                  30

Ser Ala Glu Glu Ile Glu Lys Tyr Asn Thr Ile Phe Asp Gln Phe Gln
        35                  40                  45

Phe Arg Lys Asn Val Ile Leu Asp Ala Leu Lys Glu Ala Asn Ile Glu
    50                  55                  60

Val Ser Ser Leu Asn Ala Val Val Gly Arg Gly Gly Leu Leu Lys Pro
65                  70                  75                  80

Ile Val Ser Gly Thr Tyr Ala Val Asn Gln Lys Met Leu Glu Asp Leu
                85                  90                  95

Lys Val Gly Val Gln Gly Gln His Ala Ser Asn Leu Gly Gly Ile Ile
            100                 105                 110

Ala Asn Glu Ile Ala Lys Glu Ile Asn Val Pro Ala Tyr Ile Val Asp
        115                 120                 125

Pro Val Val Val Asp Glu Leu Asp Glu Val Ser Arg Ile Ser Gly Met
    130                 135                 140

Ala Asp Ile Pro Arg Lys Ser Ile Phe His Ala Leu Asn Gln Lys Ala
145                 150                 155                 160

Val Ala Arg Arg Tyr Ala Lys Glu Val Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Leu
                165                 170                 175
```

Asn Leu Ile Val Val His Met Gly Gly Gly Thr Ser Val Gly Thr His
180 185 190

Lys Asp Gly Arg Val Ile Glu Val Asn Asn Thr Leu Asp Gly Glu Gly
195 200 205

Pro Phe Ser Pro Glu Arg Ser Gly Gly Val Pro Ile Gly Asp Leu Val
210 215 220

Arg Leu Cys Phe Ser Asn Lys Tyr Thr Tyr Glu Glu Val Met Lys Lys
225 230 235 240

Ile Asn Gly Lys Gly Gly Val Val Ser Tyr Leu Asn Thr Ile Asp Phe
245 250 255

Lys Ala Val Val Asp Lys Ala Leu Glu Gly Asp Lys Lys Cys Ala Leu
260 265 270

Ile Tyr Glu Ala Phe Thr Phe Gln Val Ala Lys Glu Ile Gly Lys Cys
275 280 285

Ser Thr Val Leu Lys Gly Asn Val Asp Ala Ile Ile Leu Thr Gly Gly
290 295 300

Ile Ala Tyr Asn Glu His Val Cys Asn Ala Ile Glu Asp Arg Val Lys
305 310 315 320

Phe Ile Ala Pro Val Val Arg Tyr Gly Gly Glu Asp Glu Leu Leu Ala
325 330 335

Leu Ala Glu Gly Gly Leu Arg Val Leu Arg Gly Glu Glu Lys Ala Lys
340 345 350

Glu Tyr Lys
355

<210> 61
<211> 906
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 61
atgattaaga gttttaatga aattatcatg aaggtaaaga gcaaagaaat gaaaaaagtt 60

gctgttgctg tagcacaaga cgagccagta cttgaagcag tacgcgatgc taagaaaaat 120

ggtattgcag atgctattct tgttggcgac catgacgaaa tcgtgtcaat cgcgcttaaa 180

ataggcatgg atgtaaatga ttttgaaata gtaaacgagc ctaacgttaa gaaagctgct 240

ttaaaggcag tagagctggt atcaactgga aaagctgata tggtaatgaa gggacttgta 300

aatacagcaa ctttcttacg ctctgtatta aacaaagaag ttggactgag aacaggaaaa 360

actatgtctc acgttgcagt atttgaaact gagaaatttg atcgtctgtt atttttaaca 420

gatgttgctt tcaatactta tcctgaatta aaggaaaaaa ttgatatcgt aaacaattca 480

gttaaggttg cacatgcaat aggtattgaa aatccaaagg ttgctccaat ttgtgcagtt 540

gaggttataa accctaaaat gccatcaaca cttgatgcag caatgctttc aaaaatgagt 600

gacagaggac aaattaaagg ttgtgtagtt gacggaccgt tagcacttga tatcgcttta 660

tcagaagaag cagcacatca taagggcgta acaggagaag ttgctggaaa agctgatatc 720

ttcttaatgc caaacattga aacaggaaat gtaatgtata agactttaac atatacaact 780

gatagcaaaa atggcggaat cttagttgga acttctgcac cagttgtttt aacttcacgc 840

gctgacagcc atgaaacaaa aatgaactct attgcacttg cagctttagt tgcaggcaat 900

aaataa 906

<210> 62
<211> 906
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 62
atgattaaga gttttaatga aattatcatg aaggtaaaga gcaaagaaat gaaaaaagtt 60

gctgttgctg tagcacaaga cgagccagta cttgaagcag tacgcgatgc taagaaaaat 120

ggtattgccg atgctattct ggttggcgac catgacgaaa tcgtgtctat cgcgctgaaa 180

ataggcatgg atgtaaatga ttttgaaatt gttaacgagc ctaacgttaa gaaagctgcg 240

ttaaaggcag tagagctggt atcaactgga aaagctgata tggtaatgaa gggactggta 300

aataccgcaa ctttcttacg ctctgtatta aacaaagaag ttggtctgcg tacaggaaaa 360

accatgtctc acgttgcagt atttgaaact gagaaatttg atcgtctgtt atttttaaca 420

gatgttgctt tcaatactta tcctgaatta aaggaaaaaa ttgatatcgt taacaatagc 480

gttaaggttg cacatgccat tggtattgaa aatccaaagg ttgctccaat ttgtgcagtt 540

gaggttatta acccgaaaat gccatcaaca cttgatgcag caatgctttc aaaaatgagt 600

gaccgcggac aaattaaagg ttgtgtagtt gacggaccgc tggcacttga tatcgcttta 660

tcagaagaag cagcacatca taaaggcgta acaggagaag ttgctggaaa agctgatatc 720

ttcttaatgc caaacattga aacaggaaat gtaatgtata agacgttaac ctataccact 780

gatagcaaaa atggcggcat cctggttgga acttctgcac cagttgtttt aacttcacgc 840

gctgacagcc atgaaacaaa aatgaactct attgcactgg cagcgctggt tgcaggcaat 900

aaataa 906

<210> 63
<211> 906
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 63
atgattaaga gttttaatga aattatcatg aaggtaaaga gcaaagaaat gaaaaaagtt 60

gctgttgctg ttgcacaaga cgagccggta ctggaagcgg tacgcgatgc taagaaaaat 120

ggtattgccg atgctattct ggttggcgac catgacgaaa tcgtctctat cgcgctgaaa 180

attggcatgg atgttaatga ttttgaaatt gttaacgagc ctaacgttaa gaaagctgcg 240

ctgaaggcgg tagagctggt ttccaccgga aaagctgata tggtaatgaa agggctggtg 300

aataccgcaa ctttcttacg cagcgtactg aacaaagaag ttggtctgcg taccggaaaa 360

accatgagtc acgttgcggt atttgaaact gagaaatttg atcgtctgct gtttctgacc 420

gatgttgctt tcaatactta tcctgaatta aaagaaaaaa ttgatatcgt taacaatagc 480

gttaaggttg cgcatgccat tggtattgaa aatccaaagg ttgctccaat ttgtgcagtt 540

gaggttatta acccgaaaat gccatcaaca cttgatgccg caatgcttag caaaatgagt 600

gaccgcggac aaattaaagg ttgtgtggtt gacggcccgc tggcactgga tatcgcgtta 660

agcgaagaag cggcacatca taaaggcgta accggcgaag ttgctggaaa agctgatatc 720

ttcctgatgc caaacattga aacaggcaat gtaatgtata aaacgttaac ctataccact 780

gatagcaaaa atggcggcat cctggttgga acttctgcac cagttgtttt aacctcacgc 840

gctgacagcc atgaaaccaa aatgaacagc attgcactgg cagcgctggt tgcaggcaat 900

aaataa 906

<210> 64
<211> 906
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 64
atgattaaaa gttttaacga aattatcatg aaagtgaaaa gcaaagagat gaaaaaagtg 60

gcggttgcgg ttgcgcagga tgaaccggtg ctggaagcgg tgcgcgatgc caaaaaaaac 120

ggtattgccg atgccattct ggtgggcgat cacgatgaaa ttgtctctat tgcgctgaaa 180

attggcatgg atgttaacga ttttgaaatt gttaatgaac cgaacgtgaa aaaagcggcg 240

ctgaaagcgg ttgaactggt ttccaccggt aaagccgata tggtgatgaa agggctggtg 300

aataccgcaa ccttcctgcg cagcgtgctg aataaagaag tgggtctgcg taccggtaaa 360

accatgagtc atgttgcggt gtttgaaacc gaaaaatttg accgtctgct gtttctgacc 420

gatgttgcgt ttaataccta tccggaactg aaagagaaaa ttgatatcgt taataacagc 480

gtgaaagtgg cgcatgccat tggtattgaa aacccgaaag tggcgccgat ttgcgcggtt 540

gaagtgatta acccgaaaat gccgtcaacg ctggatgccg cgatgctcag caaaatgagc 600

gatcgcggtc aaatcaaagg ctgtgtggtt gatggcccgc tggcgctgga tatcgcgctt 660

agcgaagaag cggcgcatca taaaggcgtg accggcgaag tggccggtaa agccgatatt 720

ttcctgatgc cgaatattga aaccggcaac gtgatgtata aaacgctgac ctataccacc 780

gacagcaaaa acggcggcat tctggtgggt accagcgcgc cggtggtgct gacctcgcgc 840

gccgacagcc atgaaaccaa aatgaacagc attgcgctgg cggcgctggt ggccggtaat 900

aaataa 906

<210> 65
<211> 1068
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 65

atgtatcgtt tactgattat caatcctggc tcgacctcaa ctaaaattgg tatttatgac 60

gatgaaaaag agatatttga gaagacttta cgtcattcag ctgaagagat agaaaaatat 120

aacactatat ttgatcaatt tcagttcaga aagaatgtaa ttctcgatgc gttaaaagaa 180

gcaaacattg aagtaagttc tttaaatgct gtagttggac gcggcggact gttaaagcca 240

atagtaagtg gaacttatgc agtaaatcaa aaaatgcttg aagaccttaa agtaggcgtt 300

caaggtcagc atgcgtcaaa tcttggtgga attattgcaa atgaaatagc aaaagaaata 360

aatgttccag catacatcgt tgatccagtt gttgtggatg agcttgatga agtttcacgt 420

atatcaggaa tggctgacat tccacgtaaa agtatattcc atgcattaaa tcaaaaagca 480

gttgctagac gctatgcaaa agaagttgga aaaaaatacg aagatcttaa tttaatcgtg 540

gtccacatgg gtggcggtac ttcagtaggt actcataaag atggtagagt aattgaagtt 600

aataatacac ttgatggaga aggtccattc tcaccagaaa gaagtggtgg cgttccaata 660

ggcgatcttg tacgtttgtg cttcagcaac aaatatactt atgaagaagt aatgaaaaag 720

ataaacggca aaggcggcgt tgttagttac ttaaatacta tcgattttaa ggctgtagtt 780

gataaagctc ttgaaggcga taagaaatgt gcacttatat atgaagcttt cacattccag 840

gtagcaaaag agataggaaa atgttcaacc gttttaaaag gaaatgtaga tgcaataatc 900

ttaacaggcg gaattgcgta caacgagcat gtatgtaatg ccatagagga tagagtaaaa 960

ttcattgcac ctgtagttcg ttatggtgga gaagatgaac ttcttgcact tgcagaaggt 1020

ggactgcgcg ttttacgcgg agaagaaaaa gctaaggaat acaaataa 1068

<210> 66
<211> 1068
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 66
atgtatcgtt tactgattat caatcctggc tcgacctcaa ctaaaattgg tatttatgac 60

gatgaaaaag agatatttga gaagacgtta cgtcattcag ctgaagagat tgaaaaatat 120

aacactatat ttgatcaatt tcagttccgc aagaatgtga ttctcgatgc gttaaaagaa 180

gcaaacattg aagtcagttc tttaaatgct gtagttggac gcggcggact gttaaagcca 240

attgtcagtg gaacttatgc agtaaatcaa aaaatgcttg aagaccttaa agtgggcgtt 300

caaggtcagc atgccagcaa tcttggtggc attattgcca atgaaatcgc aaaagaaatc 360

aatgttccag catacatcgt tgatccggtt gttgtggatg agcttgatga agttagccgt 420

ataagcggaa tggctgacat tccacgtaaa agtatattcc atgcattaaa tcaaaaagca 480

gttgctcgtc gctatgcaaa agaagttggt aaaaaatacg aagatcttaa tttaatcgtg 540

gtccacatgg gtggcggtac ttcagtaggt actcataaag atggtcgcgt gattgaagtt 600

aataatacac ttgatggcga aggtccattc tcaccagaac gtagtggtgg cgttccaatt 660

ggcgatctgg tacgtttgtg cttcagcaac aaatatactt atgaagaagt gatgaaaaag 720

ataaacggca aaggcggcgt tgttagttac ctgaatacta tcgattttaa ggctgtagtt 780

gataaagcgc ttgaaggcga taagaaatgt gcactgattt atgaagcttt caccttccag 840

gtagcaaaag agattggtaa atgttcaacc gttttaaaag gaaatgttga tgccattatc 900

ttaacaggcg gcattgctta caacgagcat gtatgtaatg ccattgagga tcgcgtaaaa 960

ttcattgcac ctgtagttcg ttatggtggc gaagatgaac tgctggcact ggcagaaggt 1020

ggactgcgcg ttttacgcgg cgaagaaaaa gcgaaggaat acaaataa 1068

<210> 67
<211> 1068
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 67
atgtatcgtc tgctgattat caatcctggc tcgacctcaa ctaaaattgg tatttatgac 60

gatgaaaaag agatatttga gaaaacgtta cgtcatagcg ctgaagagat tgaaaaatat 120

aacactattt ttgatcaatt tcagttccgc aagaatgtga ttctcgatgc gctgaaagaa 180

gcaaacattg aagtcagttc gctgaatgcg gtagttggtc gcggcggtct gctgaagcca 240

attgtcagcg gcacttatgc ggtaaatcaa aaaatgctgg aagacctgaa agtgggcgtt 300

caggggcagc atgccagcaa tcttggtggc attattgcca atgaaatcgc caaagaaatc 360

aatgttccgg catacatcgt tgatccggtt gttgtggatg agctggatga agttagccgt 420

atcagcggaa tggctgacat tccacgtaaa agtattttcc atgcactgaa tcaaaaagcg 480

gttgcgcgtc gctatgcaaa agaagttggt aaaaaatacg aagatcttaa tctgatcgtg 540

gtgcatatgg gtggcggtac tagcgtcggt actcataaag atggtcgcgt gattgaagtt 600

aataatacac ttgatggcga aggtccattc tcaccagaac gtagcggtgg cgttccaatt 660

ggcgatctgg tacgtttgtg cttcagcaac aaatatacct atgaagaagt gatgaaaaag 720

ataaacggca aaggcggcgt tgttagttac ctgaatacta tcgattttaa ggcggtagtt 780

gataaagcgc tggaaggcga taagaaatgt gcactgattt atgaagcgtt caccttccag 840

gtggcaaaag agattggtaa atgttcaacc gttctgaaag gcaatgttga tgccattatc 900

ctgaccggcg gcattgctta caacgagcat gtttgtaatg ccattgagga tcgcgtaaaa 960

ttcattgcac ctgtggttcg ttatggtggc gaagatgaac tgctggcact ggcagaaggt 1020

ggtctgcgcg ttttacgcgg cgaagaaaaa gcgaaagaat acaaataa 1068

<210> 68
<211> 1068
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 68
atgtatcgtc tgctgattat caacccgggc agcacctcaa ccaaaattgg tatttacgac 60

gatgaaaaag agatttttga aaaaacgctg cgtcacagcg cagaagagat tgaaaaatac 120

aacaccattt tcgatcagtt ccagttccgc aaaaacgtga ttctcgatgc gctgaaagaa 180

gccaatattg aagtctcctc gctgaatgcg gtggtcggtc gcggcggtct gctgaaaccg 240

attgtcagcg gcacttatgc ggttaatcag aaaatgctgg aagatctgaa agtgggcgtg 300

caggggcagc atgccagcaa tctcggcggc attatcgcca atgaaatcgc caaagagatc 360

aacgtgccgg cttatatcgt cgatccggtg gtggttgatg aactggatga agtcagccgt 420

atcagcggca tggcggatat tccgcgtaaa agcattttcc atgcgctgaa tcagaaagcg 480

gttgcgcgtc gctatgccaa agaagtgggt aaaaaatatg aagatctcaa tctgattgtg 540

gtgcatatgg gcggcggcac cagcgtcggt acgcataaag atggtcgcgt gattgaagtg 600

aataacacgc tggatggcga agggccgttc tcgccggaac gtagcggcgg cgtgccgatt 660

ggcgatctgg tgcgtctgtg tttcagcaat aaatacacct acgaagaagt gatgaaaaaa 720

atcaacggca aaggcggcgt ggttagctat ctgaatacca tcgattttaa agcggtggtt 780

gataaagcgc tggaaggcga taaaaaatgc gcgctgattt atgaagcgtt taccttccag 840

gtggcgaaag agattggtaa atgttcaacc gtgctgaaag gcaacgttga tgccattatt 900

ctgaccggcg gcattgctta taacgaacat gtttgtaatg ccattgaaga tcgcgtgaaa 960

tttattgcgc cggtggtgcg ttacggcggc gaagatgaac tgctggcgct ggcggaaggc 1020

ggtctgcgcg tgctgcgcgg cgaagaaaaa gcgaaagagt acaaataa 1068

<210> 69
<211> 1407
<212> ADN
<213> Clostridium biejerinckii

<400> 69
atgaataaag acacactaat acctacaact aaagatttaa aagtaaaaac aaatggtgaa 60

aacattaatt taaagaacta caaggataat tcttcatgtt tcggagtatt cgaaaatgtt 120

gaaaatgcta taagcagcgc tgtacacgca caaaagatat tatcccttca ttatacaaaa 180

gagcaaagag aaaaaatcat aactgagata agaaaggccg cattacaaaa taaagaggtc 240

ttggctacaa tgattctaga agaaacacat atgggaagat atgaggataa aatattaaaa 300

catgaattgg tagctaaata tactcctggt acagaagatt taactactac tgcttggtca 360

ggtgataatg gtcttacagt tgtagaaatg tctccatatg gtgttatagg tgcaataact 420

ccttctacga atccaactga aactgtaata tgtaatagca taggcatgat agctgctgga 480

aatgctgtag tatttaacgg acacccatgc gctaaaaaat gtgttgcctt tgctgttgaa 540

atgataaata aggcaattat ttcatgtggc ggtcctgaaa atctagtaac aactataaaa 600

aatccaacta tggagtctct agatgcaatt attaagcatc cttcaataaa acttctttgc 660

ggaactgggg gtccaggaat ggtaaaaacc ctcttaaatt ctggtaagaa agctataggt 720

gctggtgctg gaaatccacc agttattgta gatgatactg ctgatataga aaaggctggt 780

aggagcatca ttgaaggctg ttcttttgat aataatttac cttgtattgc agaaaaagaa 840

gtatttgttt ttgagaatgt tgcagatgat ttaatatcta acatgctaaa aaataatgct 900

gtaattataa atgaagatca agtatcaaaa ttaatagatt tagtattaca aaaaaataat 960

gaaactcaag aatactttat aaacaaaaaa tgggtaggaa aagatgcaaa attattctta 1020

gatgaaatag atgttgagtc tccttcaaat gttaaatgca taatctgcga agtaaatgca 1080

aatcatccat ttgttatgac agaactcatg atgccaatat tgccaattgt aagagttaaa 1140

gatatagatg aagctattaa atatgcaaag atagcagaac aaaatagaaa acatagtgcc 1200

tatatttatt ctaaaaatat agacaaccta aatagatttg aaagagaaat agatactact 1260

atttttgtaa agaatgctaa atcttttgct ggtgttggtt atgaagcaga aggatttaca 1320

actttcacta ttgctggatc tactggtgag ggaataacct ctgcaaggaa ttttacaaga 1380

caaagaagat gtgtacttgc cggctaa 1407

<210> 70
<211> 468
<212> PRT
<213> Clostridium biejerinckii

<400> 70
Met Asn Lys Asp Thr Leu Ile Pro Thr Thr Lys Asp Leu Lys Val Lys
1 5 10 15

Thr Asn Gly Glu Asn Ile Asn Leu Lys Asn Tyr Lys Asp Asn Ser Ser
20 25 30

Cys Phe Gly Val Phe Glu Asn Val Glu Asn Ala Ile Ser Ser Ala Val
35 40 45

His Ala Gln Lys Ile Leu Ser Leu His Tyr Thr Lys Glu Gln Arg Glu
50 55 60

Lys Ile Ile Thr Glu Ile Arg Lys Ala Ala Leu Gln Asn Lys Glu Val
65 70 75 80

Leu Ala Thr Met Ile Leu Glu Glu Thr His Met Gly Arg Tyr Glu Asp
85 90 95

Lys Ile Leu Lys His Glu Leu Val Ala Lys Tyr Thr Pro Gly Thr Glu
100 105 110

Asp Leu Thr Thr Thr Ala Trp Ser Gly Asp Asn Gly Leu Thr Val Val
115 120 125

Glu Met Ser Pro Tyr Gly Val Ile Gly Ala Ile Thr Pro Ser Thr Asn
130 135 140

Pro Thr Glu Thr Val Ile Cys Asn Ser Ile Gly Met Ile Ala Ala Gly
145 150 155 160

Asn Ala Val Val Phe Asn Gly His Pro Cys Ala Lys Lys Cys Val Ala
165 170 175

Phe Ala Val Glu Met Ile Asn Lys Ala Ile Ile Ser Cys Gly Gly Pro
180 185 190

Glu Asn Leu Val Thr Thr Ile Lys Asn Pro Thr Met Glu Ser Leu Asp
195 200 205

```
Ala Ile Ile Lys His Pro Ser Ile Lys Leu Leu Cys Gly Thr Gly Gly
    210                 215                 220

Pro Gly Met Val Lys Thr Leu Leu Asn Ser Gly Lys Lys Ala Ile Gly
225                 230                 235                 240

Ala Gly Ala Gly Asn Pro Pro Val Ile Val Asp Asp Thr Ala Asp Ile
                245                 250                 255

Glu Lys Ala Gly Arg Ser Ile Ile Glu Gly Cys Ser Phe Asp Asn Asn
            260                 265                 270

Leu Pro Cys Ile Ala Glu Lys Glu Val Phe Val Phe Glu Asn Val Ala
        275                 280                 285

Asp Asp Leu Ile Ser Asn Met Leu Lys Asn Asn Ala Val Ile Ile Asn
    290                 295                 300

Glu Asp Gln Val Ser Lys Leu Ile Asp Leu Val Leu Gln Lys Asn Asn
305                 310                 315                 320

Glu Thr Gln Glu Tyr Phe Ile Asn Lys Lys Trp Val Gly Lys Asp Ala
                325                 330                 335

Lys Leu Phe Leu Asp Glu Ile Asp Val Glu Ser Pro Ser Asn Val Lys
            340                 345                 350

Cys Ile Ile Cys Glu Val Asn Ala Asn His Pro Phe Val Met Thr Glu
        355                 360                 365

Leu Met Met Pro Ile Leu Pro Ile Val Arg Val Lys Asp Ile Asp Glu
    370                 375                 380

Ala Ile Lys Tyr Ala Lys Ile Ala Glu Gln Asn Arg Lys His Ser Ala
385                 390                 395                 400

Tyr Ile Tyr Ser Lys Asn Ile Asp Asn Leu Asn Arg Phe Glu Arg Glu
                405                 410                 415

Ile Asp Thr Thr Ile Phe Val Lys Asn Ala Lys Ser Phe Ala Gly Val
            420                 425                 430

Gly Tyr Glu Ala Glu Gly Phe Thr Thr Phe Thr Ile Ala Gly Ser Thr
        435                 440                 445
```

Gly Glu Gly Ile Thr Ser Ala Arg Asn Phe Thr Arg Gln Arg Arg Cys
450 455 460

Val Leu Ala Gly
465

<210> 71
<211> 1407
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 71
atgaataaag acacactaat acctacaact aaagatttaa aagtaaaaac aaatggtgaa 60

aacattaatt taaagaacta caaggataat tcttcatgtt tcggcgtatt cgaaaatgtt 120

gaaaatgcta taagcagcgc tgtacacgca caaaagatat tatcccttca ttatacaaaa 180

gagcaacgtg aaaaaatcat aactgagata agaaaggccg cattacaaaa taaagaggtc 240

ttggctacaa tgattctgga agaaacacat atgggacgtt atgaggataa aatattaaaa 300

catgaattgg tagctaaata tactcctggt acagaagatt taactactac tgcctggtca 360

ggtgataatg gtctgacagt tgtagaaatg tctccatatg gtgttattgg tgcaataact 420

ccttctacga atccaactga aactgtaata tgtaatagca taggcatgat tgctgctgga 480

aatgctgtag tatttaacgg acacccatgc gctaaaaaat gtgttgcctt tgctgttgaa 540

atgataaata aggcaattat ttcatgtggc ggtcctgaaa atctggtaac aactataaaa 600

aatccaacca tggagtctct ggatgcaatt attaagcatc cttcaataaa acttctttgc 660

ggaactgggg gtccaggaat ggtaaaaacc ctgttaaatt ctggtaagaa agctataggt 720

gctggtgctg gaaatccacc agttattgtc gatgatactg ctgatataga aaaggctggt 780

cgtagcatca ttgaaggctg ttcttttgat aataatttac cttgtattgc agaaaaagaa 840

gtatttgttt ttgagaatgt tgcagatgat ttaatatcta acatgctaaa aaataatgct 900

gtaattataa atgaagatca agtatcaaaa ttaatcgatt tagtattaca aaaaaataat 960

gaaactcaag aatactttat aaacaaaaaa tgggtaggaa aagatgcaaa attattcctc 1020

gatgaaatag atgttgagtc tccttcaaat gttaaatgca taatctgcga agtaaatgca 1080

aatcatccat ttgttatgac agaactgatg atgccaatat tgccaattgt acgcgttaaa 1140

gatatcgatg aagctattaa atatgcaaag atagcagaac aaaatagaaa acatagtgcc 1200

tatatttatt ctaaaaatat cgacaacctg aatcgctttg aacgtgaaat agatactact 1260

atttttgtaa agaatgctaa atcttttgct ggtgttggtt atgaagcaga aggatttaca 1320

actttcacta ttgctggatc tactggtgag ggaataacct ctgcacgtaa ttttacacgc 1380

caacgtcgct gtgtacttgc cggctaa 1407

<210> 72
<211> 1407
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 72
atgaataaag acacactgat ccctacaact aaagatttaa aagtaaaaac aaatggtgaa 60

aacattaatt taaagaacta caaagataat agcagttgtt tcggcgtatt cgaaaatgtt 120

gaaaatgcta tcagcagcgc tgtacacgca caaaagatat tatcgctgca ttatacaaaa 180

gagcaacgtg aaaaaatcat cactgagata cgtaaggccg cattacaaaa taaagaggtg 240

ctggctacaa tgattctgga agaaacacat atgggacgtt atgaggataa aatattaaaa 300

catgaactgg tagctaaata tactcctggt acagaagatt taactactac tgcctggagc 360

ggtgataatg gtctgacagt tgtagaaatg tctccatatg gtgttattgg tgcaataact 420

ccttctacca atccaactga aactgtaatt tgtaatagca ttggcatgat tgctgctgga 480

aatgctgtag tatttaacgg acacccatgc gctaaaaaat gtgttgcctt tgctgttgaa 540

atgatcaata aggcaattat tagctgtggc ggtccggaaa atctggtaac aactataaaa 600

aatccaacca tggagtctct ggatgccatt attaagcatc cttcaataaa actgctttgc 660

ggaactggcg gtccaggaat ggtaaaaacc ctgttaaatt ctggtaagaa agctattggt 720

gctggtgctg gaaatccacc agttattgtc gatgatactg ctgatattga aaaggctggt 780

cgtagcatca ttgaaggctg ttcttttgat aataatttac cttgtattgc agaaaaagaa 840

gtatttgttt ttgagaatgt tgcagatgat ttaatatcta acatgctgaa aaataatgct 900

gtaattatca atgaagatca ggtatcaaaa ttaatcgatt tagtattaca aaaaaataat 960

gaaactcaag aatactttat caacaaaaaa tgggtaggta aagatgcaaa attattcctc 1020

gatgaaatcg atgttgagtc tccttcaaat gttaaatgca ttatctgcga agtgaatgcc 1080

aatcatccat ttgttatgac agaactgatg atgccaatat tgccaattgt gcgcgttaaa 1140

gatatcgatg aagctattaa atatgcaaag attgcagaac aaaatagaaa acatagtgcc 1200

tatatttata gcaaaaatat cgacaacctg aatcgctttg aacgtgaaat cgatactact 1260

atttttgtaa agaatgctaa atcttttgct ggtgttggtt atgaagcaga aggatttacc 1320

actttcacta ttgctggatc tactggtgag ggcataacct ctgcacgtaa ttttacccgc 1380

caacgtcgct gtgtactggc cggctaa 1407

<210> 73
<211> 1407
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 73
atgaataaag acacgctgat cccgacaact aaagatctga aagtaaaaac caatggtgaa 60

aacattaatc tgaagaacta caaagataat agcagttgtt tcggcgtatt cgaaaatgtt 120

gaaaatgcta tcagcagcgc ggtacacgca caaaagatac tctcgctgca ttataccaaa 180

gagcaacgtg aaaaaatcat cactgagatc cgtaaggccg cattacaaaa taaagaggtg 240

ctggcaacaa tgattctgga agaaacacat atgggacgtt atgaggataa aatactgaaa 300

catgaactgg tggcgaaata tacgcctggt actgaagatt taaccaccac tgcctggagc 360

ggtgataatg gtctgaccgt tgtggaaatg tcgccttatg gtgttattgg tgcaattacg 420

ccttcaacca atccaactga aacggtaatt tgtaatagca ttggcatgat tgctgctgga 480

aatgcggtag tatttaacgg tcacccctgc gctaaaaaat gtgttgcctt tgctgttgaa 540

atgatcaata aagcgattat tagctgtggc ggtccggaaa atctggtaac cactataaaa 600

aatccaacca tggagtcgct ggatgccatt attaagcatc cttcaatcaa actgctgtgc 660

ggcactggcg gtccaggaat ggtgaaaacc ctgctgaata gcggtaagaa agcgattggt 720

gctggtgctg gaaatccacc agttattgtc gatgatactg ctgatattga aaaagcgggt 780

cgtagcatca ttgaaggctg ttcttttgat aataatttac cttgtattgc agaaaaagaa 840

gtatttgttt ttgagaatgt tgccgatgat ctgatctcta acatgctgaa aaataatgcg 900

gtgattatca atgaagatca ggttagcaaa ctgatcgatc tggtattaca aaaaaataat 960

gaaactcaag aatactttat caacaaaaaa tgggtaggta aagatgcaaa actgttcctc 1020

gatgaaatcg atgttgagtc gccttcaaat gttaaatgca ttatctgcga agtgaatgcc 1080

aatcatccat ttgtgatgac cgaactgatg atgccaattt tgccgattgt gcgcgttaaa 1140

gatatcgatg aagcgattaa atatgcaaag attgcagaac aaaatcgtaa acatagtgcc 1200

tatatttata gcaaaaatat cgacaacctg aatcgctttg aacgtgaaat cgataccact 1260

atttttgtga agaatgctaa atcttttgct ggtgttggtt atgaagcaga aggttttacc 1320

actttcacta ttgctggaag caccggtgaa ggcattacct ctgcacgtaa ttttacccgc 1380

caacgtcgct gtgtactggc cggctaa 1407

<210> 74
<211> 1407
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 74
atgaataaag atacgctgat cccgaccacc aaagatctga aagtgaaaac caacggcgaa 60

aatatcaacc tgaaaaacta taaagataac agcagttgct ttggcgtgtt tgaaaacgtt 120

gaaaacgcca tctccagcgc ggtgcatgcg caaaaaattc tctcgctgca ttacaccaaa 180

gagcagcgtg aaaaaattat caccgaaatc cgtaaagcgg cgctgcaaaa caaagaagtg 240

ctggcaacca tgatcctgga agaaacgcat atggggcgtt atgaagataa aattctgaaa 300

catgaactgg tggcgaaata cacgccgggc actgaagatc tgaccaccac cgcctggagc 360

ggcgataacg gcctgaccgt ggtggagatg tcgccttatg gcgtgattgg cgcgattacg 420

ccgtcaacca acccgaccga aacggtgatt tgtaacagca ttggcatgat tgccgcgggt 480

aatgcggtgg tgtttaacgg tcatccctgc gcgaaaaaat gtgtggcgtt tgccgttgag 540

atgatcaaca aagcgattat cagctgcggc ggcccggaaa atctggtgac caccatcaaa 600

aatccgacca tggaatcgct ggatgccatt atcaaacatc cttccatcaa actgctgtgc 660

ggcaccggcg gcccgggcat ggtgaaaacg ctgctgaaca gcggtaaaaa agcgattggc 720

gcgggcgcgg gtaacccgcc ggtgattgtc gatgacaccg ccgatattga aaaagcgggg 780

cgtagcatta ttgaaggctg ttcttttgat aacaacctgc cctgcattgc cgaaaaagaa 840

gtgtttgtct ttgaaaacgt cgccgatgat ctgatcagca atatgctgaa aaacaacgcg 900

gtgattatca atgaagatca ggttagcaaa ctgatcgatc tggtgctgca aaaaaacaac 960

gaaacgcagg aatattttat caacaaaaaa tgggttggta aagatgccaa actgtttctc 1020

gatgaaatcg atgttgaatc gccgtctaac gtgaaatgta ttatctgcga agtgaacgcc 1080

aaccatccgt ttgtgatgac cgaactgatg atgccgattc tgccgattgt gcgcgtgaaa 1140

gatatcgatg aagcgattaa atatgccaaa attgccgaac aaaaccgtaa acacagcgcc 1200

tatatttaca gcaaaaatat cgataacctg aaccgctttg aacgtgaaat cgataccacc 1260

atttttgtga aaaatgccaa aagttttgcc ggcgttggtt atgaagcgga aggttttacc 1320

acctttacca ttgccggtag caccggcgaa ggcattacca gcgcccgtaa ttttacccgc 1380

cagcgtcgct gcgtgctggc gggctaa 1407

<210> 75
<211> 1023
<212> ADN
<213> Geobacillus thermoglucosidasius

<400> 75
atgaaagctg cagtagtaga gcaatttaag gaaccattaa aaattaaaga agtggaaaag 60

ccatctattt catatggcga agtattagtc cgcattaaag catgcggtgt atgccatacg 120

gacttgcacg ccgctcatgg cgattggcca gtaaaaccaa aacttccttt aatccctggc 180

catgaaggag tcggaattgt tgaagaagtc ggtccggggg taacccattt aaaagtggga 240

gaccgcgttg gaattccttg gttatattct gcgtgcggcc attgcgaata ttgtttaagc 300

ggacaagaag cattatgtga acatcaacaa aacgccggct actcagtcga cgggggttat 360

gcagaatatt gcagagctgc gccagattat gtggtgaaaa ttcctgacaa cttatcgttt 420

gaagaagctg ctcctatttt ctgcgccgga gttactactt ataaagcgtt aaaagtcaca 480

ggtacaaaac cgggagaatg ggtagcgatc tatggcatcg gcggccttgg acatgttgcc 540

gtccagtatg cgaaagcgat ggggcttcat gttgttgcag tggatatcgg cgatgagaaa 600

ctggaacttg caaaagagct tggcgccgat cttgttgtaa atcctgcaaa agaaaatgcg 660

gcccaattta tgaaagagaa agtcggcgga gtacacgcgg ctgttgtgac agctgtatct 720

aaacctgctt ttcaatctgc gtacaattct atccgcagag gcggcacgtg cgtgcttgtc 780

ggattaccgc cggaagaaat gcctattcca atctttgata cggtattaaa cggaattaaa 840

attatcggtt ccattgtcgg cacgcggaaa gacttgcaag aagcgcttca gttcgctgca 900

gaaggtaaag taaaaaccat tattgaagtg caacctcttg aaaaaattaa cgaagtattt 960

gacagaatgc taaaaggaga aattaacgga cgggttgttt taacgttaga aaataataat 1020

taa 1023

<210> 76
<211> 340
<212> PRT
<213> Geobacillus thermoglucosidasius

<400> 76
Met Lys Ala Ala Val Val Glu Gln Phe Lys Glu Pro Leu Lys Ile Lys
1 5 10 15

Glu Val Glu Lys Pro Ser Ile Ser Tyr Gly Glu Val Leu Val Arg Ile
20 25 30

Lys Ala Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Ala Ala His Gly Asp
35 40 45

Trp Pro Val Lys Pro Lys Leu Pro Leu Ile Pro Gly His Glu Gly Val
50 55 60

Gly Ile Val Glu Glu Val Gly Pro Gly Val Thr His Leu Lys Val Gly
65 70 75 80

Asp Arg Val Gly Ile Pro Trp Leu Tyr Ser Ala Cys Gly His Cys Glu
85 90 95

Tyr Cys Leu Ser Gly Gln Glu Ala Leu Cys Glu His Gln Gln Asn Ala
100 105 110

Gly Tyr Ser Val Asp Gly Gly Tyr Ala Glu Tyr Cys Arg Ala Ala Pro
115 120 125

Asp Tyr Val Val Lys Ile Pro Asp Asn Leu Ser Phe Glu Glu Ala Ala
130 135 140

Pro Ile Phe Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Leu Lys Val Thr
145 150 155 160

Gly Thr Lys Pro Gly Glu Trp Val Ala Ile Tyr Gly Ile Gly Gly Leu
165 170 175

Gly His Val Ala Val Gln Tyr Ala Lys Ala Met Gly Leu His Val Val
180 185 190

Ala Val Asp Ile Gly Asp Glu Lys Leu Glu Leu Ala Lys Glu Leu Gly
195 200 205

Ala Asp Leu Val Val Asn Pro Ala Lys Glu Asn Ala Ala Gln Phe Met
210 215 220

Lys Glu Lys Val Gly Gly Val His Ala Ala Val Val Thr Ala Val Ser
225 230 235 240

Lys Pro Ala Phe Gln Ser Ala Tyr Asn Ser Ile Arg Arg Gly Gly Thr
245 250 255

Cys Val Leu Val Gly Leu Pro Pro Glu Glu Met Pro Ile Pro Ile Phe
260 265 270

Asp Thr Val Leu Asn Gly Ile Lys Ile Ile Gly Ser Ile Val Gly Thr
275 280 285

Arg Lys Asp Leu Gln Glu Ala Leu Gln Phe Ala Ala Glu Gly Lys Val
290 295 300

Lys Thr Ile Ile Glu Val Gln Pro Leu Glu Lys Ile Asn Glu Val Phe
305 310 315 320

Asp Arg Met Leu Lys Gly Glu Ile Asn Gly Arg Val Val Leu Thr Leu
325 330 335

Glu Asn Asn Asn
340

<210> 77
<211> 4090
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 77
atggctatcg aaatcaaagt accggacatc ggggctgatg aagttgaaat caccgagatc 60

ctggtcaaag tgggcgacaa agttgaagcc gaacagtcgc tgatcaccgt agaaggcgac 120

aaagcctcta tggaagttcc gtctccgcag gcgggtatcg ttaaagagat caaagtctct 180

gttggcgata aaacccagac cggcgcactg attatgattt tcgattccgc cgacggtgca 240

gcagacgctg cacctgctca ggcagaagag aagaaagaag cagctccggc agcagcacca 300

gcggctgcgg cggcaaaaga cgttaacgtt ccggatatcg gcagcgacga agttgaagtg 360

accgaaatcc tggtgaaagt tggcgataaa gttgaagctg aacagtcgct gatcaccgta 420

gaaggcgaca aggcttctat ggaagttccg gctccgtttg ctggcaccgt gaaagagatc 480

aaagtgaacg tgggtgacaa agtgtctacc ggctcgctga ttatggtctt cgaagtcgcg 540

ggtgaagcag gcgcggcagc tccggccgct aaacaggaag cagctccggc agcggcccct 600

gcaccagcgg ctggcgtgaa agaagttaac gttccggata tcggcggtga cgaagttgaa 660

gtgactgaag tgatggtgaa agtgggcgac aaagttgccg ctgaacagtc actgatcacc 720

gtagaaggcg acaaagcttc tatggaagtt ccggcgccgt ttgcaggcgt cgtgaaggaa 780

ctgaaagtca acgttggcga taaagtgaaa actggctcgc tgattatgat cttcgaagtt 840

gaaggcgcag cgcctgcggc agctcctgcg aaacaggaag cggcagcgcc ggcaccggca 900

gcaaaagctg aagccccggc agcagcacca gctgcgaaag cggaaggcaa atctgaattt 960

gctgaaaacg acgcttatgt tcacgcgact ccgctgatcc gccgtctggc acgcgagttt 1020

ggtgttaacc ttgcgaaagt gaagggcact ggccgtaaag gtcgtatcct gcgcgaagac 1080

gttcaggctt acgtgaaaga agctatcaaa cgtgcagaag cagctccggc agcgactggc 1140

ggtggtatcc ctggcatgct gccgtggccg aaggtggact tcagcaagtt tggtgaaatc 1200

gaagaagtgg aactgggccg catccagaaa atctctggtg cgaacctgag ccgtaactgg 1260

gtaatgatcc cgcatgttac tcacttcgac aaaaccgata tcaccgagtt ggaagcgttc 1320

cgtaaacagc agaacgaaga agcggcgaaa cgtaagctgg atgtgaagat caccccggtt 1380

gtcttcatca tgaaagccgt tgctgcagct cttgagcaga tgcctcgctt caatagttcg 1440

ctgtcggaag acggtcagcg tctgaccctg aagaaataca tcaacatcgg tgtggcggtg 1500

gataccccga acggtctggt tgttccggta ttcaaagacg tcaacaagaa aggcatcatc 1560

gagctgtctc gcgagctgat gactatttct aagaaagcgc gtgacggtaa gctgactgcg 1620

ggcgaaatgc agggcggttg cttcaccatc tccagcatcg gcggcctggg tactacccac 1680

ttcgcgccga ttgtgaacgc gccggaagtg gctatcctcg gcgtttccaa gtccgcgatg 1740

gagccggtgt ggaatggtaa agagttcgtg ccgcgtctga tgctgccgat ttctctctcc 1800

ttcgaccacc gcgtgatcga cggtgctgat ggtgcccgtt tcattaccat cattaacaac 1860

acgctgtctg acattcgccg tctggtgatg taagtaaaag agccggccca acggccggct 1920

tttttctggt aatctcatga atgtattgag gttattagcg aatagacaaa tcggttgccg 1980

tttgttgttt aaaaattgtt aacaattttg taaaataccg acggatagaa cgacccggtg 2040

gtggttaggg tattacttca cataccctat ggatttctgg gtgcagcaag gtagcaagcg 2100

ccagaatccc caggagctta cataagtaag tgactggggt gagggcgtga agctaacgcc 2160

gctgcggcct gaaagacgac gggtatgacc gccggagata aatatataga ggtcatgatg 2220

agtactgaaa tcaaaactca ggtcgtggta cttggggcag gccccgcagg ttactccgct 2280

gccttccgtt gcgctgattt aggtctggaa accgtaatcg tagaacgtta caacaccctt 2340

ggcggtgttt gtctgaacgt gggttgtatc ccttctaaag cgctgctgca cgtggcaaaa 2400

gttatcgaag aagcgaaagc gctggccgaa cacggcatcg ttttcggcga accgaaaact 2460

gacattgaca agatccgcac ctggaaagaa aaagtcatca ctcagctgac cggtggtctg 2520

gctggcatgg ccaaaggtcg taaagtgaag gtggttaacg gtctgggtaa atttaccggc 2580

gctaacaccc tggaagtgga aggcgaaaac ggcaaaaccg tgatcaactt cgacaacgcc 2640

atcatcgcgg cgggttcccg tccgattcag ctgccgttta tcccgcatga agatccgcgc 2700

gtatgggact ccaccgacgc gctggaactg aaatctgtac cgaaacgcat gctggtgatg 2760

ggcggcggta tcatcggtct ggaaatgggt accgtatacc atgcgctggg ttcagagatt 2820

gacgtggtgg aaatgttcga ccaggttatc ccggctgccg acaaagacgt ggtgaaagtc 2880

ttcaccaaac gcatcagcaa gaaatttaac ctgatgctgg aagccaaagt gactgccgtt 2940

gaagcgaaag aagacggtat ttacgtttcc atggaaggta aaaaagcacc ggcggaagcg 3000

cagcgttacg acgcagtgct ggtcgctatc ggccgcgtac cgaatggtaa aaacctcgat 3060

gcaggtaaag ctggcgtgga agttgacgat cgcggcttca tccgcgttga caaacaaatg 3120

cgcaccaacg tgccgcacat ctttgctatc ggcgatatcg tcggtcagcc gatgctggcg 3180

cacaaaggtg tccatgaagg ccacgttgcc gcagaagtta tctccggtct gaaacactac 3240

ttcgatccga aagtgatccc atccatcgcc tacactaaac cagaagtggc atgggtcggt 3300

ctgaccgaga aagaagcgaa agagaaaggc atcagctacg aaaccgccac cttcccgtgg 3360

gctgcttccg gccgtgctat cgcttctgac tgcgcagatg gtatgaccaa actgatcttc 3420

gacaaagaga cccaccgtgt tatcggcggc gcgattgtcg gcaccaacgg cggcgagctg 3480

ctgggtgaga tcggcctggc tatcgagatg ggctgtgacg ctgaagacat cgccctgacc 3540

atccacgctc acccgactct gcacgagtcc gttggcctgg cggcggaagt gttcgaaggc 3600

agcatcaccg acctgccaaa cgccaaagcg aagaaaaagt aacttttttct ttcaggaaaa 3660

aagcataagc ggctccggga gccgcttttt ttatgcctga tgtttagaac tatgtcactg 3720

ttcataaacc gctacacctc atacatactt taagggcgaa ttctgcagat atccatcaca 3780

ctggcggccg ctcgagcatg catctagcac atccggcaat taaaaaagcg gctaaccacg 3840

ccgctttttt tacgtctgca atttaccttt ccagtcttct tgctccacgt tcagagagac 3900

gttcgcatac tgctgaccgt tgctcgttat tcagcctgac agtatggtta ctgtcgttta 3960

gacgttgtgg gcggctctcc tgaactttct cccgaaaaac ctgacgttgt tcaggtgatg 4020

ccgattgaac acgctggcgg gcgttatcac gttgctgttg attcagtggg cgctgctgta 4080

ctttttcctt 4090

<210> 78
<211> 475
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 78

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

```
Pro Arg Ile Trp Asp Ser Thr Asp Ala Leu Glu Leu Lys Glu Val Pro
                165                 170                 175

Glu Arg Leu Leu Val Met Gly Gly Gly Ile Ile Gly Leu Glu Met Gly
            180                 185                 190

Thr Val Tyr His Ala Leu Gly Ser Gln Ile Asp Val Val Glu Met Phe
        195                 200                 205

Asp Gln Val Ile Pro Ala Ala Asp Lys Asp Ile Val Lys Val Phe Thr
    210                 215                 220

Lys Arg Ile Ser Lys Lys Phe Asn Leu Met Leu Glu Thr Lys Val Thr
225                 230                 235                 240

Ala Val Glu Ala Lys Glu Asp Gly Ile Tyr Val Thr Met Glu Gly Lys
                245                 250                 255

Lys Ala Pro Ala Glu Pro Gln Arg Tyr Asp Ala Val Leu Val Ala Ile
            260                 265                 270

Gly Arg Val Pro Asn Gly Lys Asn Leu Asp Ala Gly Lys Ala Gly Val
        275                 280                 285

Glu Val Asp Asp Arg Gly Phe Ile Arg Val Asp Lys Gln Leu Arg Thr
    290                 295                 300

Asn Val Pro His Ile Phe Ala Ile Gly Asp Ile Val Gly Gln Pro Met
305                 310                 315                 320

Leu Ala His Lys Gly Val His Glu Gly His Val Ala Ala Glu Val Ile
                325                 330                 335

Ala Gly Lys Lys His Tyr Phe Asp Pro Lys Val Ile Pro Ser Ile Ala
            340                 345                 350

Tyr Thr Glu Pro Glu Val Ala Trp Val Gly Leu Thr Glu Lys Glu Ala
        355                 360                 365

Lys Glu Lys Gly Ile Ser Tyr Glu Thr Ala Thr Phe Pro Trp Ala Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Arg Ala Ile Ala Ser Asp Cys Ala Asp Gly Met Thr Lys Leu
385                 390                 395                 400
```

Ile Phe Asp Lys Glu Ser His Arg Val Ile Gly Gly Ala Ile Val Gly
405 410 415

Thr Asn Gly Gly Glu Leu Leu Gly Glu Ile Gly Leu Ala Ile Glu Met
420 425 430

Gly Cys Asp Ala Glu Asp Ile Ala Leu Thr Ile His Ala His Pro Thr
435 440 445

Leu His Glu Ser Val Gly Leu Ala Ala Glu Val Phe Glu Gly Ser Ile
450 455 460

Thr Asp Leu Pro Asn Pro Lys Ala Lys Lys Lys
465 470 475

<210> 79
<211> 475
<212> PRT
<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 79
Met Met Ser Thr Glu Ile Lys Thr Gln Val Val Val Leu Gly Ala Gly
1 5 10 15

Pro Ala Gly Tyr Ser Ala Ala Phe Arg Cys Ala Asp Leu Gly Leu Glu
20 25 30

Thr Val Ile Val Glu Arg Tyr Ser Thr Leu Gly Gly Val Cys Leu Asn
35 40 45

Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys Ala Leu Leu His Val Ala Lys Val Ile
50 55 60

Glu Glu Ala Lys Ala Leu Ala Glu His Gly Ile Val Phe Gly Glu Pro
65 70 75 80

Lys Thr Asp Ile Asp Lys Ile Arg Thr Trp Lys Glu Lys Val Ile Thr
85 90 95

Gln Leu Thr Gly Gly Leu Ala Gly Met Ala Lys Gly Arg Lys Val Lys
100 105 110

Val Val Asn Gly Leu Gly Lys Phe Thr Gly Ala Asn Thr Leu Glu Val
115 120 125

```
Glu Gly Glu Asn Gly Lys Thr Val Ile Asn Phe Asp Asn Ala Ile Ile
    130                 135                 140

Ala Ala Gly Ser Arg Pro Ile Gln Leu Pro Phe Ile Pro His Glu Asp
145                 150                 155                 160

Pro Arg Val Trp Asp Ser Thr Asp Ala Leu Glu Leu Lys Ser Val Pro
                165                 170                 175

Lys Arg Met Leu Val Met Gly Gly Gly Ile Ile Gly Leu Glu Met Gly
            180                 185                 190

Thr Val Tyr His Ala Leu Gly Ser Glu Ile Asp Val Val Glu Met Phe
        195                 200                 205

Asp Gln Val Ile Pro Ala Ala Asp Lys Asp Val Val Lys Val Phe Thr
    210                 215                 220

Lys Arg Ile Ser Lys Lys Phe Asn Leu Met Leu Glu Ala Lys Val Thr
225                 230                 235                 240

Ala Val Glu Ala Lys Glu Asp Gly Ile Tyr Val Ser Met Glu Gly Lys
                245                 250                 255

Lys Ala Pro Ala Glu Ala Gln Arg Tyr Asp Ala Val Leu Val Ala Ile
            260                 265                 270

Gly Arg Val Pro Asn Gly Lys Asn Leu Asp Ala Gly Lys Ala Gly Val
        275                 280                 285

Glu Val Asp Asp Arg Gly Phe Ile Arg Val Asp Lys Gln Met Arg Thr
    290                 295                 300

Asn Val Pro His Ile Phe Ala Ile Gly Asp Ile Val Gly Gln Pro Met
305                 310                 315                 320

Leu Ala His Lys Gly Val His Glu Gly His Val Ala Ala Glu Val Ile
                325                 330                 335

Ser Gly Leu Lys His Tyr Phe Asp Pro Lys Val Ile Pro Ser Ile Ala
            340                 345                 350
```

Tyr Thr Lys Pro Glu Val Ala Trp Val Gly Leu Thr Glu Lys Glu Ala
355 360 365

Lys Glu Lys Gly Ile Ser Tyr Glu Thr Ala Thr Phe Pro Trp Ala Ala
370 375 380

Ser Gly Arg Ala Ile Ala Ser Asp Cys Ala Asp Gly Met Thr Lys Leu
385 390 395 400

Ile Phe Asp Lys Glu Thr His Arg Val Ile Gly Gly Ala Ile Val Gly
405 410 415

Thr Asn Gly Gly Glu Leu Leu Gly Glu Ile Gly Leu Ala Ile Glu Met
420 425 430

Gly Cys Asp Ala Glu Asp Ile Ala Leu Thr Ile His Ala His Pro Thr
435 440 445

Leu His Glu Ser Val Gly Leu Ala Ala Glu Val Phe Glu Gly Ser Ile
450 455 460

Thr Asp Leu Pro Asn Ala Lys Ala Lys Lys Lys
465 470 475

<210> 80
<211> 347
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 80
ataataatac atatgaacca tgcgagttac gggcctataa gccaggcgag atatgatcta 60

tatcaatttc tcatctataa tgctttgtta gtatctcgtc gccgacttaa taaagagaga 120

gttagtgtga aagctgacaa ccctttttgat cttttacttc ctgctgcaat ggccaaagtg 180

gccgaagagg cgggtgtcta taaagcaacg aaacatccgc ttaagacttt ctatctggcg 240

attaccgccg gtgttttcat ctcaatcgca ttcaccactg gcacaggcac agaaggtagg 300

tgttacatgt cagaacgttt acacaatgac gtggatccta ttattat 347

<210> 81
<211> 4678
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 81
aagaggtaaa agaataatgg ctatcgaaat caaagtaccg gacatcgggg ctgatgaagt 60

tgaaatcacc gagatcctgg tcaaagtggg cgacaaagtt gaagccgaac agtcgctgat 120

caccgtagaa ggcgacaaag cctctatgga agttccgtct ccgcaggcgg gtatcgttaa 180

agagatcaaa gtctctgttg gcgataaaac ccagaccggc gcactgatta tgattttcga 240

ttccgccgac ggtgcagcag acgctgcacc tgctcaggca gaagagaaga aagaagcagc 300

tccggcagca gcaccagcgg ctgcggcggc aaaagacgtt aacgttccgg atatcggcag 360

cgacgaagtt gaagtgaccg aaatcctggt gaaagttggc gataaagttg aagctgaaca 420

gtcgctgatc accgtagaag gcgacaaggc ttctatggaa gttccggctc cgtttgctgg 480

caccgtgaaa gagatcaaag tgaacgtggg tgacaaagtg tctaccggct cgctgattat 540

ggtcttcgaa gtcgcgggtg aagcaggcgc ggcagctccg gccgctaaac aggaagcagc 600

tccggcagcg gcccctgcac cagcggctgg cgtgaaagaa gttaacgttc cggatatcgg 660

cggtgacgaa gttgaagtga ctgaagtgat ggtgaaagtg ggcgacaaag ttgccgctga 720

acagtcactg atcaccgtag aaggcgacaa agcttctatg gaagttccgg cgccgtttgc 780

aggcgtcgtg aaggaactga aagtcaacgt tggcgataaa gtgaaaactg gctcgctgat 840

tatgatcttc gaagttgaag gcgcagcgcc tgcggcagct cctgcgaaac aggaagcggc 900

agcgccggca ccggcagcaa aagctgaagc cccggcagca gcaccagctg cgaaagcgga 960

aggcaaatct gaatttgctg aaaacgacgc ttatgttcac gcgactccgc tgatccgccg 1020

tctggcacgc gagtttggtg ttaaccttgc gaaagtgaag ggcactggcc gtaaaggtcg 1080

tatcctgcgc gaagacgttc aggcttacgt gaaagaagct atcaaacgtg cagaagcagc 1140

tccggcagcg actggcggtg gtatccctgg catgctgccg tggccgaagg tggacttcag 1200

caagtttggt gaaatcgaag aagtggaact gggccgcatc cagaaaatct ctggtgcgaa 1260

cctgagccgt aactgggtaa tgatcccgca tgttactcac ttcgacaaaa ccgatatcac 1320

cgagttggaa gcgttccgta aacagcagaa cgaagaagcg gcgaaacgta agctggatgt 1380

gaagatcacc ccggttgtct tcatcatgaa agccgttgct gcagctcttg agcagatgcc 1440

tcgcttcaat agttcgctgt cggaagacgg tcagcgtctg accctgaaga aatacatcaa 1500

catcggtgtg gcggtggata ccccgaacgg tctggttgtt ccggtattca aagacgtcaa 1560

caagaaaggc atcatcgagc tgtctcgcga gctgatgact atttctaaga aagcgcgtga 1620

cggtaagctg actgcgggcg aaatgcaggg cggttgcttc accatctcca gcatcggcgg 1680

cctgggtact acccacttcg cgccgattgt gaacgcgccg gaagtggcta tcctcggcgt 1740

ttccaagtcc gcgatggagc cggtgtggaa tggtaaagag ttcgtgccgc gtctgatgct 1800

gccgatttct ctctccttcg accaccgcgt gatcgacggt gctgatggtg cccgtttcat 1860

taccatcatt aacaacacgc tgtctgacat tcgccgtctg gtgatgtaag taaaagagcc 1920

ggcccaacgg ccggcttttt tctggtaatc tcatgaatgt attgaggtta ttagcgaata 1980

gacaaatcgg ttgccgtttg ttaagccagg cgagatatga tctatatcaa tttctcatct 2040

ataatgcttt gttagtatct cgtcgccgac ttaataaaga gagagttagt cttctatatc 2100

acagcaagaa ggtaggtgtt acatgatgag tactgaaatc aaaactcagg tcgtggtact 2160

tggggcaggc cccgcaggtt actctgcagc cttccgttgc gctgatttag gtctggaaac 2220

cgtcatcgta gaacgttaca gcaccctcgg tggtgtttgt ctgaacgtgg gttgtatccc 2280

ttctaaagcg ctgctgcacg tggcaaaagt tatcgaagaa gcgaaagcgc tggccgaaca 2340

cggcatcgtt ttcggcgaac cgaaaactga cattgacaag atccgcacct ggaaagaaaa 2400

agtcatcact cagctgaccg gtggtctggc tggcatggcc aaaggtcgta aagtgaaggt 2460

ggttaacggt ctgggtaaat ttaccggcgc taacaccctg gaagtggaag gcgaaaacgg 2520

caaaaccgtg atcaacttcg acaacgccat catcgcggcg ggttcccgtc cgattcagct 2580

gccgtttatc ccgcatgaag atccgcgcgt atgggactcc accgacgcgc tggaactgaa 2640

atctgtaccg aaacgcatgc tggtgatggg cggcggtatc atcggtctgg aaatgggtac 2700

cgtataccat gcgctgggtt cagagattga cgtggtggaa atgttcgacc aggttatccc 2760

ggctgccgac aaagacgtgg tgaaagtctt caccaaacgc atcagcaaga aatttaacct 2820

gatgctggaa gccaaagtga ctgccgttga agcgaaagaa gacggtattt acgtttccat 2880

ggaaggtaaa aaagcaccgg cggaagcgca gcgttacgac gcagtgctgg tcgctatcgg 2940

ccgcgtaccg aatggtaaaa acctcgatgc aggtaaagct ggcgtggaag ttgacgatcg 3000

cggcttcatc cgcgttgaca aacaaatgcg caccaacgtg ccgcacatct ttgctatcgg 3060

cgatatcgtc ggtcagccga tgctggcgca caaaggtgtc catgaaggcc acgttgccgc 3120

agaagttatc tccggtctga aacactactt cgatccgaaa gtgatcccat ccatcgccta 3180

cactaaacca gaagtggcat gggtcggtct gaccgagaaa gaagcgaaag agaaaggcat 3240

cagctacgaa accgccacct tcccgtgggc tgcttccggc cgtgctatcg cttctgactg 3300

cgcagatggt atgaccaaac tgatcttcga caaagagacc caccgtgtta tcggcggcgc 3360

gattgtcggc accaacggcg gcgagctgct gggtgagatc ggcctggcta tcgagatggg 3420

ctgtgacgct gaagacatcg ccctgaccat ccacgctcac ccgactctgc acgagtccgt 3480

tggcctggcg gcggaagtgt tcgaaggcag catcaccgac ctgccaaacg ccaaagcgaa 3540

gaaaaagtaa ctttttcttt caggaaaaaa gcataagcgg ctccgggagc cgcttttttt 3600

atgcctgatg tttagaacta tgtcactgtt cataaaccgc tacacctcat acatacttta 3660

agggcgaatt ctgcagatat ccatcacact ggcggccgct cgagcatgca tctagcacat 3720

ccggcaatta aaaaagcggc taaccacgcc gctttttta cgtctgcaat ttacctttcc 3780

agtcttcttg ctccacgttc agagagacgt tcgcatactg ctgaccgttg ctcgttattc 3840

agcctgacag tatggttact gtcgtttaga cgttgtgggc ggctctcctg aactttctcc 3900

cgaaaaacct gacgttgttc aggtgatgcc gattgaacac gctggcgggc gttatcacgt 3960

tgctgttgat tcagtgggcg ctgctgtact ttttccttaa acacctggcg ctgctctggt 4020

gatgcggact gaatacgctc acgcgctgcg tctcttcgct gctggttctg cgggttagtc 4080

tgcattttct cgcgaaccgc ctggcgctgc tcaggcgagg cggactgaat gcgctcacgc 4140

gctgcctctc ttcgctgctg gatcttcggg ttagtctgca ttctctcgcg aactgcctgg 4200

cgctgctcag gcgaggcgga ctgataacgc tgacgagcgg cgtccttttg ttgctgggtc 4260

agtggttggc gacggctgaa gtcgtggaag tcgtcatagc tcccatagtg ttcagcttca 4320

ttaaaccgct gtgccgctgc ctgacgttgg gtacctcgtg taatgactgg tgcggcgtgt 4380

gttcgttgct gaaactgatt tgctgccgcc tgacgctggc tgtcgcgcgt tggggcaggt 4440

aattgcgtgg cgctcattcc gccgttgaca tcggtttgat gaaaccgctt tgccatatcc 4500

tgatcatgat agggcacacc attacggtag tttggattgt gccgccatgc catattctta 4560

tcagtaagat gctcaccggt gatacggttg aaattgttga cgtcgatatt gatgttgtcg 4620

ccgttgtgtt gccagccatt accgtcacga tgaccgccat cgtggtgatg ataatcat 4678

<210> 82
<211> 1114
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<220>
<221> CDS
<222> (323)..(958)

<400> 82
caaaaaaccg gagtctgtgc tccggttttt tattatccgc taatcaatta catatgaata 60

tcctccttag ttcctattcc gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcggcgcg 120

cctacctgtg acggaagatc acttcgcaga ataaataaat cctggtgtcc ctgttgatac 180

cgggaagccc tgggccaact tttggcgaaa atgagacgtt gatcggcacg taagaggttc 240

caactttcac cataatgaaa taagatcact accgggcgta ttttttgagt tgtcgagatt 300

ttcaggagct aaggaagcta aa atg gag aaa aaa atc act gga tat acc acc 352
Met Glu Lys Lys Ile Thr Gly Tyr Thr Thr
1 5 10

gtt gat ata tcc caa tgg cat cgt aaa gaa cat ttt gag gca ttt cag 400
Val Asp Ile Ser Gln Trp His Arg Lys Glu His Phe Glu Ala Phe Gln
15 20 25

tca gtt gct caa tgt acc tat aac cag acc gtt cag ctg gat att acg 448
Ser Val Ala Gln Cys Thr Tyr Asn Gln Thr Val Gln Leu Asp Ile Thr
30 35 40

gcc ttt tta aag acc gta aag aaa aat aag cac aag ttt tat ccg gcc 496
Ala Phe Leu Lys Thr Val Lys Lys Asn Lys His Lys Phe Tyr Pro Ala
45 50 55

ttt att cac att ctt gcc cgc ctg atg aat gct cat ccg gaa tta cgt 544
Phe Ile His Ile Leu Ala Arg Leu Met Asn Ala His Pro Glu Leu Arg
60 65 70

atg gca atg aaa gac ggt gag ctg gtg ata tgg gat agt gtt cac cct 592
Met Ala Met Lys Asp Gly Glu Leu Val Ile Trp Asp Ser Val His Pro
75 80 85 90

tgt tac acc gtt ttc cat gag caa act gaa acg ttt tca tcg ctc tgg 640
Cys Tyr Thr Val Phe His Glu Gln Thr Glu Thr Phe Ser Ser Leu Trp
95 100 105

agt gaa tac cac gac gat ttc cgg cag ttt cta cac ata tat tcg caa 688
Ser Glu Tyr His Asp Asp Phe Arg Gln Phe Leu His Ile Tyr Ser Gln
110 115 120

gat gtg gcg tgt tac ggt gaa aac ctg gcc tat ttc cct aaa ggg ttt 736
Asp Val Ala Cys Tyr Gly Glu Asn Leu Ala Tyr Phe Pro Lys Gly Phe
125 130 135

att gag aat atg ttt ttc gtc tca gcc aat ccc tgg gtg agt ttc acc 784
Ile Glu Asn Met Phe Phe Val Ser Ala Asn Pro Trp Val Ser Phe Thr
140 145 150

agt ttt gat tta aac gtg gcc aat atg gac aac ttc ttc gcc ccc gtt 832
Ser Phe Asp Leu Asn Val Ala Asn Met Asp Asn Phe Phe Ala Pro Val
155 160 165 170

```
ttc acc atg ggc aaa tat tat acg caa ggc gac aag gtg ctg atg ccg        880
Phe Thr Met Gly Lys Tyr Tyr Thr Gln Gly Asp Lys Val Leu Met Pro
                175                 180                 185

ctg gcg att cag gtt cat cat gcc gtt tgt gat ggc ttc cat gtc ggc        928
Leu Ala Ile Gln Val His His Ala Val Cys Asp Gly Phe His Val Gly
            190                 195                 200

aga tgc tta atg aat aca aca gta ctg cga tgagtggcag ggcggggcgt          978
Arg Cys Leu Met Asn Thr Thr Val Leu Arg
        205                 210

aaggcgcgcc atttaaatga agttcctatt ccgaagttcc tattctctag aaagtatagg     1038

aacttcgaag cagctccagc ctacaccctt cttcagggct gactgtttgc ataaaaattc     1098

atctgtatgc acaata                                                    1114
```

<210> 83
<211> 212
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 83

```
Met Glu Lys Lys Ile Thr Gly Tyr Thr Thr Val Asp Ile Ser Gln Trp
1               5                  10                  15

His Arg Lys Glu His Phe Glu Ala Phe Gln Ser Val Ala Gln Cys Thr
            20                  25                  30

Tyr Asn Gln Thr Val Gln Leu Asp Ile Thr Ala Phe Leu Lys Thr Val
        35                  40                  45

Lys Lys Asn Lys His Lys Phe Tyr Pro Ala Phe Ile His Ile Leu Ala
    50                  55                  60

Arg Leu Met Asn Ala His Pro Glu Leu Arg Met Ala Met Lys Asp Gly
65                  70                  75                  80

Glu Leu Val Ile Trp Asp Ser Val His Pro Cys Tyr Thr Val Phe His
                85                  90                  95

Glu Gln Thr Glu Thr Phe Ser Ser Leu Trp Ser Glu Tyr His Asp Asp
            100                 105                 110
```

Phe Arg Gln Phe Leu His Ile Tyr Ser Gln Asp Val Ala Cys Tyr Gly
115 120 125

Glu Asn Leu Ala Tyr Phe Pro Lys Gly Phe Ile Glu Asn Met Phe Phe
130 135 140

Val Ser Ala Asn Pro Trp Val Ser Phe Thr Ser Phe Asp Leu Asn Val
145 150 155 160

Ala Asn Met Asp Asn Phe Phe Ala Pro Val Phe Thr Met Gly Lys Tyr
165 170 175

Tyr Thr Gln Gly Asp Lys Val Leu Met Pro Leu Ala Ile Gln Val His
180 185 190

His Ala Val Cys Asp Gly Phe His Val Gly Arg Cys Leu Met Asn Thr
195 200 205

Thr Val Leu Arg
210

<210> 84
<211> 2521
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 84
ttatttggtg atattggtac caatatcatg cagcaaacgg tgcaacattg ccgtgtctcg 60

ttgctctaaa agccccaggc gttgttgtaa ccagtcgacc agttttatgt catctgccac 120

tgccagagtc gtcagcaatg tcatggctcg ttcgcgtaaa gcttgcagtt gatgttggtc 180

tgccgttgca tcacttttcg ccggttgttg tattaatgtt gctaattgat agcaatagac 240

catcaccgcc tgccccagat tgagcgaagg ataatccgcc accatcggca caccagtaag 300

aacgtcagcc aacgctaact cttcgttagt caacccggaa tcttcgcgac caaacaccag 360

cgcggcatgg ctcatccatg aagatttttc ctctaacagc ggcaccagtt caactggcgt 420

ggcgtagtaa tgatatttcg cccgactgcg cgcagtggtg gcgacagtga aatcgacatc 480

gtgtaacgat tcagccaatg tcgggaaaac tttaatatta tcaataatat caccagatcc 540

atgtgcgacc cagcgggtgg ctggctccag gtgtgcctga ctatcgacaa tccgcagatc 600

gctaaacccc atcgttttca ttgcccgcgc cgctgcccca tatttttctg ctctggcggg 660

tgcgaccaga ataatcgtta tacgcatatt gccactcttc ttgatcaaat aaccgcgaac 720

cgggtgatca ctgtcaactt attacgcggt gcgaatttac aaattcttaa cgtaagtcgc 780

agaaaaagcc ctttacttag cttaaaaaag gctaaactat ttcctgactg tactaacggt 840

tgagttgtta aaaaatgcta catatccttc tgtttactta ggataatttt ataaaaaata 900

aatctcgaca attggattca ccacgtttat tagttgtatg atgcaactag ttggattatt 960

aaaataatgt gacgaaagct agcatttaga tacgatgatt tcatcaaact gttaacgtgc 1020

tacaattgaa cttgatatat gtcaacgaag cgtagtttta ttgggtgtcc ggcccctctt 1080

agcctgttat gttgctgtta aaatggttag gatgacagcc gtttttgaca ctgtcgggtc 1140

ctgagggaaa gtacccacga ccaagctaat gatgttgttg acgttgatgg aaagtgcatc 1200

aagaacgcaa ttacgtactt tagtcatgtt acgccgatca tgttaatttg cagcatgcat 1260

caggcaggtc agggactttt gtacttcctg tttcgattta gttggcaatt taggtagcaa 1320

acgaattcat cggctttacc accgtcaaaa aaaacggcgc tttttagcgc cgtttttatt 1380

tttcaacctt atttccagat acgtaactca tcgtccgttg taacttcttt actggctttc 1440

attttcggca gtgaaaacgc ataccagtcg atattacggg tcacaaacat catgccggcc 1500

agcgccacca ccagcacact ggttcccaac aacagcgcgc tatcggcaga gttgagcagt 1560

ccccacatca caccatccag caacaacagc gcgagggtaa acaacatgct gttgcaccaa 1620

cctttcaata ccgcttgcaa ataaataccg ttcattatcg ccccaatcag actggcgatt 1680

atccatgcca cggtaaaacc ggtatgttca gaaagcgcca gcaagagcaa ataaaacatc 1740

accaatgaaa gccccaccag caaatattgc attgggtgta aacgttgcgc ggtgagcgtt 1800

tcaaaaacaa agaacgccat aaaagtcagt gcaatcagca gaatggcgta cttagtcgcc 1860

cggtcagtta attggtattg atcggctggc gtcgttactg cgacgctaaa cgccgggaag 1920

ttttcccagc cggtatcatt gcctgaagca aaacgctcac cgagattatt agcaaaccag 1980

ctgctttgcc agtgcgcctg aaaacctgac tcgctaactt cccgtttggc tggtagaaaa 2040

tcacctaaaa aactgggatg cggccagttg ctggttaagg tcatttcgct attacgcccg 2100

ccaggcacca cagaaagatc gccggtaccg cttaaattca gggccatatt cagcttcagg 2160

ttctgcttcc gccagtcccc ttcaggtaaa gggatatgca cgccctgccc gccttgctct 2220

aacccggtgc cgggttcaat ggtcagcgcc gttccgttaa cttcaggcgc tttcaccaca 2280

ccaataccac gcgcatcccc gacgctaatc acaataaatg gcttgcctaa ggtgatattt 2340

ggcgcgttga gttcgctaag acgcgaaaca tcgaaatcgg cttttaacgt taaatcactg 2400

tgccagacct gaccggtata aatccctatc ttgcgttctt ccacgttctg attgccatca 2460

accatcaatg actcaggtaa ccaaaaatgg ataaaacttc gtttccgctg cagggtttta 2520

t 2521

<210> 85
<211> 3010
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 85
aagccacagc aggatgccca ctgcaacaaa ggtgatcaca ccggaaacgc gatggagaat 60

ggacgctatc gccgtgatgg ggaaccggat ggtctgtagg tccagattaa caggtctttg 120

ttttttcaca tttcttatca tgaataacgc ccacatgctg ttcttattat tccctgggga 180

ctacgggcac agaggttaac tttctgttac ctggagacgt cgggatttcc ttcctccggt 240

ctgcttgcgg gtcagacagc gtcctttcta taactgcgcg tcatgcaaaa cactgcttcc 300

agatgcgaaa acgacacgtt acaacgctgg gtggctcggg attgcagggt gttccggaga 360

cctggcggca gtataggctg ttcacaaaat cattacaatt aacctacata tagtttgtcg 420

ggttttatcc tgaacagtga tccaggtcac gataacaaca tttatttaat ttttaatcat 480

ctaatttgac aatcattcaa caaagttgtt acaaacatta ccaggaaaag catataatgc 540

gtaaaagtta tgaagtcggt atttcaccta agattaactt atgtaacagt gtggaagtat 600

tgaccaattc attcgggaca gttattagtg gtagacaagt ttaataattc ggattgctaa 660

gtacttgatt cgccatttat tcgtcatcaa tggatccttt acctgcaagc gcccagagct 720

ctgtacccag gttttccccct ctttcacaga gcggcgagcc aaataaaaaa cgggtaaagc 780

caggttgatg tgcgaaggca aatttaagtt ccggcagtct tacgcaataa ggcgctaagg 840

agaccttaaa tggctgatac aaaagcaaaa ctcaccctca acggggatac agctgttgaa 900

ctggatgtgc tgaaaggcac gctgggtcaa gatgttattg atatccgtac tctcggttca 960

aaaggtgtgt tcacctttga cccaggcttc acttcaaccg catcctgcga atctaaaatt 1020

acttttattg atggtgatga aggtattttg ctgcaccgcg gtttcccgat cgatcagctg 1080

gcgaccgatt ctaactacct ggaagtttgt tacatcctgc tgaatggtga aaaaccgact 1140

caggaacagt atgacgaatt taaaactacg gtgacccgtc ataccatgat ccacgagcag 1200

attacccgtc tgttccatgc tttccgtcgc gactcgcatc caatggcagt catgtgtggt 1260

attaccggcg cgctggcggc gttctatcac gactcgctgg atgttaacaa tcctcgtcac 1320

cgtgaaattg ccgcgttcct cctgctgtcg aaaatgccga ccatggccgc gatgtgttac 1380

aagtattcca ttggtcagcc atttgtttac ccgcgcaacg atctctccta cgccggtaac 1440

ttcctgaata tgatgttctc cacgccgtgc gaaccgtatg aagttaatcc gattctggaa 1500

cgtgctatgg accgtattct gatcctgcac gctgaccatg aacagaacgc ctctacctcc 1560

accgtgcgta ccgctggctc ttcgggtgcg aacccgtttg cctgtatcgc agcaggtatt 1620

gcttcactgt ggggacctgc gcacggcggt gctaacgaag cggcgctgaa aatgctggaa 1680

gaaatcagct ccgttaaaca cattccggaa tttgttcgtc gtgcgaaaga caaaaatgat 1740

tctttccgcc tgatgggctt cggtcaccgc gtgtacaaaa attacgaccc gcgcgccacc 1800

gtaatgcgtg aaacctgcca tgaagtgctg aaagagctgg gcacgaagga tgacctgctg 1860

gaagtggcta tggagctgga aaacatcgcg ctgaacgacc cgtactttat cgagaagaaa 1920

ctgtacccga acgtcgattt ctactctggt atcatcctga aagcgatggg tattccgtct 1980

tccatgttca ccgtcatttt cgcaatggca cgtaccgttg gctggatcgc ccactggagc 2040

gaaatgcaca gtgacggtat gaagattgcc cgtccgcgtc agctgtatac aggatatgaa 2100

aaacgcgact ttaaaagcga tatcaagcgt taatggttga ttgctaagtt gtaaatattt 2160

taacccgccg ttcatatggc gggttgattt ttatatgcct aaacacaaaa aattgtaaaa 2220

ataaaatcca ttaacagacc tatatagata tttaaaaaga atagaacagc tcaaattatc 2280

agcaacccaa tactttcaat taaaaacttc atggtagtcg catttataac cctatgaaaa 2340

tgacgtctat ctatacccccc ctatatttta ttcatcatac aacaaattca tgataccaat 2400

aatttagttt tgcatttaat aaaactaaca atatttttaa gcaaaactaa aaactagcaa 2460

taatcaaata cgatattctg gcgtagctat acccctattc tatatcctta aaggactctg 2520

ttatgtttaa aggacaaaaa acattggccg cactggccgt atctctgctg ttcactgcac 2580

ctgtttatgc tgctgatgaa ggttctggcg aaattcactt taaggggggag gttattgaag 2640

caccttgtga aattcatcca gaagatattg ataaaaacat agatcttgga caagtcacga 2700

caacccatat aaaccgggag catcatagca ataaagtggc cgtcgacatt cgcttgatca 2760

actgtgatct gcctgcttct gacaacggta gcggaatgcc ggtatccaaa gttggcgtaa 2820

ccttcgatag cacggctaag acaactggtg ctacgccttt gttgagcaac accagtgcag 2880

gcgaagcaac tggggtcggt gtacgactga tggacaaaaa tgacggtaac atcgtattag 2940

gttcagccgc gccagatctt gacctggatg caagctcatc agaacagacg ctgaactttt 3000

tcgcctggat 3010

<210> 86
<211> 4180
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 86
cgcgatgtcg acgtcacgaa actgaaaaaa ccgctctaca ttctggcgac tgctgatgaa 60

gaaaccagta tggccggagc gcgttatttt gccgaaacta ccgccctgcg cccggattgc 120

gccatcattg gcgaaccgac gtcactacaa ccggtacgcg cacataaagg tcatatctct 180

aacgccatcc gtattcaggg ccagtcgggg cactccagcg atccagcacg cggagttaac 240

gctatcgaac taatgcacga cgccatcggg catattttgc aattgcgcga taacctgaaa 300

gaacgttatc actacgaagc gtttaccgtg ccatacccta cgctcaacct cgggcatatt 360

cacggtggcg acgcttctaa ccgtatttgc gcttgctgtg agttgcatat ggatattcgt 420

ccgctgcctg gcatgacact caatgaactt aatggtttgc tcaacgatgc attggctccg 480

gtgagcgaac gctggccggg tcgtctgacg gtcgacgagc tgcatccgcc gatccctggc 540

tatgaatgcc caccgaatca tcaactggtt gaagtggttg agaaattgct cggagcaaaa 600

accgaagtgg tgaactactg taccgaagcg ccgtttattc aaacgttatg cccgacgctg 660

gtgttggggc ctggctcaat taatcaggct catcaacctg atgaatatct ggaaacacgg 720

tttatcaagc ccacccgcga actgataacc caggtaattc accatttttg ctggcattaa 780

aacgtaggcc ggataaggcg ctcgcgccgc atccggcgct gttgccaaac tccagtgccg 840

caataatgtc ggatgcgatg cttgcgcatc ttatccgacc tacagtgact caaacgatgc 900

ccaaccgtag gccggataag gcgctcgcgc cgcatccggc actgttgcca aactccagtg 960

ccgcaataat gtcggatgcg atacttgcgc atcttatccg accgacagtg actcaaacga 1020

tgcccaactg taggccggat aaggcgctcg cgccgcatcc ggcactgttg ccaaactcca 1080

gtgccgcaat aatgtcggat gcgatacttg cgcatcttat ccgacctaca cctttggtgt 1140

tacttggggc gatttttaa catttccata agttacgctt atttaaagcg tcgtgaattt 1200

aatgacgtaa attcctgcta tttattcgtt tgctgaagcg atttcgcagc atttgacgtc 1260

accgctttta cgtggcttta taaaagacga cgaaaagcaa agcccgagca tattcgcgcc 1320

aatgctagca agaggagaag tcgacatgac agacttaaat aaagtggtaa aagaacttga 1380

agctcttggt atttatgacg taaaagaagt tgtttacaat ccaagctacg agcaattgtt 1440

cgaagaagaa actaaaccag gtttagaagg ctttgaaaaa ggtactttaa ctacgactgg 1500

tgcagtggca gtagatacag gtatcttcac aggtcgttct ccaaaagata aatatatcgt 1560

gttagatgaa aaaaccaaag atactgtttg gtggacatct gaaacagcaa aaaacgacaa 1620

caagccaatg aaccaagcta catggcaaag cttaaaagac ttggtaacca accagctttc 1680

tcgtaaacgc ttatttgtag ttgatggttt ctgtggtgcg agcgaacacg accgtattgc 1740

agtacgtatt gtcactgaag tagcgtggca agcacatttt gtaaaaaata tgtttattcg 1800

cccaactgaa gaacaactca aaaattttga accagatttc gttgtaatga atggttctaa 1860

agtaaccaat ccaaactgga aagaacaagg tttaaattca gaaaactttg ttgctttcaa 1920

cttgactgaa cgcattcaat taatcggtgg tacttggtac ggcggtgaaa tgaaaaaagg 1980

tatgttctca atcatgaact acttcctacc acttaaaggt gttggtgcaa tgcactgctc 2040

agctaacgtt ggtaaagatg gcgatgtagc aatcttcttc ggcttatctg gcacaggtaa 2100

aacaaccctt tcaacggatc caaaacgtga attaatcggt gacgatgaac acggctggga 2160

tgatgtgggt atctttaact ttgaaggtgg ttgctatgcg aaaaccattc acctttcaga 2220

agaaaatgaa ccagatattt accgcgctat ccgtcgcgac gcattattag aaaacgtggt 2280

tgttcgtgca gatggttctg ttgatttcga tgatggttca aaaacagaaa atactcgcgt 2340

gtcttaccca atttatcaca ttgataacat tgtaaaacca gtttctcgtg caggtcacgc 2400

aactaaagtg attttcttaa ctgcagatgc atttggcgta ttaccaccag tatctaaatt 2460

gacaccagaa caaactaaat actacttctt atctggtttc acagcaaaat tagcaggtac 2520

tgaacgtggt attactgaac caactccaac tttctcagca tgtttcggtg ctgcgttctt 2580

aacccttcac ccaactcaat atgcagaagt gttagtaaaa cgtatgcaag cagtgggtgc 2640

tgaagcttac ttagtaaata ctggttggaa tggcacaggc aaacgtatct caatcaaaga 2700

tactcgcgga atcattgatg caatcttaga tggctcaatt gaaaaagctg aaatgggcga 2760

attaccaatc tttaacttag ccattcctaa agcattacca ggtgtagatt ctgcaatctt 2820

agatcctcgc gatacttacg cagataaagc acaatggcaa tcaaaagctg aagacttagc 2880

aggtcgtttt gtgaaaaact ttgttaaata tgcaactaac gaagaaggca aagctttaat 2940

tgcagctggt cctaaagctt aatctagaaa gcttcctaga ggcatcaaat aaaacgaaag 3000

gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atctgttgtt tgtcggtgaa cgctctcctg 3060

agtaggacga attcacttct gttctaacac cctcgttttc aatatatttc tgtctgcatt 3120

ttattcaaat tctgaatata ccttcagata tccttaagga attgtcgtta cattcggcga 3180

tatttttca agacaggttc ttactatgca ttccacagaa gtccaggcta aacctctttt 3240

tagctggaaa gccctgggtt gggcactgct ctacttttgg tttttctcta ctctgctaca 3300

ggccattatt tacatcagtg gttatagtgg cactaacggc attcgcgact cgctgttatt 3360

cagttcgctg tggttgatcc cggtattcct ctttccgaag cggattaaaa ttattgccgc 3420

agtaatcggc gtggtgctat gggcggcctc tctggcggcg ctgtgctact acgtcatcta 3480

cggtcaggag ttctcgcaga gcgttctgtt tgtgatgttc gaaaccaaca ccaacgaagc 3540

cagcgagtat ttaagccagt atttcagcct gaaaattgtg cttatcgcgc tggcctatac 3600

ggcggtggca gttctgctgt ggacacgcct gcgcccggtc tatattccaa agccgtggcg 3660

ttatgttgtc tcttttgccc tgctttatgg cttgattctg catccgatcg ccatgaatac 3720

gtttatcaaa aacaagccgt ttgagaaaac gttggataac ctggcctcgc gtatggagcc 3780

tgccgcaccg tggcaattcc tgaccggcta ttatcagtat cgtcagcaac taaactcgct 3840

aacaaagtta ctgaatgaaa ataatgcctt gccgccactg gctaatttca aagatgaatc 3900

gggtaacgaa ccgcgcactt tagtgctggt gattggcgag tcgacccagc gcggacgcat 3960

gagtctgtac ggttatccgc gtgaaaccac gccggagctg gatgcgctgc ataaaaccga 4020

tccgaatctg accgtgttta ataacgtagt tacgtctcgt ccgtacacca ttgaaatcct 4080

gcaacaggcg ctgacctttg ccaatgaaaa gaacccggat ctgtatctga cgcagccgtc 4140

gctgatgaac atgatgaaac aggcgggtta taaaaccttc 4180

<210> 87
<211> 4960
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 87
aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctt cacctcgaga attgtgagcg gataacaatt 60

gacattgtga gcggataaca agatactgag cacatcagca ggacgcactg accgaattca 120

attaagctag caagaggaga agtcgagatg aacttacatg aatatcaggc aaaacaactt 180

tttgcccgct atggcttacc agcaccggtg ggttatgcct gtactactcc gcgcgaagca 240

gaagaagccg cttcaaaaat cggtgccggt ccgtgggtag tgaaatgtca ggttcacgct 300

ggtggccgcg gtaaagcggg cggtgtgaaa gttgtaaaca gcaaagaaga catccgtgct 360

tttgcagaaa actggctggg caagcgtctg gtaacgtatc aaacagatgc caatggccaa 420

ccggttaacc agattctggt tgaagcagcg accgatatcg ctaaagagct gtatctcggt 480

gccgttgttg accgtagttc ccgtcgtgtg gtctttatgg cctccaccga aggcggcgtg 540

gaaatcgaaa aagtggcgga agaaactccg cacctgatcc ataaagttgc gcttgatccg 600

ctgactggcc cgatgccgta tcagggacgc gagctggcgt tcaaactggg tctggaaggt 660

aaactggttc agcagttcac caaaatcttc atgggcctgg cgaccatttt cctggagcgc 720

gacctggcgt tgatcgaaat caacccgctg gtcatcacca aacagggcga tctgatttgc 780

ctcgacggca aactgggcgc tgacggcaac gcactgttcc gccagcctga tctgcgcgaa 840

atgcgtgacc agtcgcagga agatccgcgt gaagcacagg ctgcacagtg ggaactgaac 900

tacgttgcgc tggacggtaa catcggttgt atggttaacg gcgcaggtct ggcgatgggt 960

acgatggaca tcgttaaact gcacggcggc gaaccggcta acttccttga cgttggcggc 1020

ggcgcaacca aagaacgtgt aaccgaagcg ttcaaaatca tcctctctga cgacaaagtg 1080

aaagccgttc tggttaacat cttcggcggt atcgttcgtt gcgacctgat cgctgacggt 1140

atcatcggcg cggtagcaga agtgggtgtt aacgtaccgg tcgtggtacg tctggaaggt 1200

aacaacgccg aactcggcgc gaagaaactg gctgacagcg gcctgaatat tattgcagca 1260

aaaggtctga cggatgcagc tcagcaggtt gttgccgcag tggaggggaa ataatgtcca 1320

ttttaatcga taaaaacacc aaggttatct gccagggctt taccggtagc caggggactt 1380

tccactcaga acaggccatt gcatacggca ctaaaatggt tggcggcgta accccaggta 1440

aaggcggcac cacccacctc ggcctgccgg tgttcaacac cgtgcgtgaa gccgttgctg 1500

ccactggcgc taccgcttct gttatctacg taccagcacc gttctgcaaa gactccattc 1560

tggaagccat cgacgcaggc atcaaactga ttatcaccat cactgaaggc atcccgacgc 1620

tggatatgct gaccgtgaaa gtgaagctgg atgaagcagg cgttcgtatg atcggcccga 1680

actgcccagg cgttatcact ccgggtgaat gcaaaatcgg tatccagcct ggtcacattc 1740

acaaaccggg taaagtgggt atcgtttccc gttccggtac actgacctat gaagcggtta 1800

aacagaccac ggattacggt ttcggtcagt cgacctgtgt cggtatcggc ggtgacccga 1860

tcccgggctc taactttatc gacattctcg aaatgttcga aaaagatccg cagaccgaag 1920

cgatcgtgat gatcggtgag atcggcggta gcgctgaaga agaagcagct gcgtacatca 1980

aagagcacgt taccaagcca gttgtgggtt acatcgctgg tgtgactgcg ccgaaaggca 2040

aacgtatggg ccacgcgggt gccatcattg ccggtgggaa agggactgcg gatgagaaat 2100

tcgctgctct ggaagccgca ggcgtgaaaa ccgttcgcag cctggcggat atcggtgaag 2160

cactgaaaac tgttctgaaa taatctagca agaggagaag tcgacatgga aatcaaagaa 2220

atggtgagcc ttgcacgcaa ggctcagaag gagtatcaag ctacccataa ccaagaagca 2280

gttgacaaca tttgccgagc tgcagcaaaa gttatttatg aaaatgcagc tattctggct 2340

cgcgaagcag tagacgaaac cggcatgggc gtttacgaac acaaagtggc caagaatcaa 2400

ggcaaatcca aaggtgtttg gtacaacctc cacaataaaa aatcgattgg tatcctcaat 2460

atagacgagc gtaccggtat gatcgagatt gcaaagccta tcggagttgt aggagccgta 2520

acgccgacga ccaacccgat cgttactccg atgagcaata tcatctttgc tcttaagacc 2580

tgcaatgcca tcattattgc cccccacccc agatccaaaa aatgctctgc acacgcagtt 2640

cgtctgatca aagaagctat cgctccgttc aacgtaccgg aaggtatggt tcagatcatc 2700

gaagaaccca gcatcgagaa gacgcaggaa ctcatgggcg ccgtagacgt agtagttgct 2760

acgggtggta tgggcatggt gaagtctgca tattcttcag gaaagccttc tttcggtgtt 2820

ggagccggta acgttcaggt gatcgtggat agcaacatcg atttcgaagc tgctgcagaa 2880

aaaatcatca ccggtcgtgc tttcgacaac ggtatcatct gctcaggcga acagagcatc 2940

atctacaacg aggctgacaa ggaagcagtt ttcacagcat tccgcaacca cggtgcatat 3000

ttctgtgacg aagccgaagg agatcgggct cgtgcagcta tcttcgaaaa tggagccatc 3060

gcgaaagatg tagtaggtca gagcgttgcc ttcattgcca agaaagcaaa catcaatatc 3120

cccgagggta cccgtattct cgttgttgaa gctcgcggcg taggagcaga agacgttatc 3180

tgtaaggaaa agatgtgtcc cgtaatgtgc gccctcagct acaagcactt cgaagaaggt 3240

gtagaaatcg cacgtacgaa cctcgccaac gaaggtaacg gccacacctg tgctatccac 3300

tccaacaatc aggcacacat catcctcgca ggatcagagc tgacggtatc tcgtatcgta 3360

gtgaatgctc cgagtgccac tacagcaggc ggtcacatcc aaaacggtct tgccgtaacc 3420

aatacgctcg gatgcggatc atggggtaat aactctatct ccgagaactt cacttacaag 3480

cacctcctca acatttcacg catcgcaccg ttgaattcaa gcattcacat ccccgatgac 3540

aaagaaatct gggaactcta atctagcaag aggagaagtc gacatgcaac ttttcaaact 3600

caagagtgta acacatcact ttgacacttt tgcagaattt gccaaggaat tctgtcttgg 3660

agaacgcgac ttggtaatta ccaacgagtt catctatgaa ccgtatatga aggcatgcca 3720

gctcccctgc cattttgtta tgcaggagaa atatgggcaa ggcgagcctt ctgacgaaat 3780

gatgaataac atcttggcag acatccgtaa tatccagttc gaccgcgtaa tcggtatcgg 3840

aggaggtacg gttattgaca tctctaaact tttcgttctg aaaggattaa atgatgtact 3900

cgatgcattc gaccgcaaaa tacctcttat caaagagaaa gaactgatca ttgtgcccac 3960

aacatgcgga acgggtagcg aggtgacgaa catttctatc gcagaaatca aaagccgtca 4020

caccaaaatg ggattggctg acgatgccat tgttgcagac catgccatca tcatacctga 4080

acttctgaag agcttgcctt tccacttcta cgcatgcagt gcaatcgatg ctcttatcca 4140

tgccatcgag tcatacgtat ctcctaaagc cagtccatat tctcgtctgt tcagtgaggc 4200

ggcttgggac attatcctgg aagtattcaa gaaaatcgcc gaacacggcc ctgaataccg 4260

cttcgaaaag ctgggagaaa tgatcatggc cagcaactat gccggtatag ccttcggaaa 4320

tgcaggagta ggagccgtcc acgcactatc ctacccgttg ggaggcaact atcacgtgcc 4380

gcatggagaa gcaaactatc agttcttcac agaggtattc aaagtatacc aaaagaagaa 4440

tcctttcggc tatatagtcg aactcaactg gaagctctcc aagatactga actgccagcc 4500

cgaatacgta tatccgaagc tggatgaact tctcggatgc cttcttacca agaaaccttt 4560

gcacgaatac ggcatgaagg acgaagaggt aagaggcttt gcggaatcag tgcttaagac 4620

acagcaaaga ttgctcgcca acaactacgt agagcttact gtagatgaga tcgaaggtat 4680

ctacagaaga ctctactaat ctagaaagct tcctagaggc atcaaataaa acgaaaggct 4740

cagtcgaaag actgggcctt tcgttttatc tgttgtttgt cggtgaacgc tctcctgagt 4800

aggacaaatc cgccgcccta gacctaggcg ttcggctgcg acacgtcttg agcgattgtg 4860

taggctggag ctgcttcgaa gttcctatac tttctagaga ataggaactt cggaatagga 4920

actaaggagg atattcatat ggaccatggc taattcccat 4960

<210> 88
<211> 5083
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 88
tcgagaaatt tatcaaaaag agtgttgact tgtgagcgga taacaatgat acttagattc 60

aattgtgagc ggataacaat ttcacacaga attcaattaa gctagcaaga ggagaagtcg 120

acatggccaa cataagttca ccattcgggc aaaacgaatg gctggttgaa gagatgtacc 180

gcaagttccg cgacgacccc tcctcggtcg atcccagctg gcacgagttc ctggttgact 240

acagccccga acccacctcc caaccagctg ccgaaccaac ccgggttacc tcgccactcg 300

ttgccgagcg ggccgctgcg gccgccccgc aggcaccccc caagccggcc gacaccgcgg 360

ccgcgggcaa cggcgtggtc gccgcactgg ccgccaaaac tgccgttccc ccgccagccg 420

aaggtgacga ggtagcggtg ctgcgcggcg ccgccgcggc cgtcgtcaag aacatgtccg 480

cgtcgttgga ggtgccgacg gcgaccagcg tccgggcggt cccggccaag ctactgatcg 540

acaaccggat cgtcatcaac aaccagttga agcggacccg cggcggcaag atctcgttca 600

cgcatttgct gggctacgcc ctggtgcagg cggtgaagaa attcccgaac atgaaccggc 660

actacaccga agtcgacggc aagcccaccg cggtcacgcc ggcgcacacc aatctcggcc 720

tggcgatcga cctgcaaggc aaggacggga agcgttccct ggtggtggcc ggcatcaagc 780

ggtgcgagac catgcgattc gcgcagttcg tcacggccta cgaagacatc gtacgccggg 840

cccgcgacgg caagctgacc actgaagact ttgccggcgt gacgatttcg ctgaccaatc 900

ccggaaccat cggcaccgtg cattcggtgc cgcggctgat gcccggccag ggcgccatca 960

tcggcgtggg cgccatggaa taccccgccg agtttcaagg cgccagcgag gaacgcatcg 1020

ccgagctggg catcggcaaa ttgatcactt tgacctccac ctacgaccac cgcatcatcc 1080

agggcgcgga atcgggcgac ttcctgcgca ccatccacga gttgctgctc tcggatggct 1140

tctgggacga ggtcttccgc gaactgagca tcccatatct gccggtgcgc tggagcaccg 1200

acaaccccga ctcgatcgtc gacaagaacg ctcgcgtcat gaacttgatc gcggcctacc 1260

gcaaccgcgg ccatctgatg gccgataccg acccgctgcg gttggacaaa gctcggttcc 1320

gcagtcaccc cgacctcgaa gtgctgaccc acggcctgac gctgtgggat ctcgatcggg 1380

tgttcaaggt cgacggcttt gccggtgcgc agtacaagaa actgcgcgac gtgctgggct 1440

tgctgcgcga tgcctactgc cgccacatcg gcgtggagta cgcccatatc ctcgaccccg 1500

aacaaaagga gtggctcgaa caacgggtcg agaccaagca cgtcaaaccc actgtggccc 1560

aacagaaata catcctcagc aagctcaacg ccgccgaggc ctttgaaacg ttcctacaga 1620

ccaagtacgt cggccagaag cggttctcgc tggaaggcgc cgaaagcgtg atcccgatga 1680

tggacgcggc gatcgaccag tgcgctgagc acggcctcga cgaggtggtc atcgggatgc 1740

cgcaccgggg ccggctcaac gtgctggcca acatcgtcgg caagccgtac tcgcagatct 1800

tcaccgagtt cgagggcaac ctgaatccgt cgcaggcgca cggctccggt gacgtcaagt 1860

accacctggg cgccaccggg ctgtacctgc agatgttcgg cgacaacgac attcaggtgt 1920

cgctgaccgc caacccgtcg catctggagg ccgtcgaccc ggtgctggag ggattggtgc 1980

gggccaagca ggatctgctc gaccacggaa gcatcgacag cgacggccaa cgggcgttct 2040

cggtggtgcc gctgatgttg catggcgatg ccgcgttcgc cggtcagggt gtggtcgccg 2100

agacgctgaa cctggcgaat ctgccgggct accgcgtcgg cggcaccatc cacatcatcg 2160

tcaacaacca gatcggcttc accaccgcgc ccgagtattc caggtccagc gagtactgca 2220

ccgacgtcgc aaagatgatc ggggcaccga tctttcacgt caacggcgac gacccggagg 2280

cgtgtgtctg ggtggcgcgg ttggcggtgg acttccgaca acggttcaag aaggacgtcg 2340

tcatcgacat gctgtgctac cgccgccgcg ggcacaacga gggtgacgac ccgtcgatga 2400

ccaaccccta catgtacgac gtcgtcgaca ccaagcgcgg ggcccgcaaa agctacaccg 2460

aagccctgat cggacgtggc gacatctcga tgaaggaggc cgaggacgcg ctgcgcgact 2520

accagggcca gctggaacgg gtgttcaacg aagtgcgcga gctggagaag cacggtgtgc 2580

agccgagcga gtcggtcgag tccgaccaga tgattcccgc ggggctggcc actgcggtgg 2640

acaagtcgct gctggcccgg atcggcgatg cgttcctcgc cttgccgaac ggcttcaccg 2700

cgcacccgcg agtccaaccg gtgctggaga agcgccggga gatggcctat gaaggcaaga 2760

tcgactgggc ctttggcgag ctgctggcgc tgggctcgct ggtggccgaa ggcaagctgg 2820

tgcgcttgtc ggggcaggac agccgccgcg gcaccttctc ccagcggcat tcggttctca 2880

tcgaccgcca cactggcgag gagttcacac cactgcagct gctggcgacc aactccgacg 2940

gcagcccgac cggcggaaag ttcctggtct acgactcgcc actgtcggag tacgccgccg 3000

tcggcttcga gtacggctac actgtgggca atccggacgc cgtggtgctc tgggaggcgc 3060

agttcggcga cttcgtcaac ggcgcacagt cgatcatcga cgagttcatc agctccggtg 3120

aggccaagtg gggccaattg tccaacgtcg tgctgctgtt accgcacggg cacgaggggc 3180

agggacccga ccacacttct gcccggatcg aacgcttctt gcagttgtgg gcggaaggtt 3240

cgatgaccat cgcgatgccg tcgactccgt cgaactactt ccacctgcta cgccggcatg 3300

ccctggacgg catccaacgc ccgctgatcg tgttcacgcc caagtcgatg ttgcgtcaca 3360

aggccgccgt cagcgaaatc aaggacttca ccgagatcaa gttccgctca gtgctggagg 3420

aacccaccta tgaggacggc atcggagacc gcaacaaggt cagccggatc ctgctgacca 3480

gtggcaagct gtattacgag ctggccgccc gcaaggccaa ggacaaccgc aatgacctcg 3540

cgatcgtgcg gcttgaacag ctcgccccgc tgcccaggcg tcgactgcgt gaaacgctgg 3600

accgctacga gaacgtcaag gagttcttct gggtccaaga ggaaccggcc aaccagggtg 3660

cgtggccgcg attcgggctc gaactacccg agctgctgcc tgacaagttg gccgggatca 3720

agcgaatctc gcgccgggcg atgtcagccc cgtcgtcagg ctcgtcgaag gtgcacgccg 3780

tcgaacagca ggagatcctc gacgaggcgt tcggctaatc tagcaagagg agaagtcgac 3840

atgaagttat taaaattggc acctgatgtt tataaatttg atactgcaga ggagtttatg 3900

aaatacttta aggttggaaa aggtgacttt atacttacta atgaattttt atataaacct 3960

ttccttgaga aattcaatga tggtgcagat gctgtatttc aggagaaata tggactcggt 4020

gaaccttctg atgaaatgat aaacaatata attaaggata ttggagataa acaatataat 4080

agaattattg ctgtaggggg aggatctgta atagatatag ccaaaatcct cagtcttaag 4140

tatactgatg attcattgga tttgtttgag ggaaaagtac ctcttgtaaa aaacaaagaa 4200

ttaattatag ttccaactac atgtggaaca ggttcagaag ttacaaatgt atcagttgca 4260

gaattaaaga gaagacatac taaaaaagga attgcttcag acgaattata tgcaacttat 4320

gcagtacttg taccagaatt tataaaagga cttccatata agtttttgt aaccagctcc 4380

gtagatgcct taatacatgc aacagaagct tatgtatctc caaatgcaaa tccttatact 4440

gatatgttta gtgtaaaagc tatggagtta attttaaatg gatacatgca aatggtagag 4500

aaaggaaatg attacagagt tgaaataatt gaggattttg ttataggcag caattatgca 4560

ggtatagctt ttggaaatgc aggagtggga gcggttcacg cactctcata tccaataggc 4620

ggaaattatc atgtgcctca tggagaagca aattatctgt tttttacaga aatatttaaa 4680

acttattatg agaaaaatcc aaatggcaag attaaagatg taaataaact attagcaggc 4740

atactaaaat gtgatgaaag tgaagcttat gacagtttat cacaactttt agataaatta 4800

ttgtcaagaa aaccattaag agaatatgga atgaaagagg aagaaattga aacttttgct 4860

gattcagtaa tagaaggaca gcagagactg ttggtaaaca attatgaacc tttttcaaga 4920

gaagacatag taaacacata taaaaagtta tattaatcta gaaagcttcc tagaggcatc 4980

aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt tgtttgtcgg 5040

tgaacgctct cctgagtagg acaaatccgc cgccctagac cta 5083

<210> 89
<211> 5097
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 89
tctgtatcag gctgaaaatc ttctctcatc cgccaaaaca gcttcggcgt taagatgcgc 60

gctcaaggac gtaagccgtc gactctcgcc gtgctggcgc aggacacggc taccactcct 120

ttctctgttg atattctgct tgccattgag caaaccgcca gcgagttcgg ctggaatagt 180

tttttaatca atatttttttc tgaagatgac gctgcccgcg cggcacgtca gctgcttgcc 240

caccgtccgg atggcattat ctatactaca atggggctgc gacatatcac gctgcctgag 300

tctctgtatg gtgaaaatat tgtattggcg aactgtgtgg cggatgaccc agcgttaccc 360

agttatatcc ctgatgatta cactgcacaa tatgaatcaa cacagcattt gctcgcggcg 420

ggctatcgtc aaccgttatg cttctggcta ccggaaagtg cgttggcaac agggtatcgt 480

cggcagggat ttgagcaggc ctggcgtgat gctggacgag atctggctga ggtgaaacaa 540

tttcacatgg caacaggtga tgatcactac accgatctcg caagtttact caatgcccac 600

ttcaaaccgg gcaaaccaga ttttgatgtt ctgatatgtg gtaacgatcg cgcagccttt 660

gtggcttatc aggttcttct ggcgaagggg gtacgaatcc cgcaggatgt cgccgtaatg 720

ggctttgata atctggttgg cgtcgggcat ctgtttttac cgccgctgac cacaattcag 780

cttccacatg acattatcgg gcgggaagct gcattgcata ttattgaagg tcgtgaaggg 840

ggaagagtga cgcggatccc ttgcccgctg ttgatccgtt gttccacctg atattatgtt 900

aacccagtag ccagagtgct ccatgttgca gcacagccac tccgtgggag gcataaagcg 960

acagttcccg ttcttctggc tgcggataga ttcgactact catcaccgct tccccgtcgt 1020

taataaatac ttccacggat gatgtatcga taaatatcct tagggcgagc gtgtcacgct 1080

gcgggagggg aatactacgg tagccgtcta aattctcgtg tgggtaatac cgccacaaaa 1140

caagtcgctc agattggtta tcaatataca gccgcattcc agtgccgagc tgtaatccgt 1200

aatgttcggc atcactgttc ttcagcgccc actgcaactg aatctcaact gcttgcgcgt 1260

tttcctgcaa aacatattta ttgctgattg tgcggggaga gacagattga tgctgctggc 1320

gtaacgactc agcttcgtgt accgggcgtt gtagaagttt gccattgctc tctgatagct 1380

cgcgcgccag cgtcatgcag cctgcccatc cttcacgttt tgagggcatt ggcgattccc 1440

acatatccat ccagccgata acaatacgcc gaccatcctt cgctaaaaag ctttgtggtg 1500

cataaaagtc atgcccgtta tcaagttcag taaaatgccc ggattgtgca aaaagtcgtc 1560

ctggcgacca cattccgggt attacgccac tttgaaagcg atttcggtaa ctgtatccct 1620

cggcattcat tccctgcggg gaaaacatca gataatgctg atcgccaagg ctgaaaaagt 1680

ccggacattc ccacatatag ctttcacccg catcagcgtg ggccagtacg cgatcgaagg 1740

tccattcacg caacgaactg ccgcgataaa gcaggatctg ccccgtgttg cctggatctt 1800

tcgccccgac taccatccac catgtgtcgg cttcacgcca cactttagga tcgcggaagt 1860

gcatgattcc ttctggtgga gtgaggatca caccctgttt ctcgaaatga ataccatccc 1920

gactggtagc cagacattgt acttcgcgaa ttgcatcgtc attacctgca ccatcgagcc 1980

agacgtgtcc ggtgtagata agtgagagga caccattgtc atcgacagca ctacctgaaa 2040

aacacccgtc tttgtcatta tcgtctcctg gcgctagcgc aataggctca tgctgccagt 2100

ggatcatatc gtcgctggtg gcatgtcccc agtgcattgg cccccagtgt tcgctcatcg 2160

gatgatgttg ataaaacgcg tgataacgat cgttaaacca gatcaggccg tttggatcgt 2220

tcatccaccc ggcaggaggc gcgaggtgaa aatggggata gaaagtgtta ccccggtgct 2280

catgaagttt tgctagggcg ttttgcgccg catgcaatcg agattgcgtc attttaatca 2340

tcctggttaa gcaaatttgg tgaattgtta acgttaactt ttataaaaat aaagtccctt 2400

actttcataa atgcgatgaa tatcacaaat gttaacgtta actatgacgt tttgtgatcg 2460

aatatgcatg ttttagtaaa tccatgacga ttttgcgaaa aagaggttta tcactatgcg 2520

taactcagat gaatttaagg gaaaaaaatg tcagccaaag tatgggtttt aggggatgcg 2580

gtcgtagatc tcttgccaga atcagacggg cgcctactgc cttgtcctgg cggcgcgcca 2640

gctaacgttg cggtgggaat cgccagatta ggcggaacaa gtgggtttat aggtcgggtg 2700

ggggatgatc cttttggtgc gttaatgcaa agaacgctgc taactgaggg agtcgatatc 2760

acgtatctga agcaagatga atggcaccgg acatccacgg tgcttgtcga tctgaacgat 2820

caaggggaac gttcatttac gtttatggtc cgccccagtg ccgatctttt tttagagacg 2880

acagacttgc cctgctggcg acatggcgaa tggttacatc tctgttcaat tgcgttgtct 2940

gccgagcctt cgcgtaccag cgcatttact gcgatgacgg cgatccggca tgccggaggt 3000

tttgtcagct tcgatcctaa tattcgtgaa gatctatggc aagacgagca tttgctccgc 3060

ttgtgtttgc ggcaggcgct acaactggcg gatgtcgtca agctctcgga agaagaatgg 3120

cgacttatca gtggaaaaac acagaacgat caggatatat gcgccctggc aaaagagtat 3180

gagatcgcca tgctgttggt gactaaaggt gcagaagggg tggtggtctg ttatcgagga 3240

caagttcacc attttgctgg aatgtctgtg aattgtgtcg atagcacggg ggcgggagat 3300

gcgttcgttg ccgggttact cacaggtctg tcctctacgg gattatctac agatgagaga 3360

gaaatgcgac gaattatcga tctcgctcaa cgttgcggag cgcttgcagt aacggcgaaa 3420

ggggcaatga cagcgctgcc atgtcgacaa gaactggaat agtgagaagt aaacggcgaa 3480

gtcgctctta tctctaaata ggacgtgaat tttttaacga caggcaggta attatggcac 3540

tgaatattcc attcagaaat gcgtactatc gttttgcatc cagttactca tttctctttt 3600

ttatttcctg gtcgctgtgg tggtcgttat acgctatttg gctgaaagga catctagggt 3660

tgacagggac ggaattaggt acactttatt cggtcaacca gtttaccagc attctattta 3720

tgatgttcta cggcatcgtt caggataaac tcggtctgaa gaaaccgctc atctggtgta 3780

tgagtttcat cctggtcttg accggaccgt ttatgattta cgtttatgaa ccgttactgc 3840

aaagcaattt ttctgtaggt ctaattctgg gggcgctatt ttttggcttg gggtatctgg 3900

cgggatgcgg tttgcttgat agcttcaccg aaaaaatggc gcgaaatttt catttcgaat 3960

atggaacagc gcgcgcctgg ggatcttttg gctatgctat tggcgcgttc tttgccggca 4020

tatttttag tatcagtccc catatcaact tctggttggt ctcgctattt ggcgctgtat 4080

ttatgatgat caacatgcgt tttaaagata aggatcacca gtgcgtagcg gcagatgcgg 4140

gaggggtaaa aaaagaggat tttatcgcag ttttcaagga tcgaaacttc tgggttttcg 4200

tcatatttat tgtggggacg tggtctttct ataacatttt tgatcaacaa ctttttcctg 4260

tcttttattc aggtttattc gaatcacacg atgtaggaac gcgcctgtat ggttatctca 4320

actcattcca ggtggtactc gaagcgctgt gcatggcgat tattcctttc tttgtgaatc 4380

gggtagggcc aaaaaatgca ttacttatcg gagttgtgat tatggcgttg cgtatccttt 4440

cctgcgcgct gttcgttaac ccctggatta tttcattagt gaagttgtta catgccattg 4500

aggttccact ttgtgtcata tccgtcttca aatacagcgt ggcaaacttt gataagcgcc 4560

tgtcgtcgac gatctttctg attggttttc aaattgccag ttcgcttggg attgtgctgc 4620

tttcaacgcc gactgggata ctctttgacc acgcaggcta ccagacagtt ttcttcgcaa 4680

tttcgggtat tgtctgcctg atgttgctat ttggcatttt cttcttgagt aaaaaacgcg 4740

agcaaatagt tatggaaacg cctgtacctt cagcaatata gacgtaaact ttttccggtt 4800

gttgtcgata gctctatatc cctcaaccgg aaaataataa tagtaaaatg cttagccctg 4860

ctaataatcg cctaatccaa acgcctcatt catgttctgg tacagtcgct caaatgtact 4920

tcagatgcgc ggttcgctga tttccaggac attgtcgtca ttcagtgacc tgtcccgtgt 4980

atcacggtcc tgcgaattca tcaaggaatg cattgcggag tgaagtatcg agtcacgcca 5040

tatttcgtca cccgaagatg agttttgaga tattaaggca ggtgactttc actcaca 5097

<210> 90
<211> 3525
<212> ADN
<213> Nocardia iowensis

<400> 90
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> 91
<211> 1174
<212> PRT
<213> Nocardia iowensis

<400> 91

```
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> 92
<211> 669
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 92
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> 93
<211> 222
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polieptido sintético

<400> 93
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> 94
<211> 3522
<212> ADN
<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 94
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> 95
<211> 1173
<212> PRT
<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 95

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> 96
<211> 3522
<212> ADN
<213> Mycobacterium avium

<400> 96
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> 97
<211> 1173
<212> PRT
<213> Mycobacterium avium

<400> 97
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> 98
<211> 3525
<212> ADN
<213> Mycobacterium marinum

<400> 98
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> 99
<211> 1174
<212> PRT
<213> Mycobacterium marinum

<400> 99
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
```

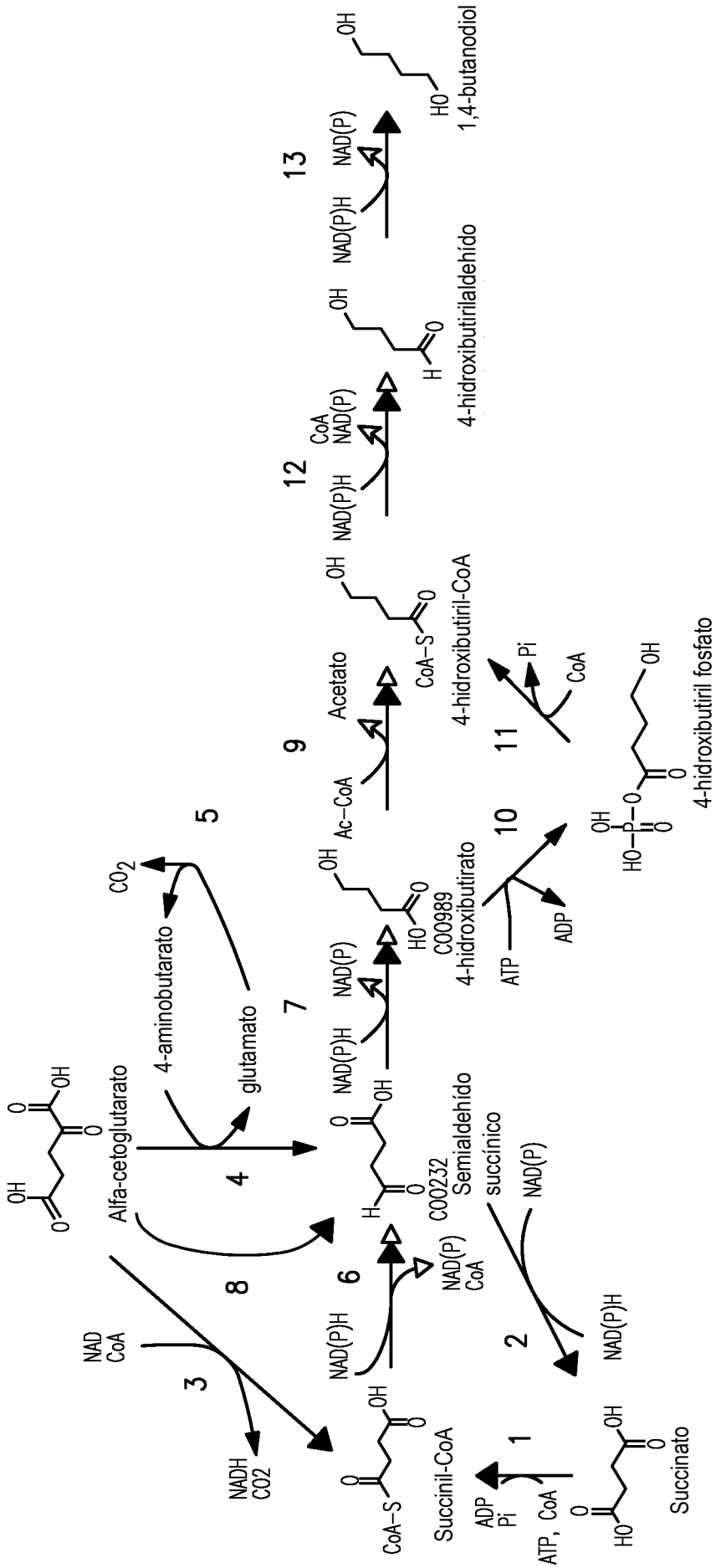

Succinato
ATP, CoA
ADP
Pi
1
Succinil-CoA
CoA–S
NADH
CO2
3
NAD
CoA
2
succínico
Semialdehído
CO0232
NAD(P)
NAD(P)H
6
8
Alfa-cetoglutarato
4
4-aminobutarato
glutamato
5
CO2
7
NAD(P)H
NAD(P)
4-hidroxibutirato
CO0989
9
Ac–CoA
Acetato
CoA–S
10
ATP
ADP
11
Pi
CoA
4-hidroxibutiril-CoA
4-hidroxibutiril fosfato
12
CoA
NAD(P)
NAD(P)H
4-hidroxibutirilaldehído
13
NAD(P)H
NAD(P)
1,4-butanodiol

FIG. 1

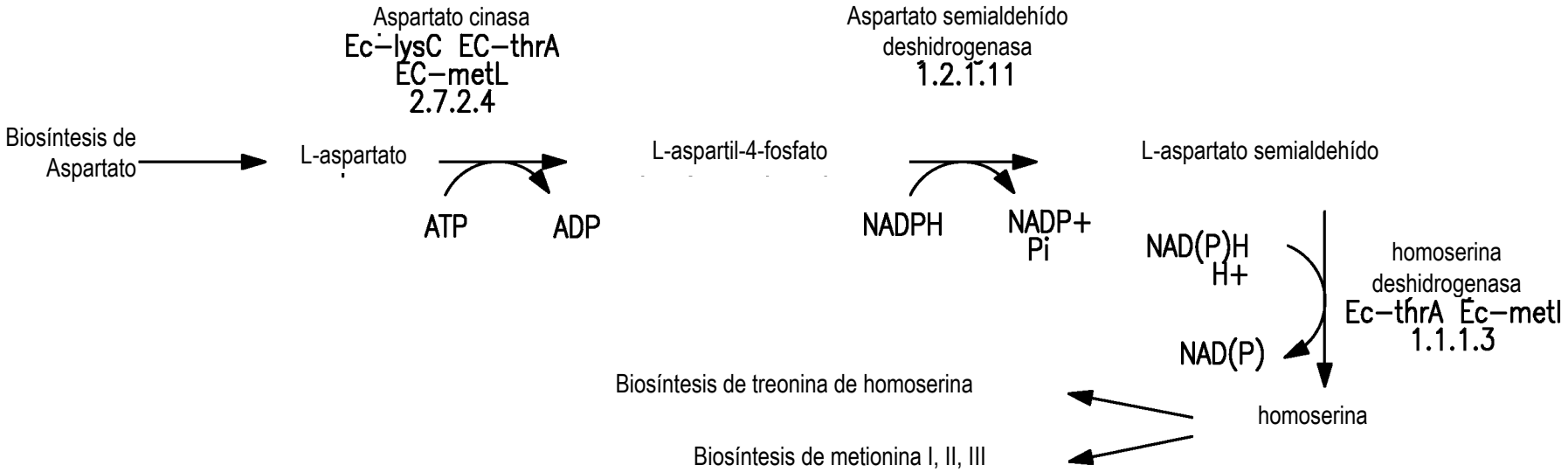

Aspartato cinasa
Ec-lysC EC-thrA
EC-metL
2.7.2.4
Aspartato semialdehído
deshidrogenasa
1.2.1.11
Biosíntesis de
Aspartato
L-aspartato
ATP
ADP
L-aspartil-4-fosfato
NADPH
NADP+
Pi
L-aspartato semialdehído
NAD(P)H
H+
NAD(P)
homoserina
deshidrogenasa
Ec-thrA Ec-metl
1.1.1.3
Biosíntesis de treonina de homoserina
homoserina
Biosíntesis de metionina I, II, III

FIG. 2

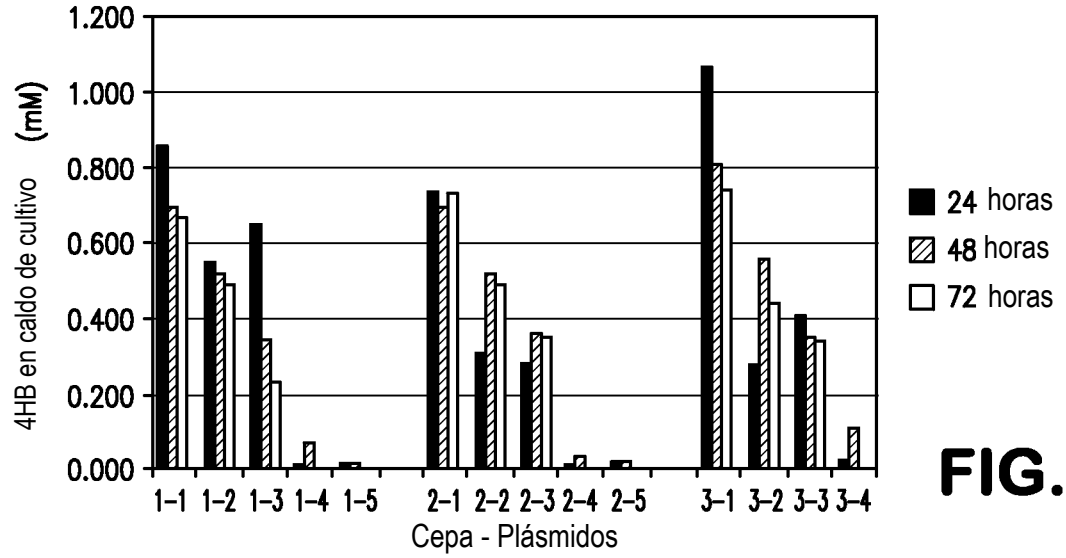


FIG. 3(a)

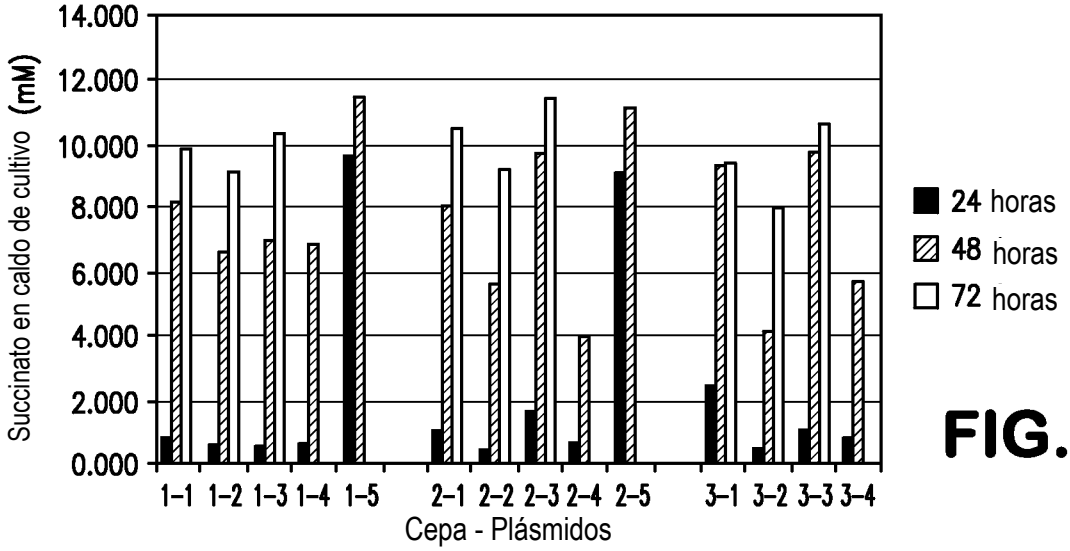


FIG. 3(b)

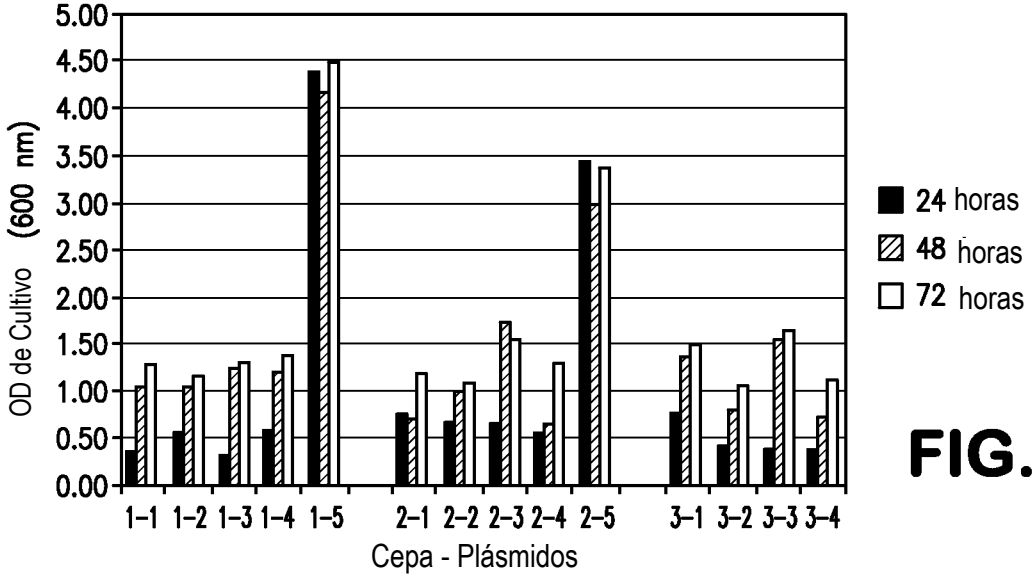


FIG. 3(c)

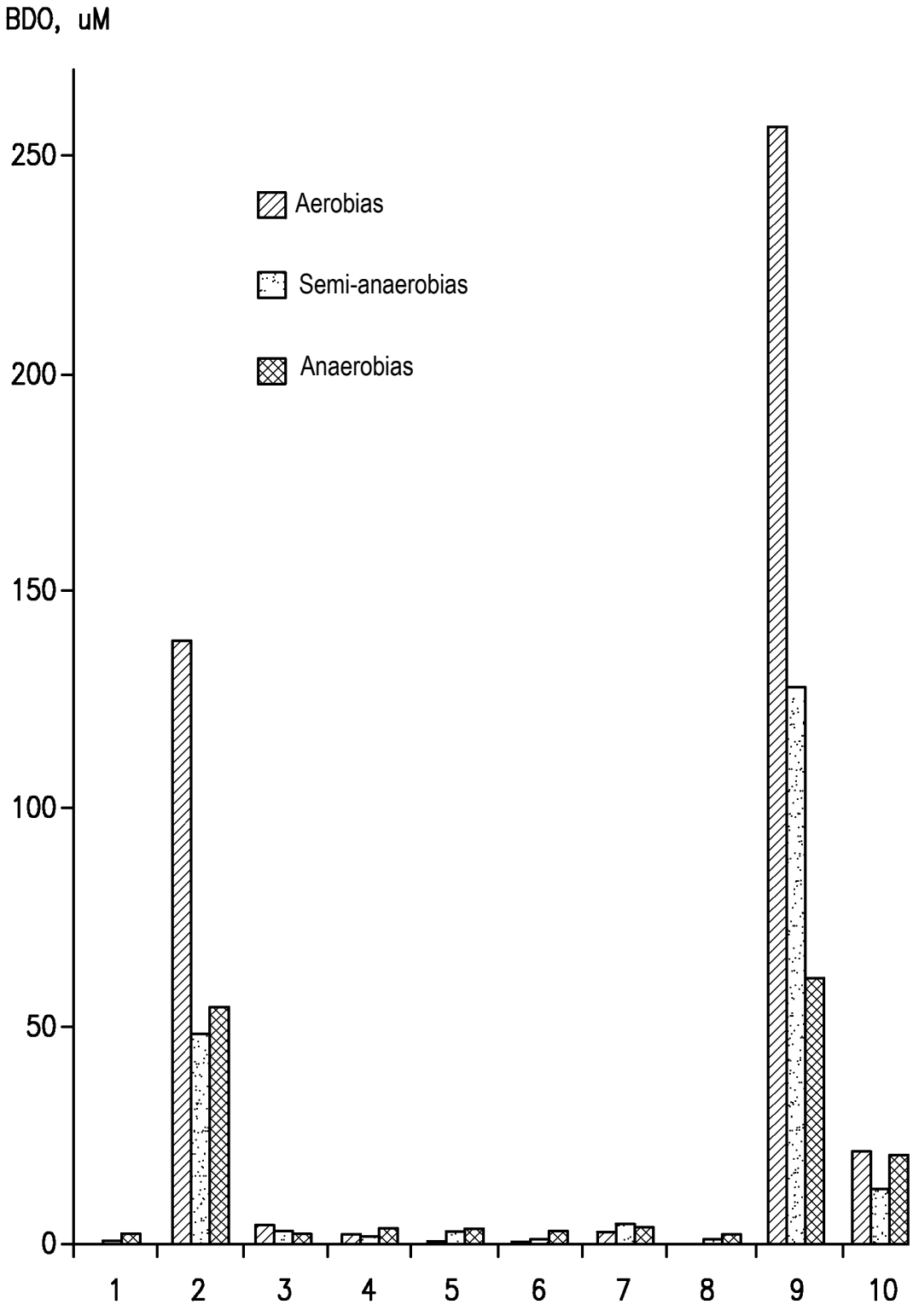

BDO, uM
250
200
150
100
50
0
Aerobias
Semi-anaerobias
Anaerobias
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

FIG. 5

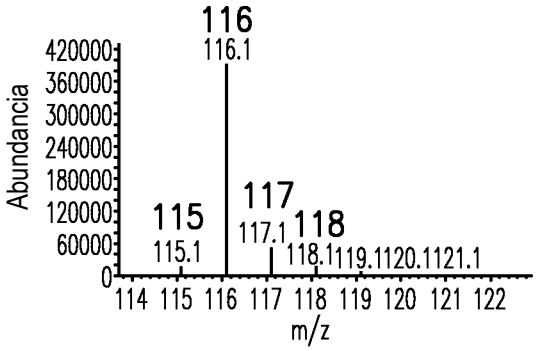


FIG. 6(a)

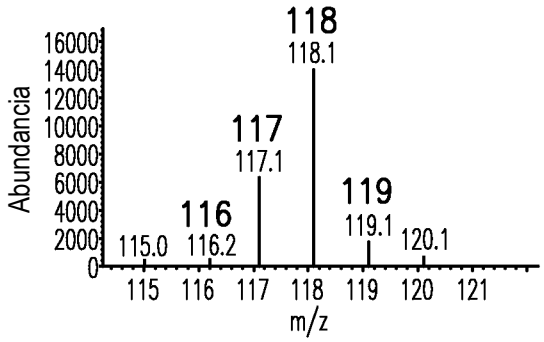


FIG. 6(b)

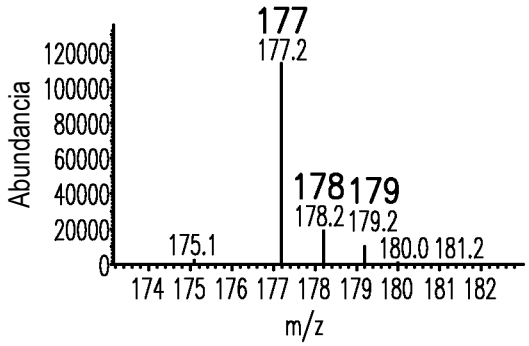


FIG. 6(c)

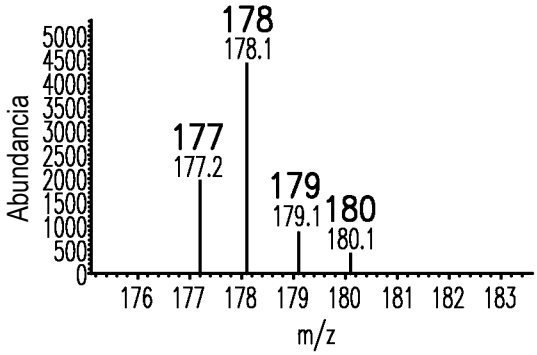


FIG. 6(d)

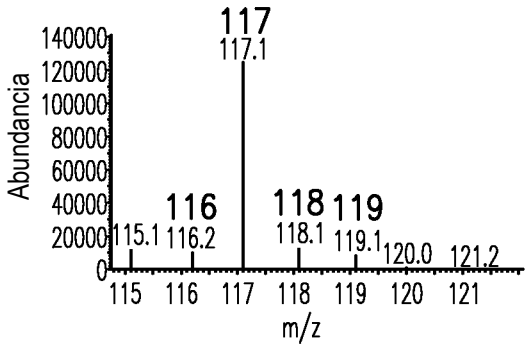


FIG. 6(e)

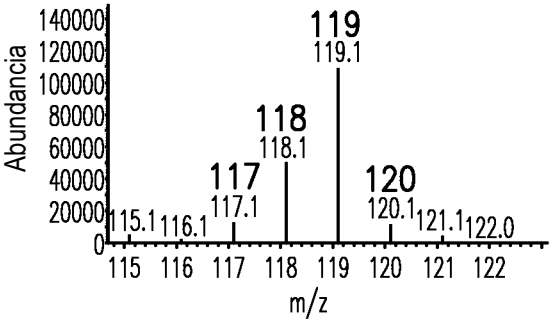


FIG. 6(f)

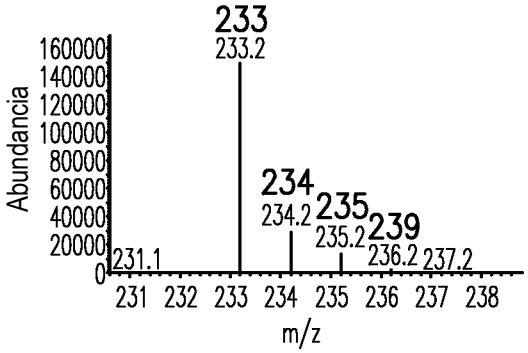


FIG. 6(g)

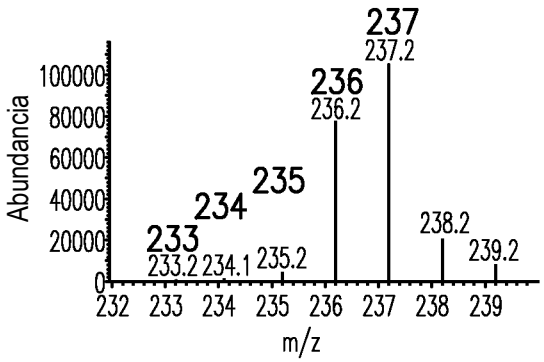


FIG. 6(h)

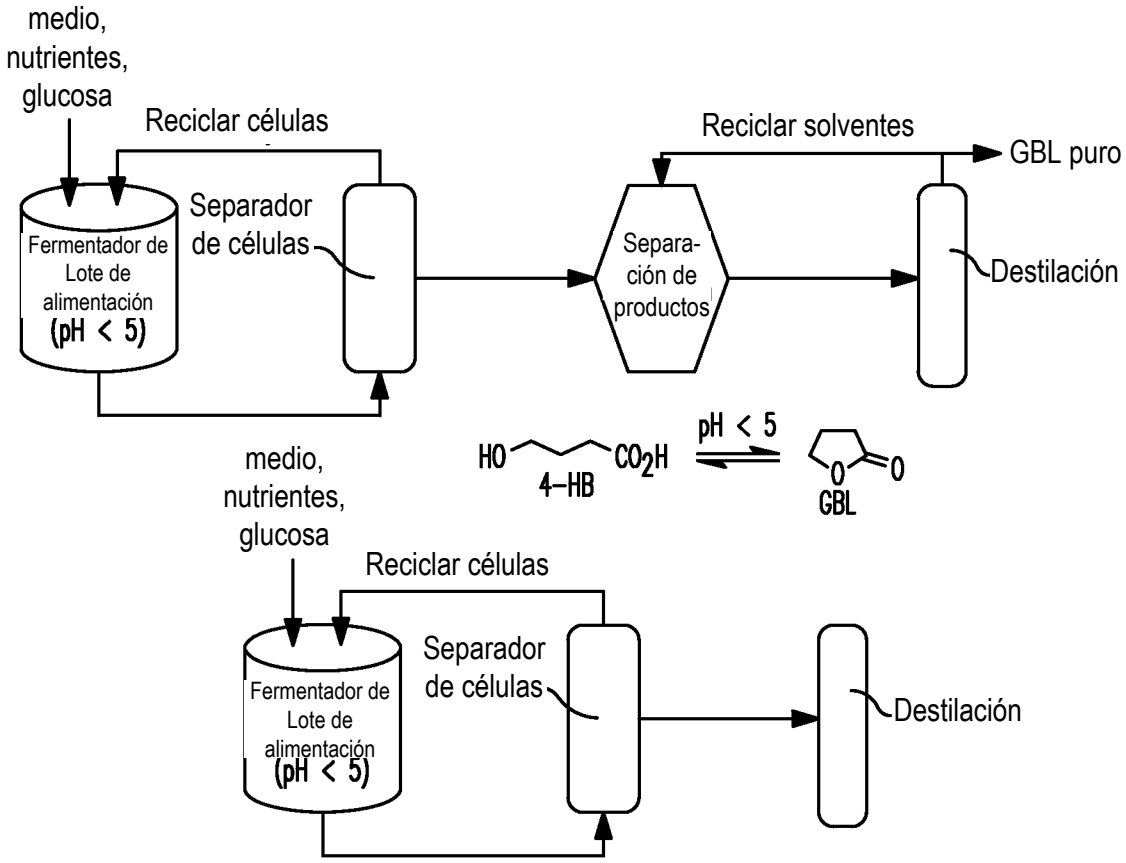

medio,
nutrientes,
glucosa
Reciclar células
Fermentador de Lote de alimentación (pH < 5)
Separador de células
Reciclar solventes
GBL puro
Separa-ción de productos
Destilación
HO
CO2H
4-HB
pH < 5
O
O
GBL
medio,
nutrientes,
glucosa
Reciclar células
Fermentador de Lote de alimentación (pH < 5)
Separador de células
Destilación

FIG. 7

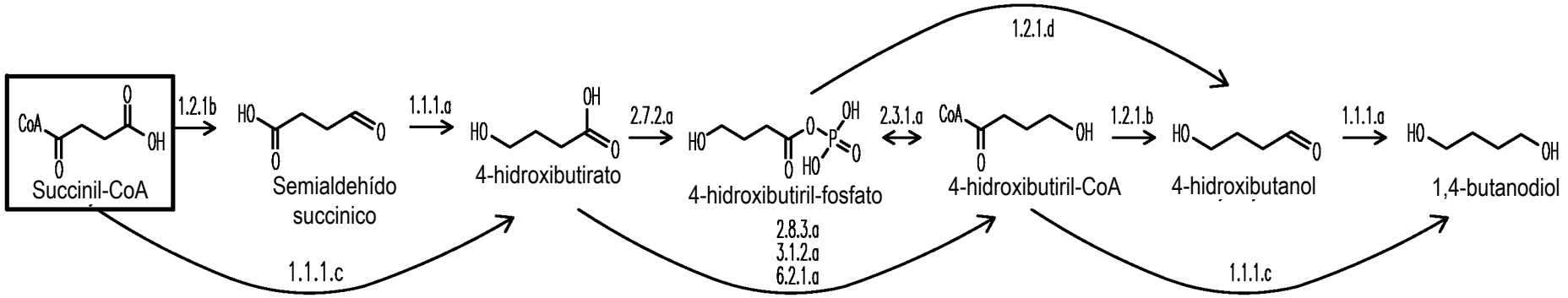

Succinil-CoA
1.2.1b
Semialdehído succinico
1.1.1.a
4-hidroxibutirato
2.7.2.a
4-hidroxibutiril-fosfato
2.3.1.a
4-hidroxibutiril-CoA
1.2.1.b
4-hidroxibutanol
1.1.1.a
1,4-butanodiol
1.2.1.d
1.1.1.c
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
1.1.1.c

FIG. 8A

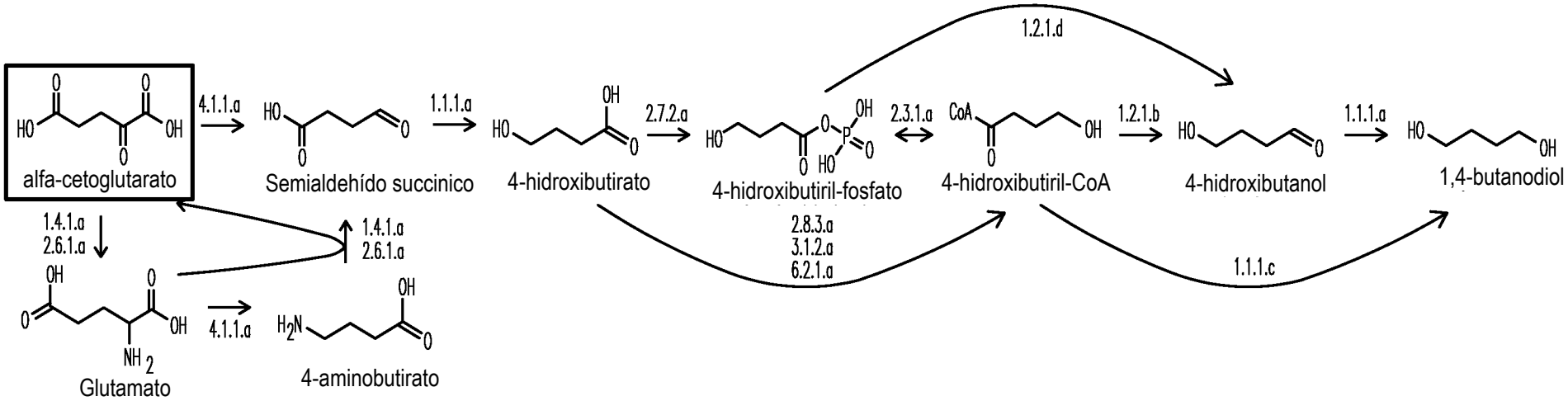

alfa-cetoglutarato
4.1.1.a
Semialdehído succinico
1.1.1.a
4-hidroxibutirato
2.7.2.a
4-hidroxibutiril-fosfato
2.3.1.a
4-hidroxibutiril-CoA
1.2.1.b
4-hidroxibutanol
1.1.1.a
1,4-butanodiol
1.2.1.d
1.4.1.a
2.6.1.a
1.4.1.a
2.6.1.a
Glutamato
4.1.1.a
4-aminobutirato
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
1.1.1.c

FIG. 8B

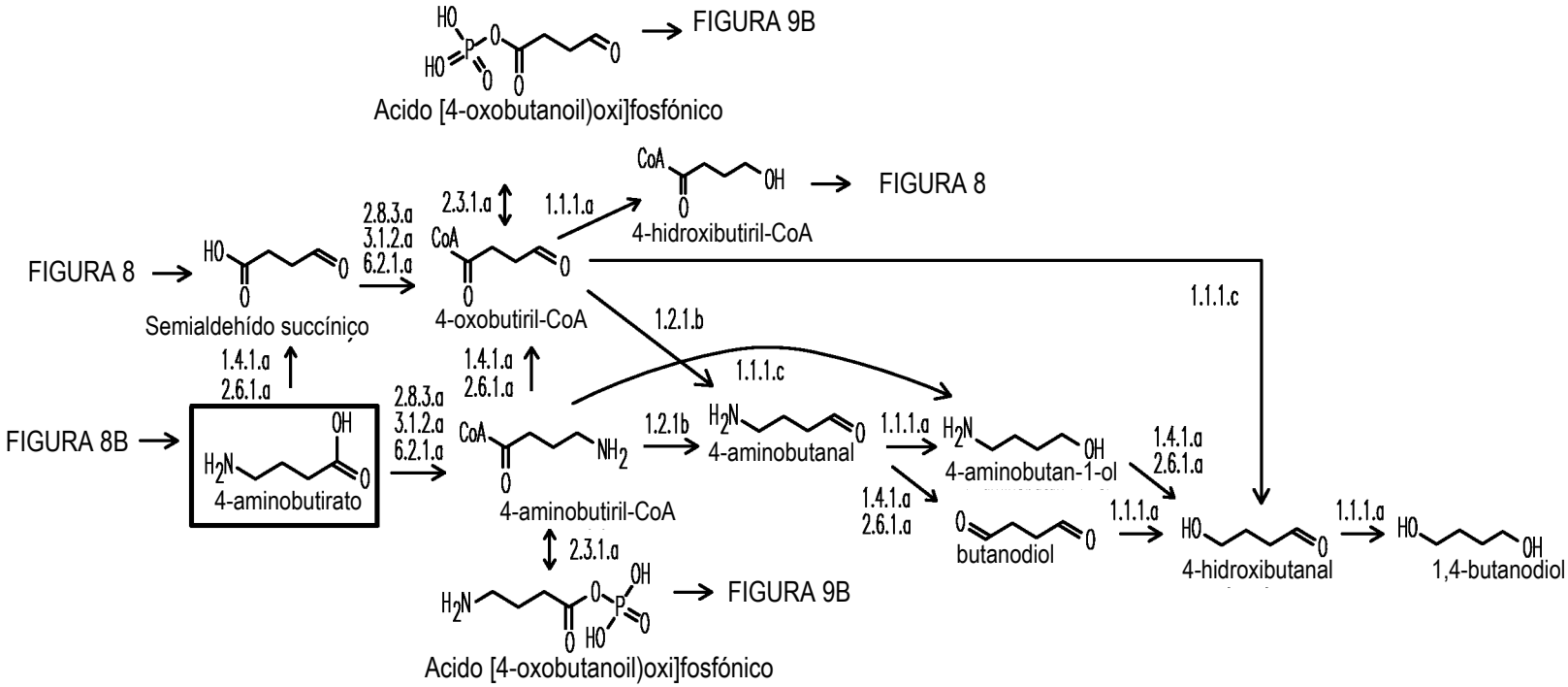

FIGURA 9B
Acido [4-oxobutanoil)oxi]fosfónico
FIGURA 8
4-hidroxibutiril-CoA
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
2.3.1.a
1.1.1.a
FIGURA 8
Semialdehído succínico
4-oxobutiril-CoA
1.2.1.b
1.1.1.c
1.4.1.a
2.6.1.a
FIGURA 8B
4-aminobutirato
4-aminobutiril-CoA
4-aminobutanal
4-aminobutan-1-ol
butanodiol
4-hidroxibutanal
1,4-butanodiol
FIGURA 9B
Acido [4-oxobutanoil)oxi]fosfónico

FIG. 9A

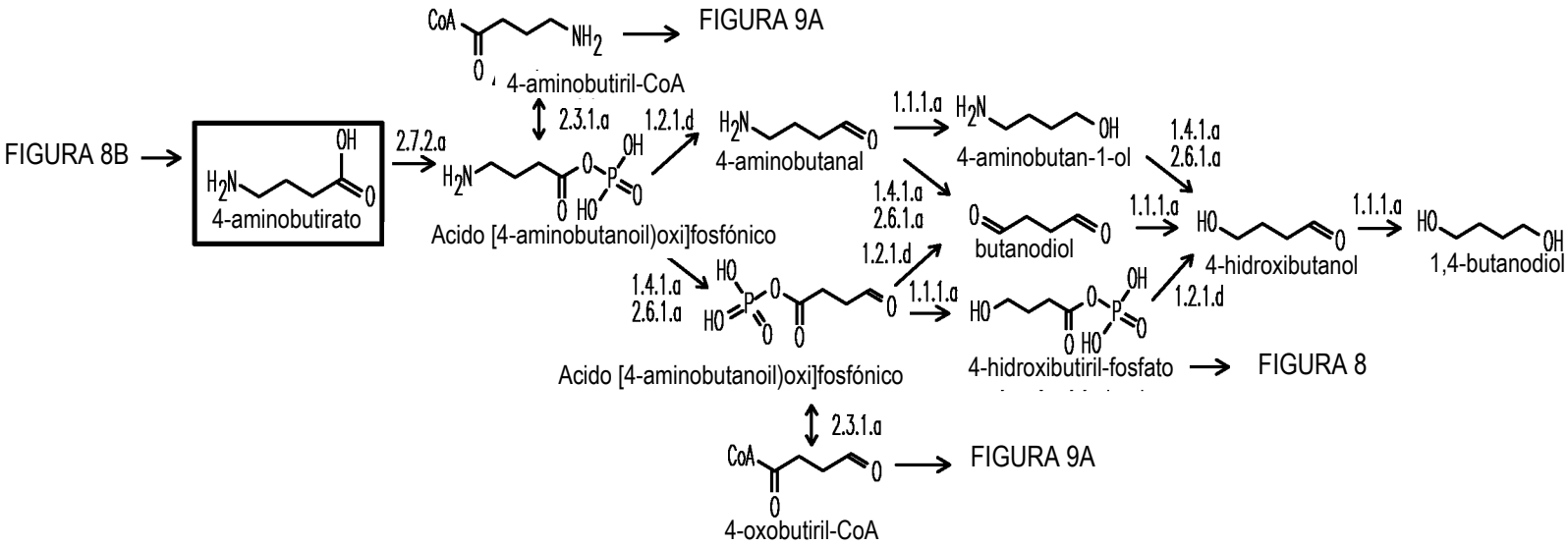

FIGURA 9A
4-aminobutiril-CoA
FIGURA 8B
4-aminobutirato
2.7.2.a
2.3.1.a
1.2.1.d
Acido [4-aminobutanoil)oxi]fosfónico
4-aminobutanal
1.1.1.a
4-aminobutan-1-ol
1.4.1.a
2.6.1.a
butanodiol
4-hidroxibutanol
1,4-butanodiol
Acido [4-aminobutanoil)oxi]fosfónico
4-hidroxibutiril-fosfato
FIGURA 8
FIGURA 9A
4-oxobutiril-CoA

FIG. 9B

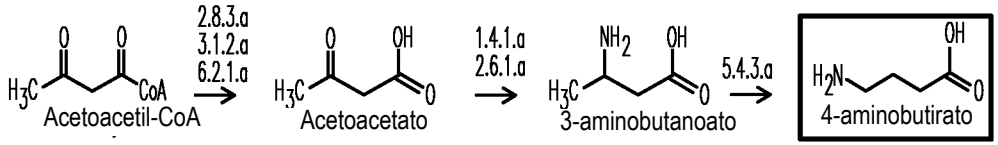
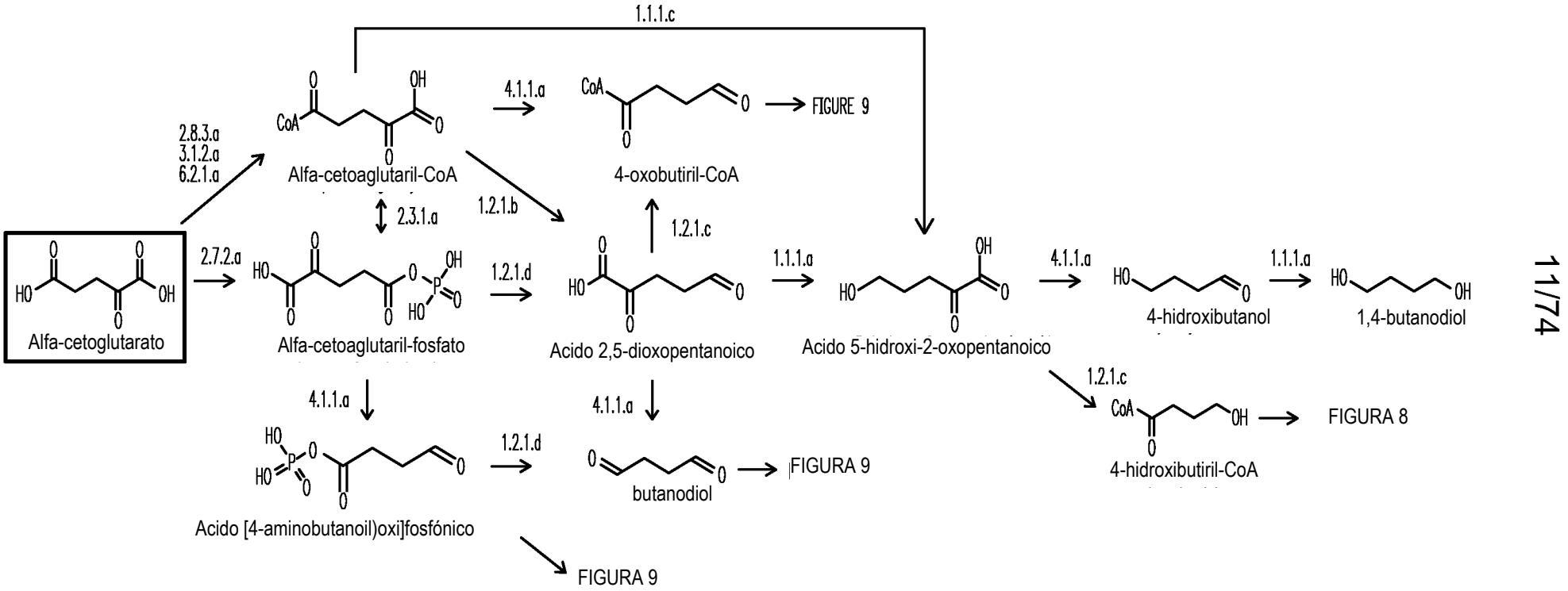

Acetoacetil-CoA
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
Acetoacetato
1.4.1.a
2.6.1.a
3-aminobutanoato
5.4.3.a
4-aminobutirato

FIG. 9C


1.1.1.c
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
Alfa-cetoaglutaril-CoA
4.1.1.a
4-oxobutiril-CoA
FIGURE 9
2.3.1.a
1.2.1.b
1.2.1.c
Alfa-cetoglutarato
2.7.2.a
Alfa-cetoaglutaril-fosfato
1.2.1.d
Acido 2,5-dioxopentanoico
1.1.1.a
Acido 5-hidroxi-2-oxopentanoico
4.1.1.a
4-hidroxibutanol
1.1.1.a
1,4-butanodiol
1.2.1.c
4-hidroxibutiril-CoA
FIGURA 8
4.1.1.a
4.1.1.a
1.2.1.d
butanodiol
FIGURA 9
Acido [4-aminobutanoil)oxi]fosfónico
FIGURA 9

11/74

FIG. 10

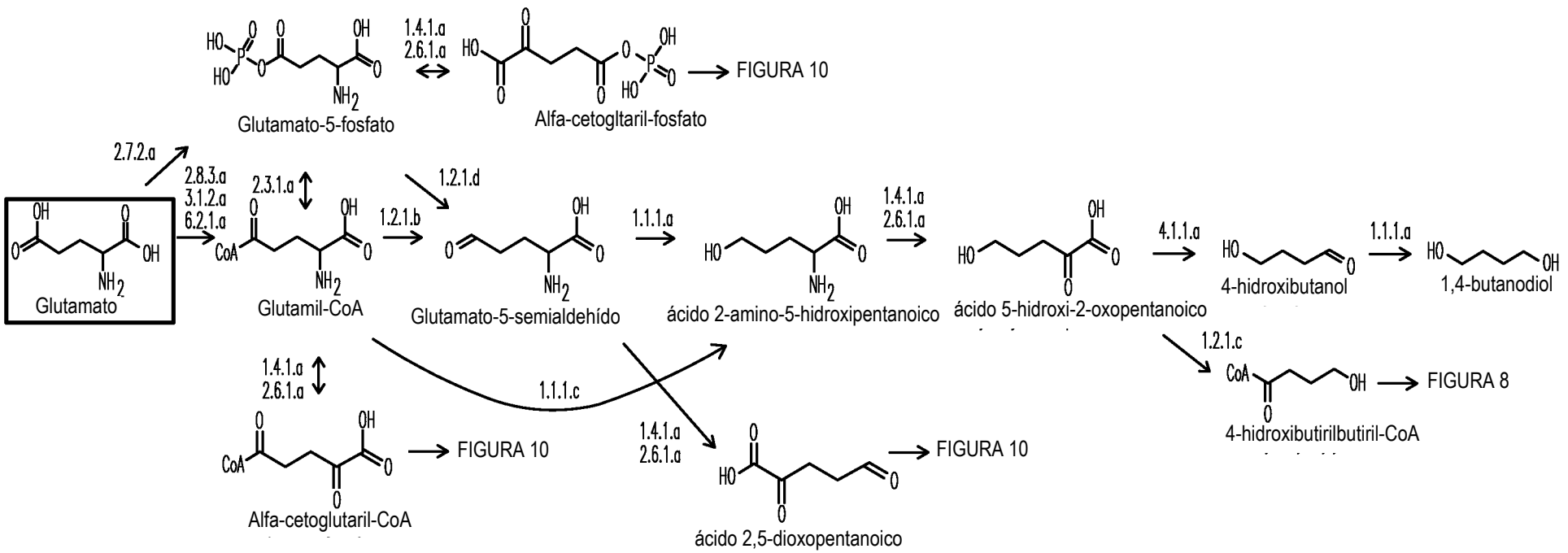

Glutamato-5-fosfato
1.4.1.a
2.6.1.a
Alfa-cetogltaril-fosfato
FIGURA 10
2.7.2.a
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
Glutamato
2.3.1.a
Glutamil-CoA
1.2.1.b
1.2.1.d
Glutamato-5-semialdehído
1.1.1.a
ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico
1.4.1.a
2.6.1.a
ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico
4.1.1.a
4-hidroxibutanol
1.1.1.a
1,4-butanodiol
1.2.1.c
4-hidroxibutirilbutiril-CoA
FIGURA 8
1.4.1.a
2.6.1.a
Alfa-cetoglutaril-CoA
FIGURA 10
1.1.1.c
1.4.1.a
2.6.1.a
ácido 2,5-dioxopentanoico
FIGURA 10

FIG. 11

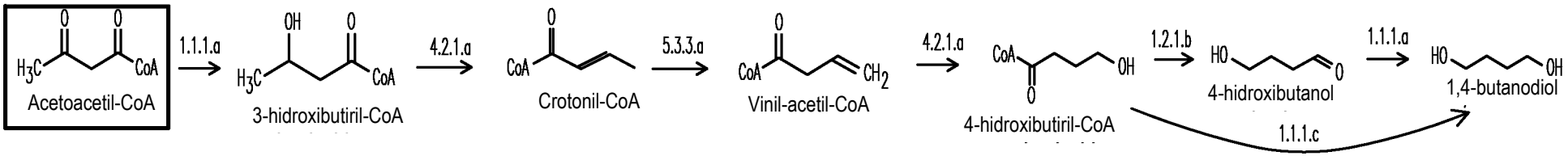

Acetoacetil-CoA
1.1.1.a
3-hidroxibutiril-CoA
4.2.1.a
Crotonil-CoA
5.3.3.a
Vinil-acetil-CoA
4.2.1.a
4-hidroxibutiril-CoA
1.2.1.b
4-hidroxibutanol
1.1.1.a
1,4-butanodiol
1.1.1.c

FIG. 12

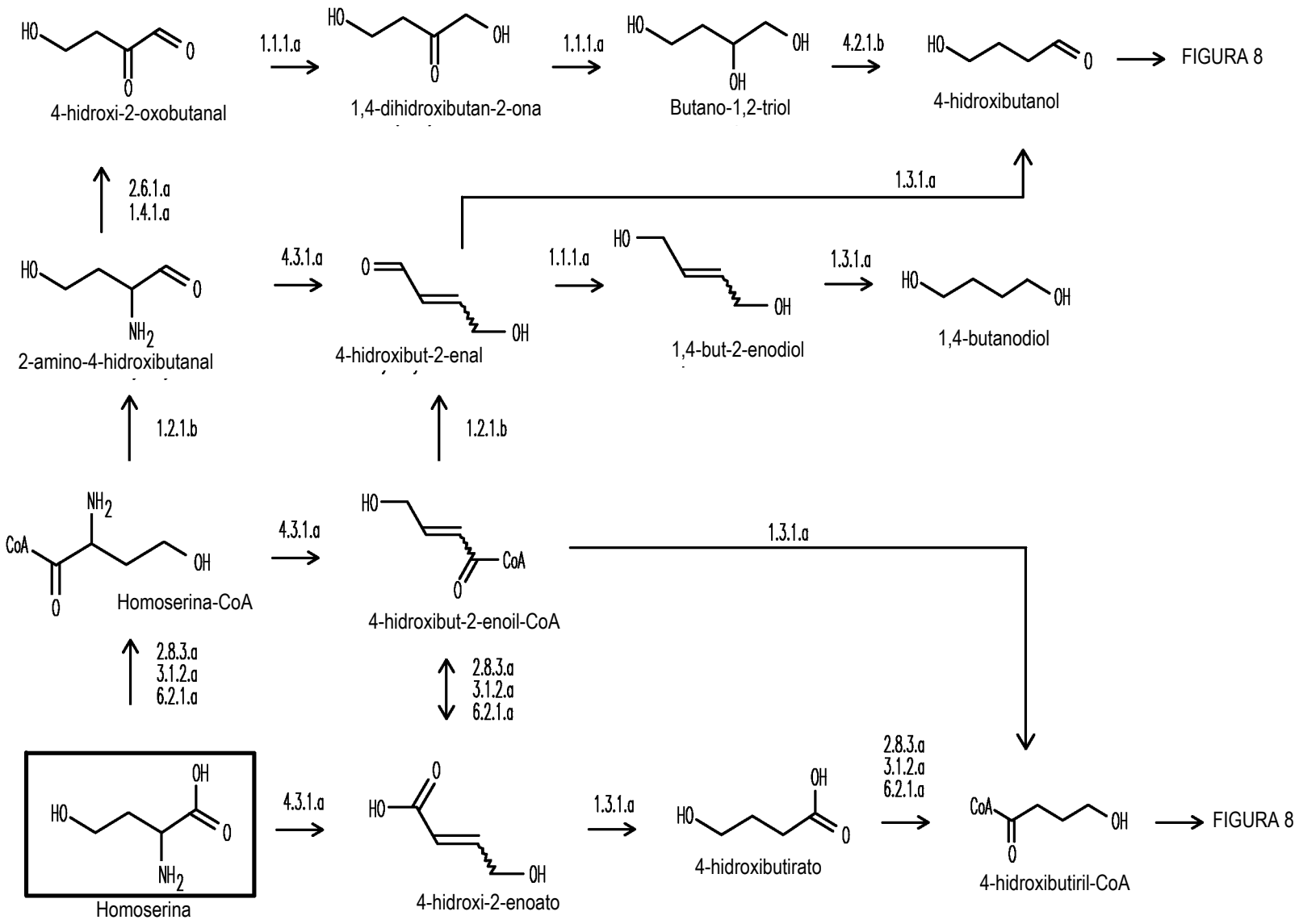

4-hidroxi-2-oxobutanal
1.1.1.a
1,4-dihidroxibutan-2-ona
1.1.1.a
Butano-1,2-triol
4.2.1.b
4-hidroxibutanol
FIGURA 8
2.6.1.a
1.4.1.a
1.3.1.a
2-amino-4-hidroxibutanal
4.3.1.a
4-hidroxibut-2-enal
1.1.1.a
1,4-but-2-enodiol
1.3.1.a
1,4-butanodiol
1.2.1.b
1.2.1.b
Homoserina-CoA
4.3.1.a
4-hidroxibut-2-enoil-CoA
1.3.1.a
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
Homoserina
4.3.1.a
4-hidroxi-2-enoato
1.3.1.a
4-hidroxibutirato
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
4-hidroxibutiril-CoA
FIGURA 8

FIG. 13

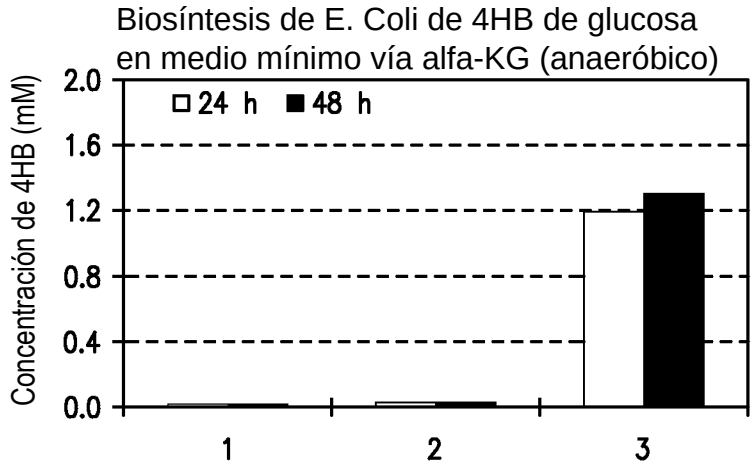

Biosíntesis de E. Coli de 4HB de glucosa
en medio mínimo vía alfa-KG (anaeróbico)
Concentración de 4HB (mM)
24 h
48 h
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
1
2
3

FIG. 16

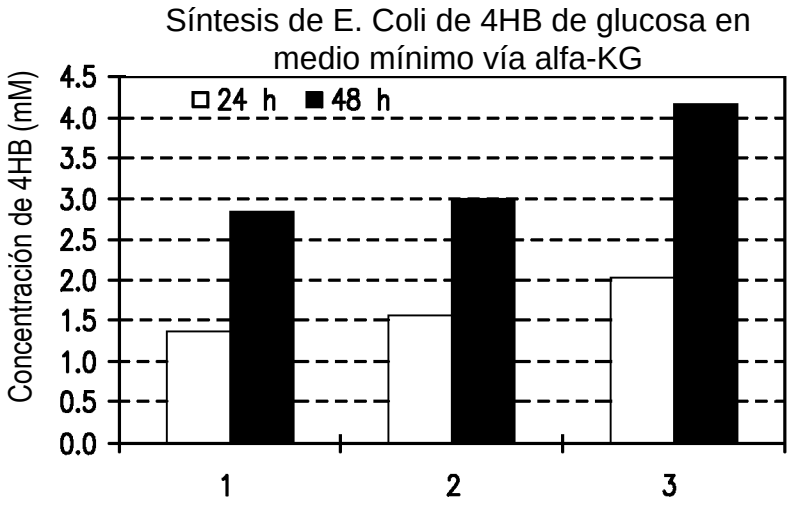

Síntesis de E. Coli de 4HB de glucosa en
medio mínimo vía alfa-KG
Concentración de 4HB (mM)
24 h
48 h
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
2
3

FIG. 17

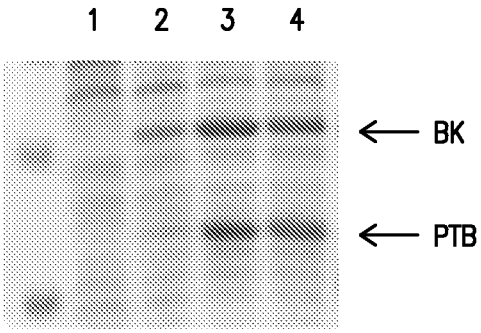


FIG. 25A

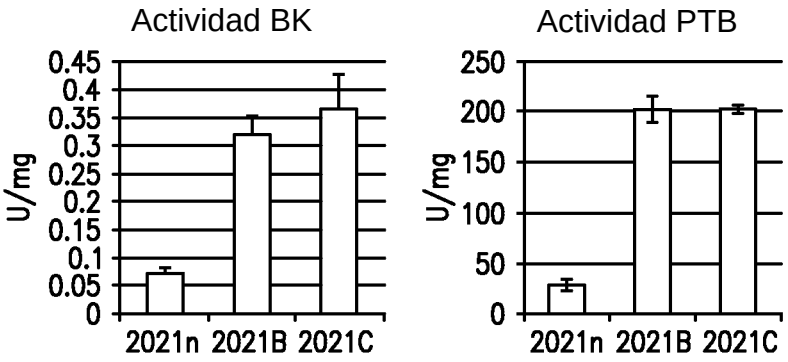


FIG. 25B

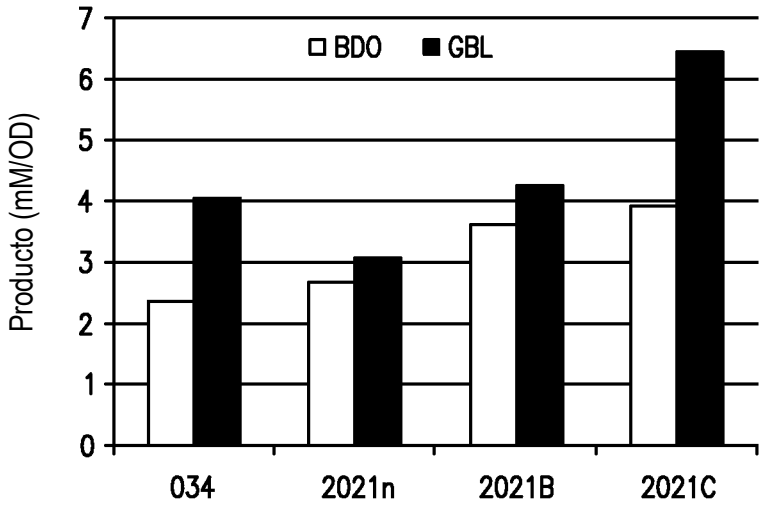


FIG. 26

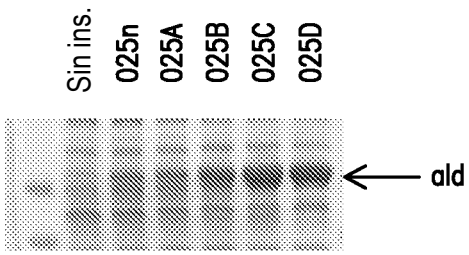


FIG. 29

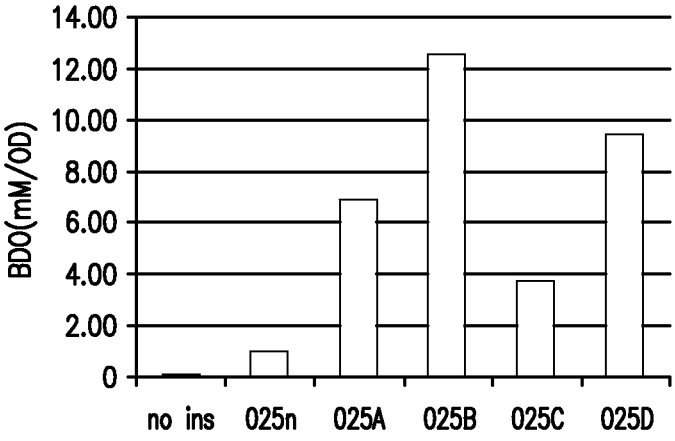


FIG. 30A

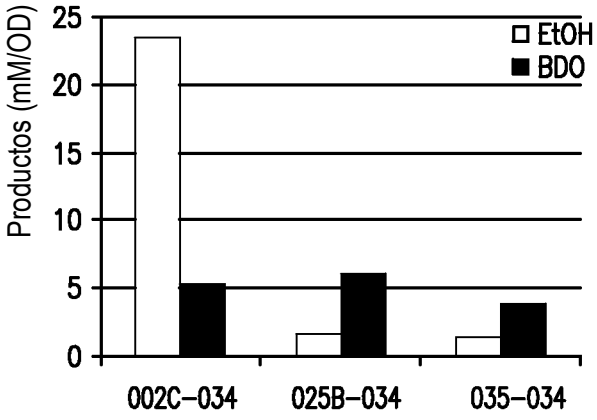


FIG. 30B

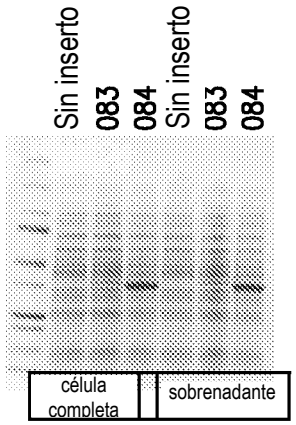


FIG. 32A

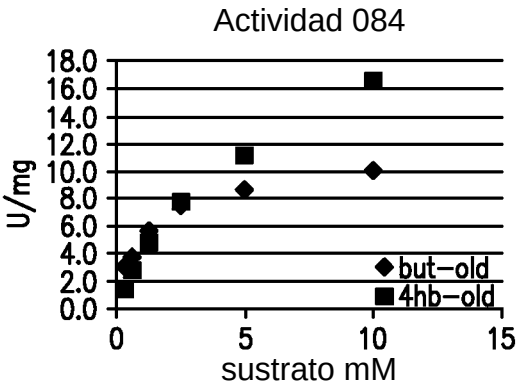


FIG. 32B

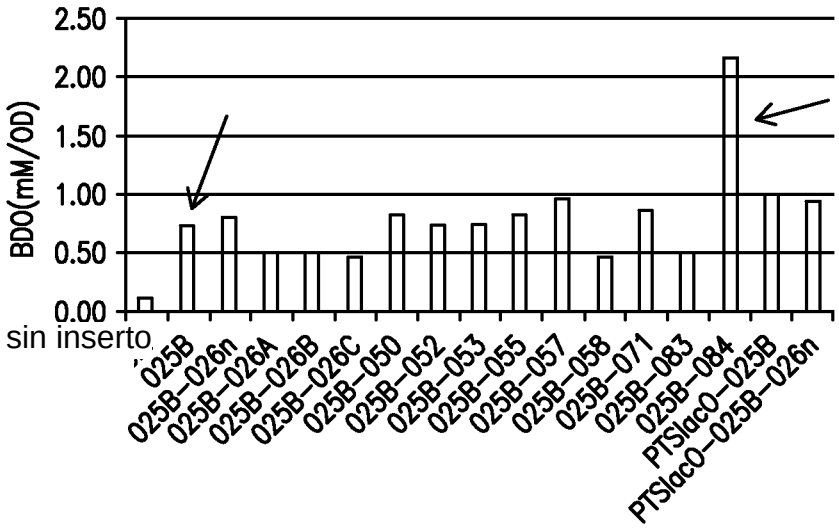


FIG. 33

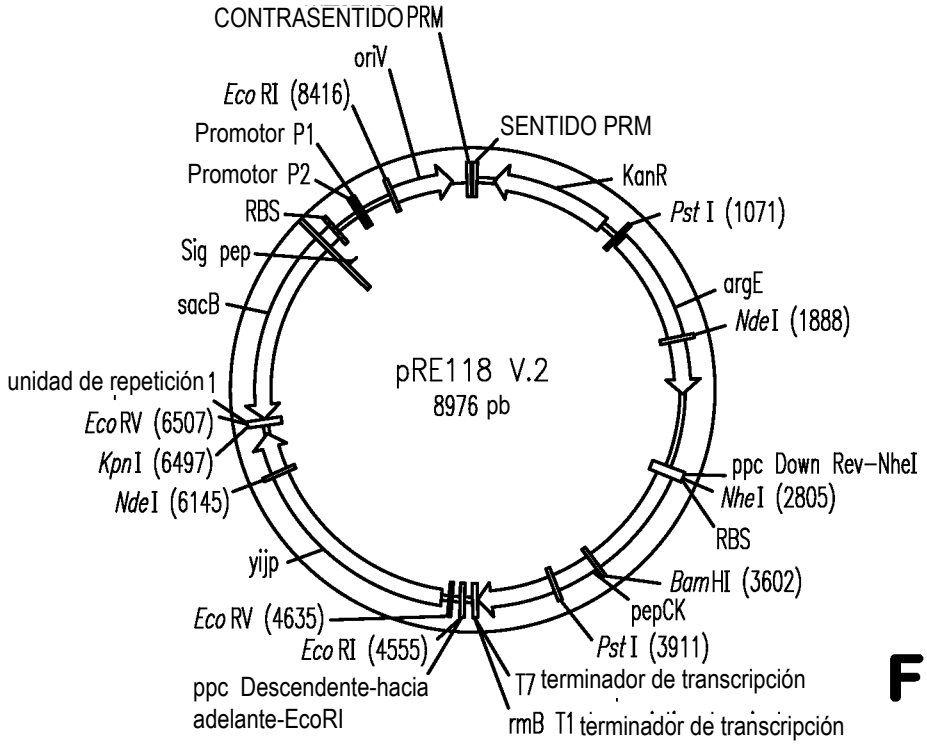


FIG. 34

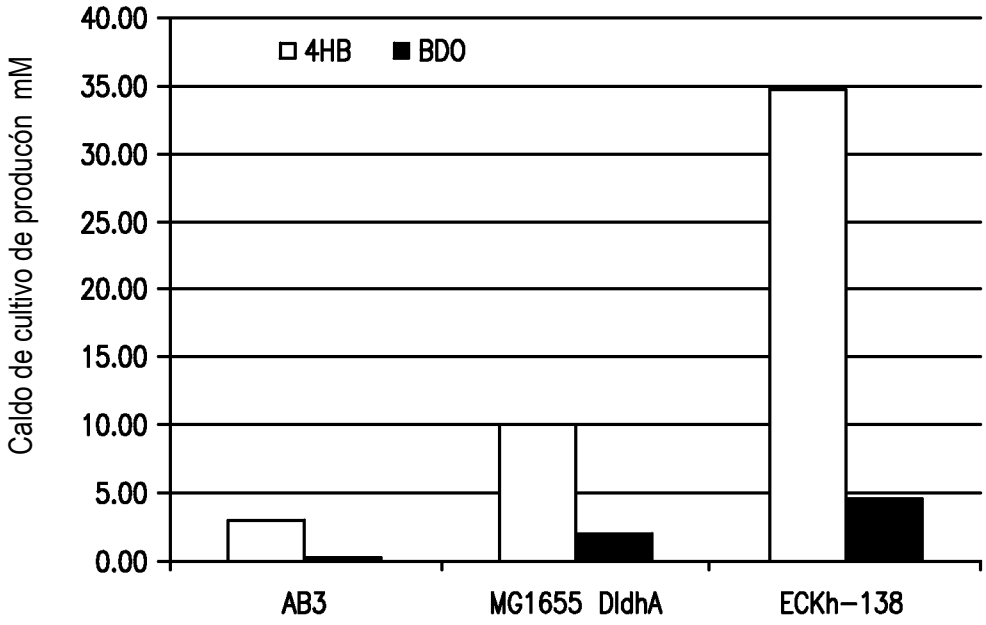


FIG. 37

*ataataatacatatgaaccat*gcgagttacgggcctat**aagccaggcgagat<u>atgatctatatcaa</u>tttctcatctataatgctttgtta gtatctcgtcgccgacttaataaagagagagtta**gtgtgaaagctgacaacccttttgatcttttacttcctgctgcaatggccaaagtgg ccgaagaggcgggtgtctataaagcaacgaaacatccgcttaagactttctatctggcgattaccgccggtgttttcatctcaatcgcattc accactggcacaggcacaGAAGGTAGGTGTTACatgtcagaacgtttacaca*atgacgtggatcctattattat*

FIG. 38

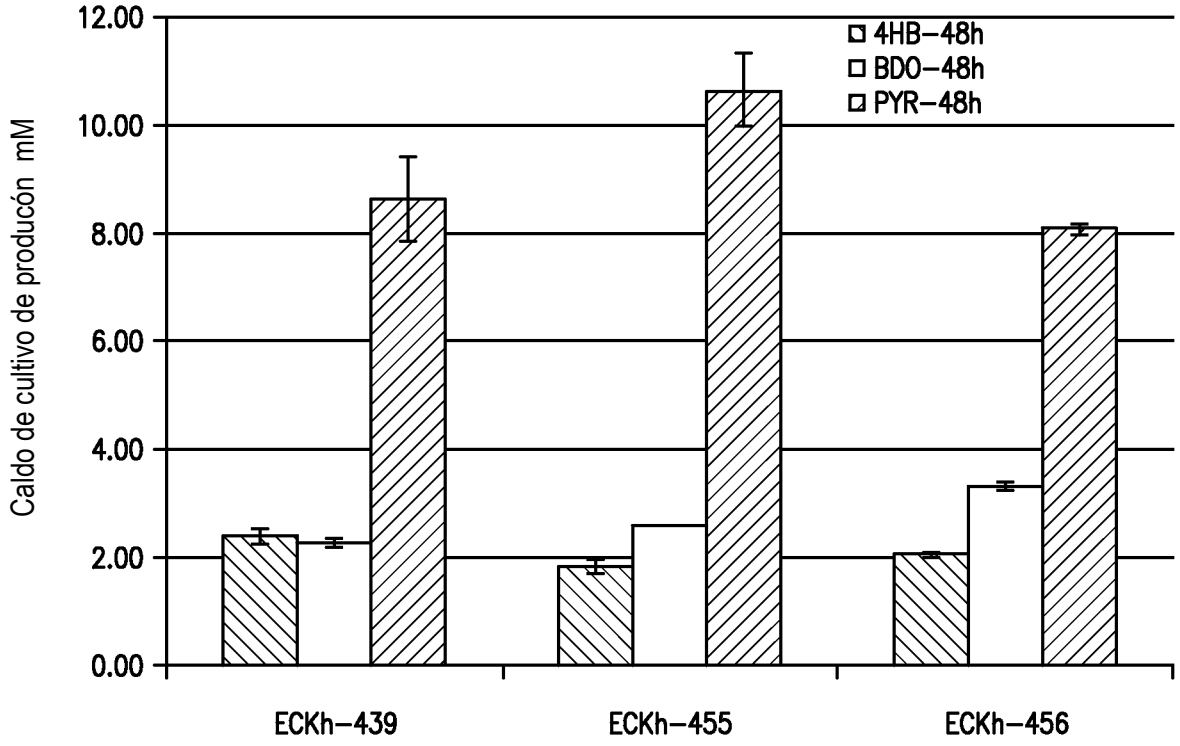


FIG. 40

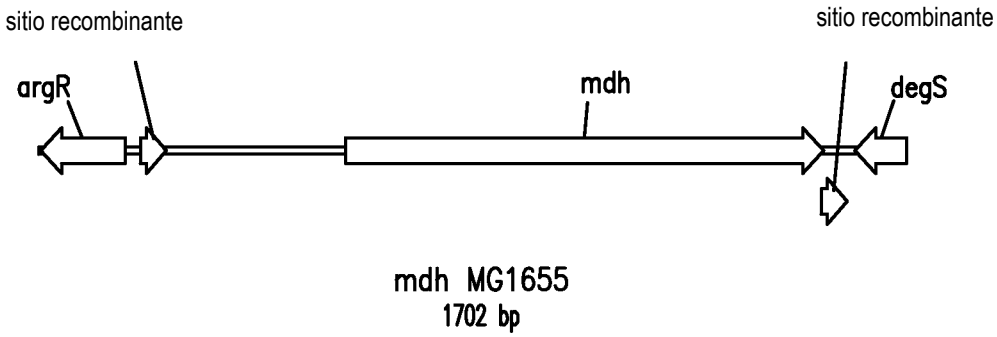


FIG. 41A

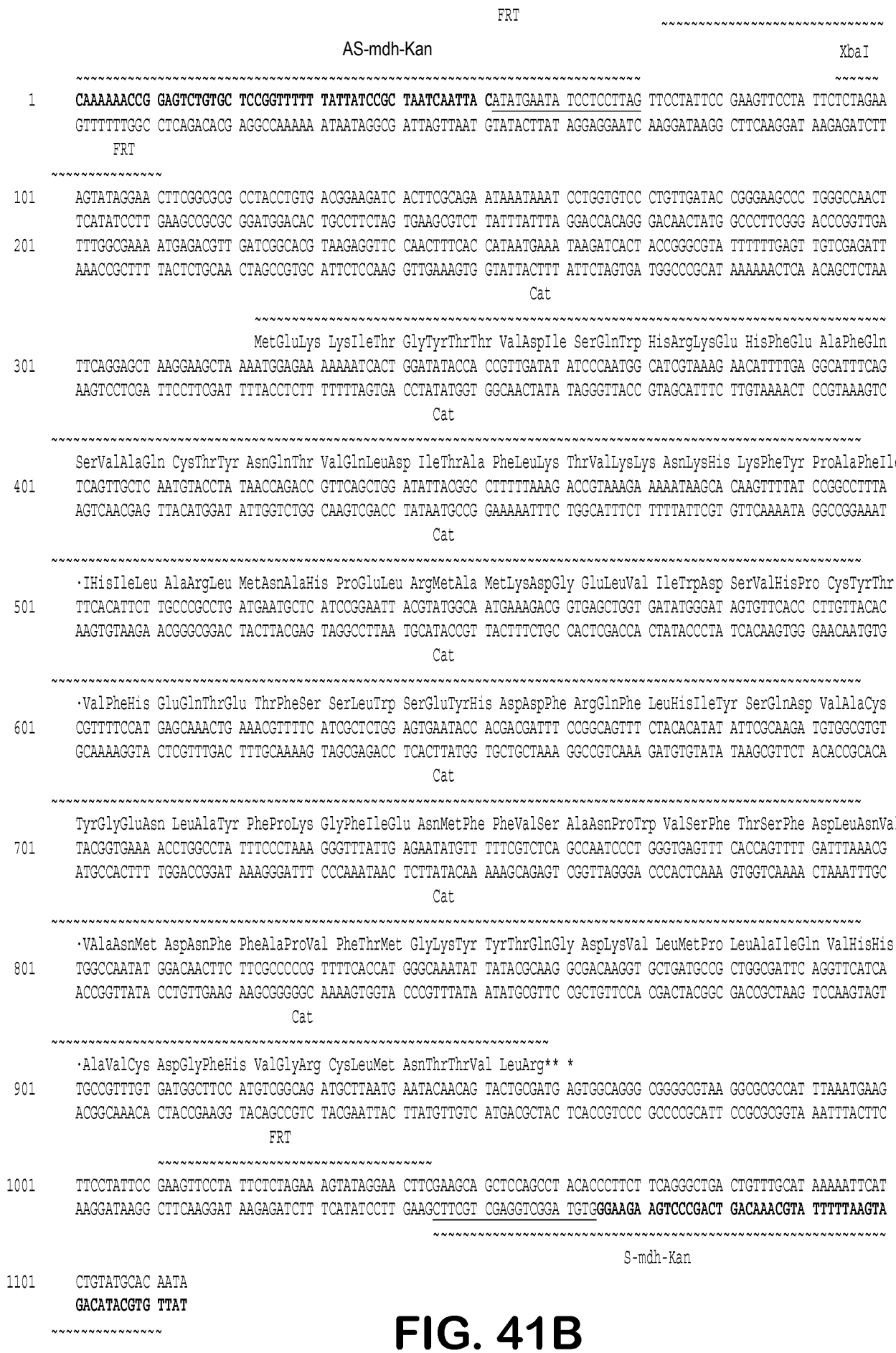


FIG. 41B

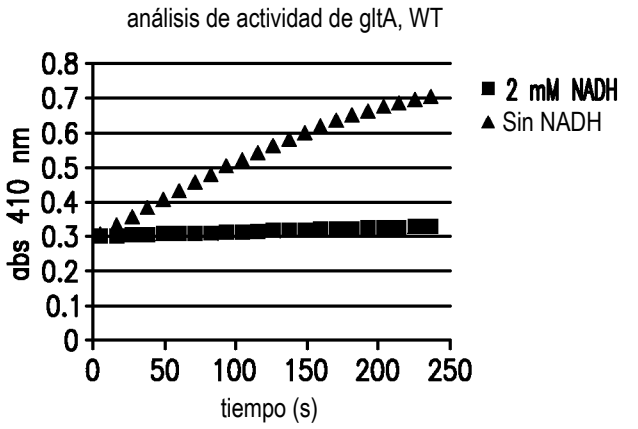


FIG. 44A

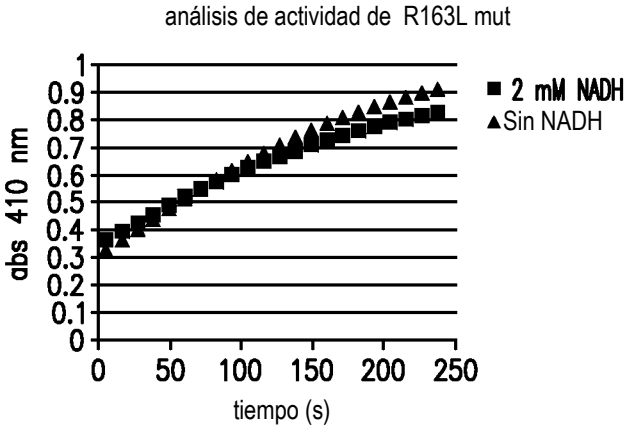


FIG. 44B

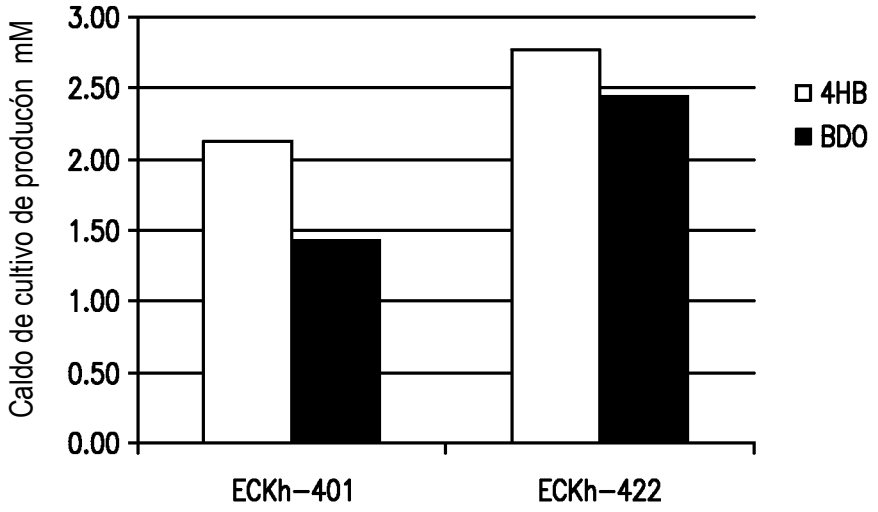


FIG. 45

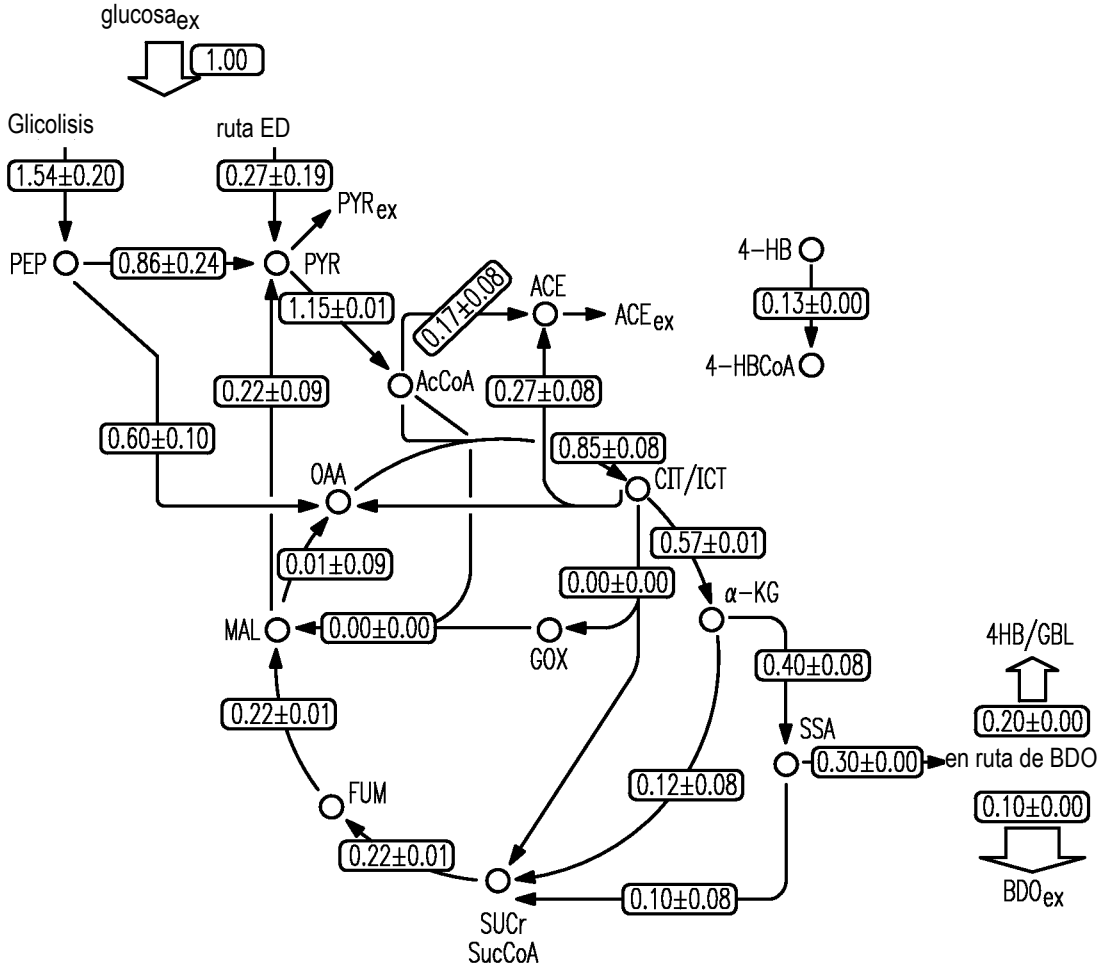


FIG. 46

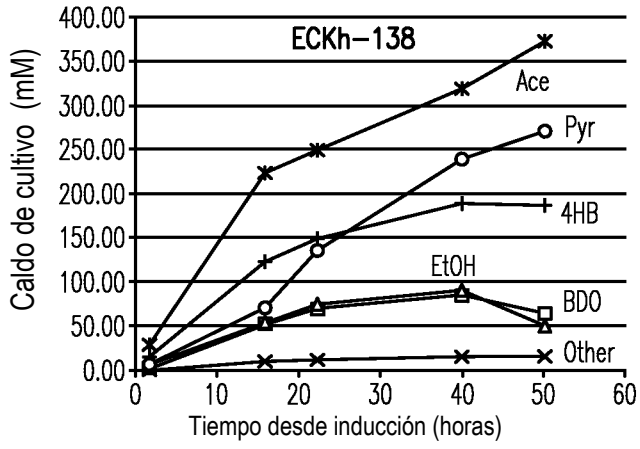


FIG. 47A

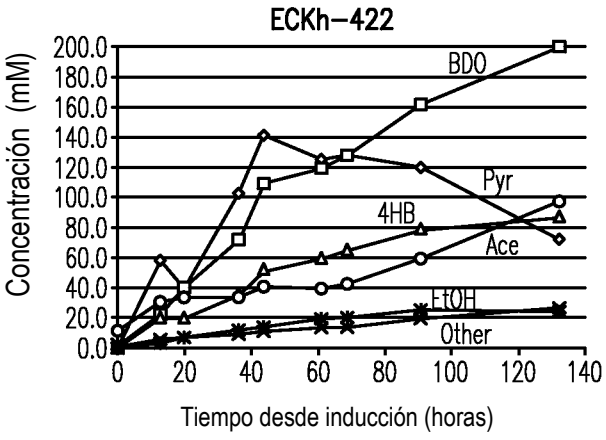


FIG. 47B

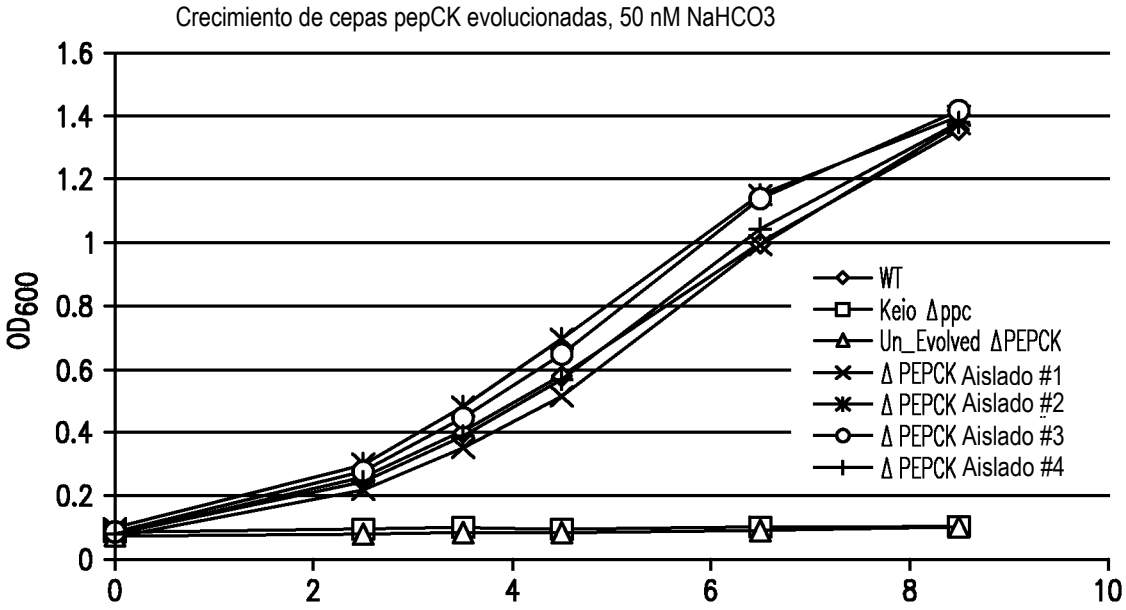

Crecimiento de cepas pepCK evolucionadas, 50 nM NaHCO3
OD600
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
2
4
6
8
10
WT
Keio Δppc
Un_Evolved ΔPEPCK
Δ PEPCK Aislado #1
Δ PEPCK Aislado #2
Δ PEPCK Aislado #3
Δ PEPCK Aislado #4

FIG. 49

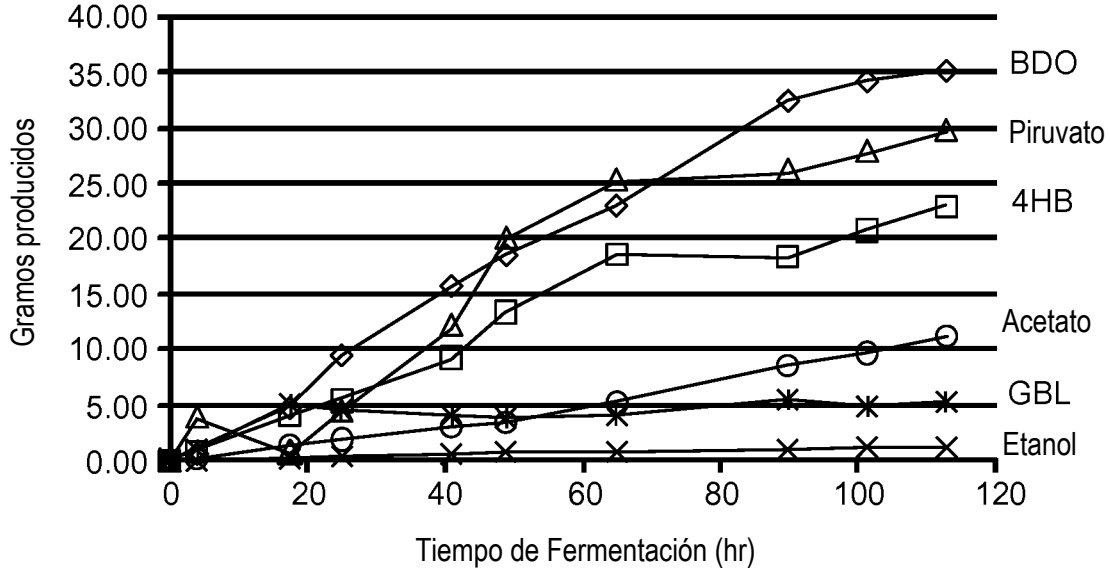

Gramos producidos
40.00
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
0
20
40
60
80
100
120
Tiempo de Fermentación (hr)
BDO
Piruvato
4HB
Acetato
GBL
Etanol

FIG. 50

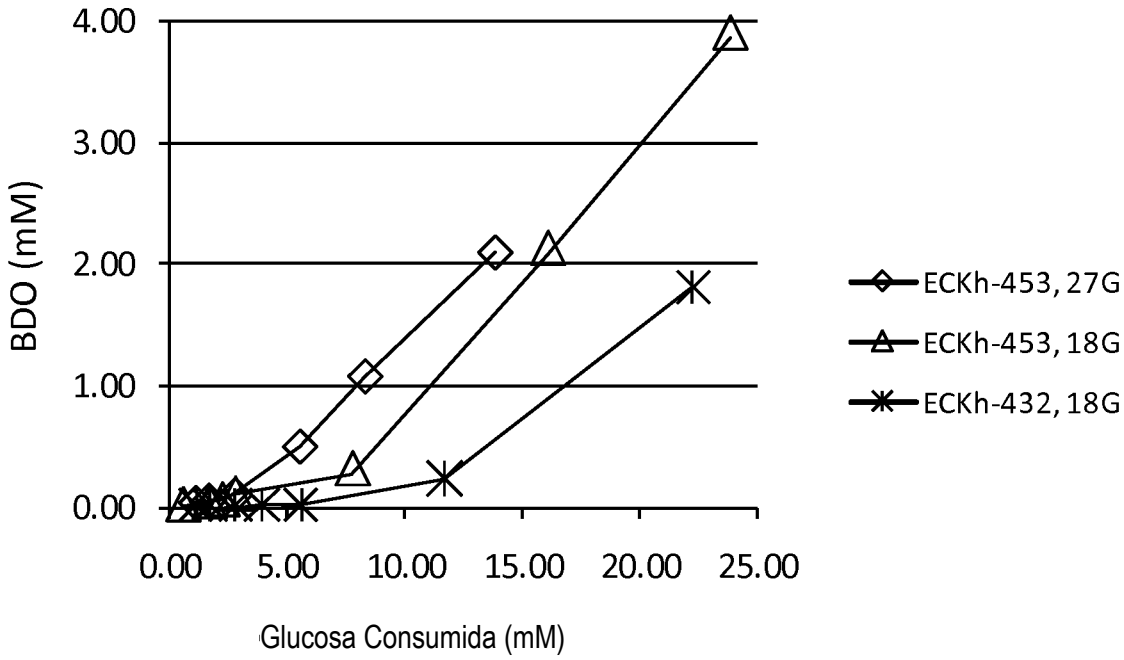

4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
BDO (mM)
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
Glucosa Consumida (mM)
ECKh-453, 27G
ECKh-453, 18G
ECKh-432, 18G

FIG. 51

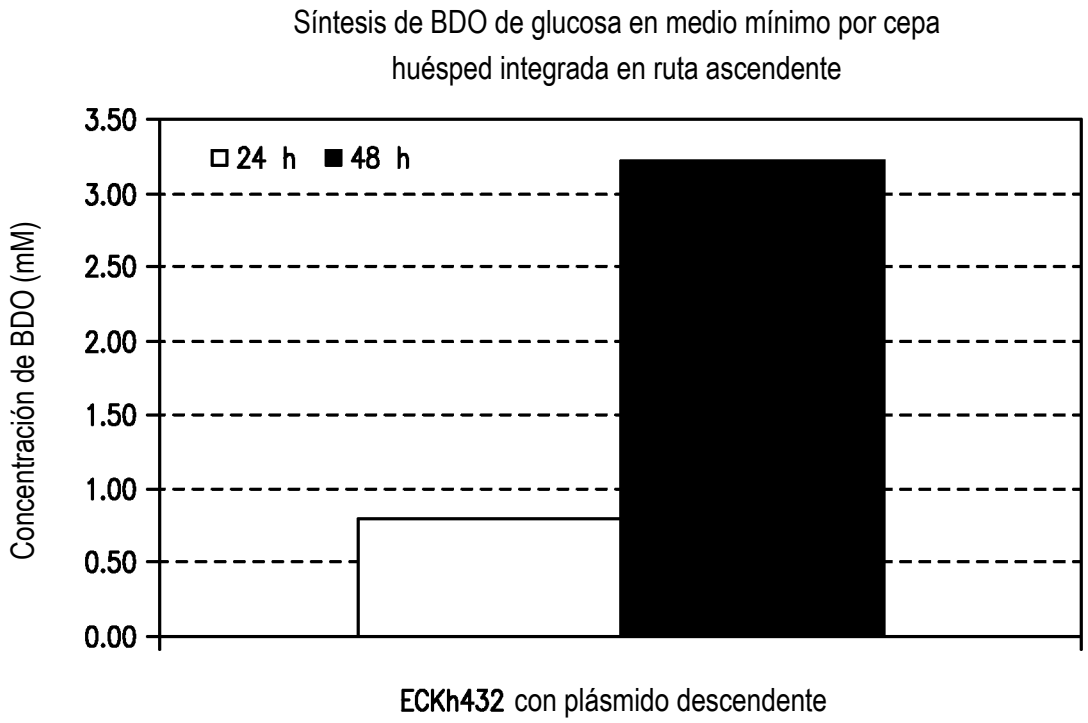

Síntesis de BDO de glucosa en medio mínimo por cepa huésped integrada en ruta ascendente
Concentración de BDO (mM)
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
24 h
48 h
ECKh432 con plásmido descendente

FIG. 54

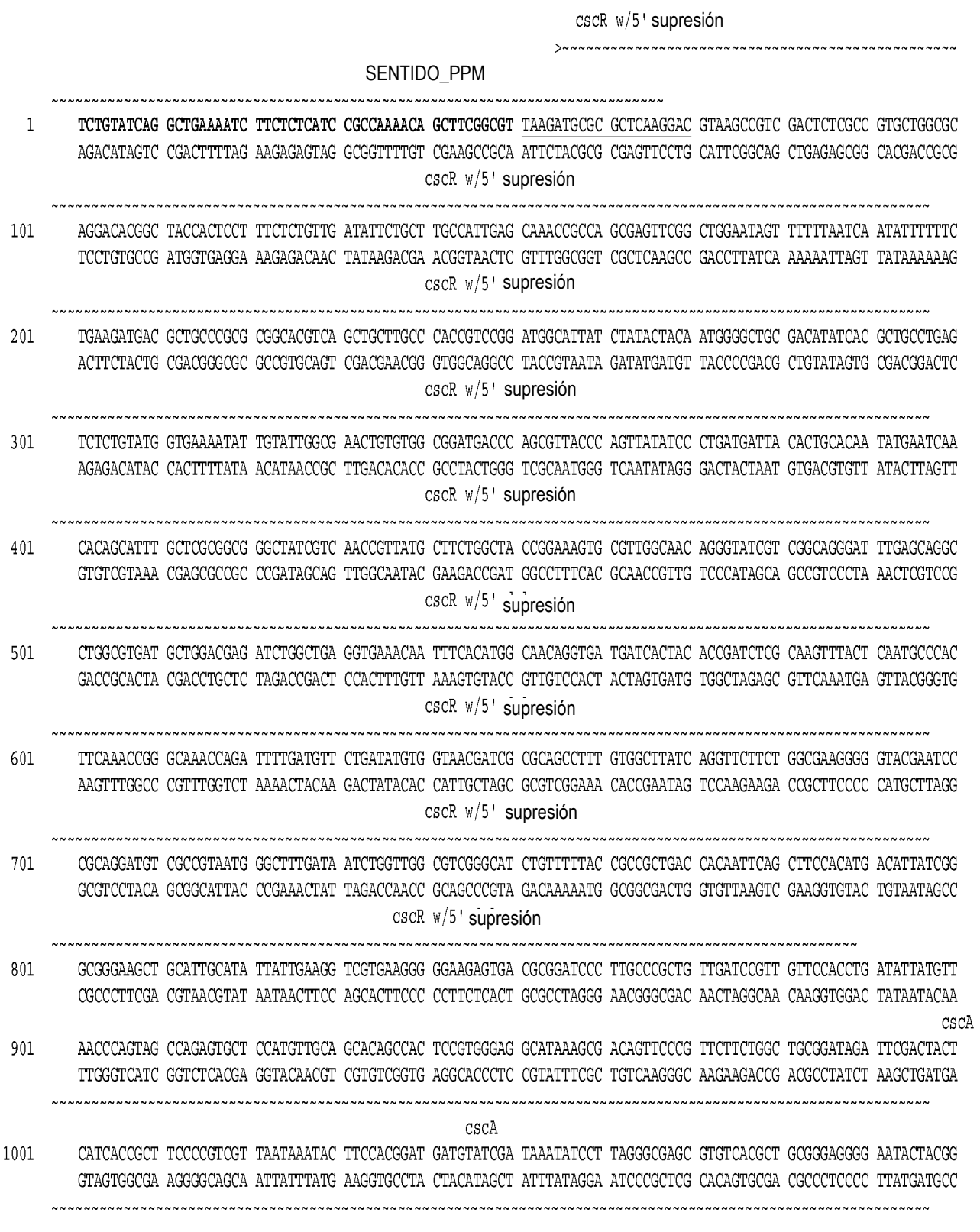


FIG. 55

```
4601    TTCGCTTGGG ATTGTGCTGC TTTCAACGCC GACTGGGATA CTCTTTGACC ACGCAGGCTA CCAGACAGTT TTCTTCGCAA TTTCGGGTAT TGTCTGCCTG
        AAGCGAACCC TAACACGACG AAAGTTGCGG CTGACCCTAT GAGAAACTGG TGCGTCCGAT GGTCTGTCAA AAGAAGCGTT AAAGCCCATA ACAGACGGAC
                                          cscB
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4701    ATGTTGCTAT TTGGCATTTT CTTCTTGAGT AAAAAACGCG AGCAAATAGT TATGGAAACG CCTGTACCTT CAGCAATATA GACGTAAACT TTTTCCGGTT
        TACAACGATA AACCGTAAAA GAAGAACTCA TTTTTTGCGC TCGTTTATCA ATACCTTTGC GGACATGGAA GTCGTTATAT CTGCATTTGA AAAAGGCCAA
4801    GTTGTCGATA GCTCTATATC CCTCAACCGG AAAATAATAA TAGTAAAATG CTTAGCCCTG CTAATAATCG CCTAATCCAA ACGCCTCATT CATGTTCTGG
        CAACAGCTAT CGAGATATAG GGAGTTGGCC TTTTATTATT ATCATTTTAC GAATCGGGAC GATTATTAGC GGATTAGGTT TGCGGAGTAA GTACAAGACC
4901    TACAGTCGCT CAAATGTACT TCAGATGCGC GGTTCGCTGA TTTCCAGGAC ATTGTCGTCA TTCAGTGACC TGTCCCGTGT ATCACGGTCC TGCGAATTCA
        ATGTCAGCGA GTTTACATGA AGTCTACGCG CCAAGCGACT AAAGGTCCTG TAACAGCAGT AAGTCACTGG ACAGGGCACA TAGTGCCAGG ACGCTTAAGT
5001    TCAAGGAATG CATTGCGGAG TGAAGTATCG AGTCACGCCA TATTTCGTCA CCCGAAGATG AGTTTTGAGA TATTAAGGCA GGTGACTTTC ACTCACA
        AGTTCCTTAC GTAACGCCTC ACTTCATAGC TCAGTGCGGT ATAAAGCAGT GGGCTTCTAC TCAAAACTCT ATAATTCCGT CCACTGAAAG TGAGTGT
                                  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                                                                  CONTRASENTIDO_PRM
```

FIG. 55 (continuación)

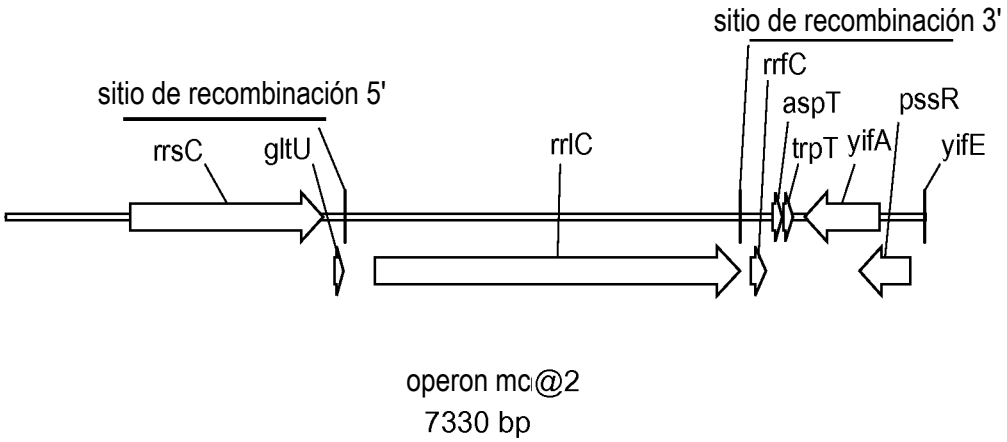

sitio de recombinación 3'
sitio de recombinación 5'
rrfC
aspT
pssR
rrsC
gltU
rrlC
trpT
yifA
yifE
operon mc@2
7330 bp

FIG. 56

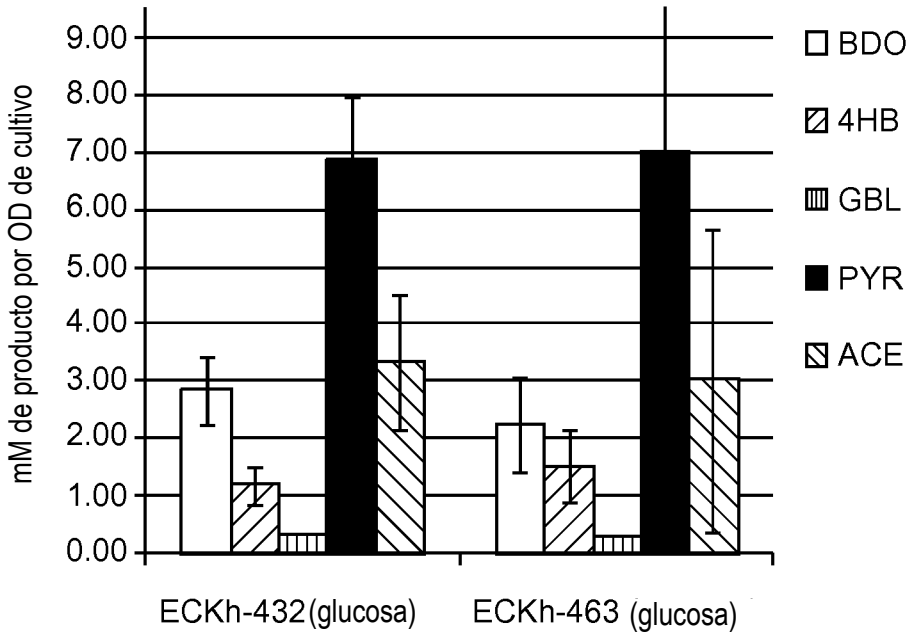

9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
mM de producto por OD de cultivo
BDO
4HB
GBL
PYR
ACE
ECKh-432(glucosa)
ECKh-463 (glucosa)

FIG. 57

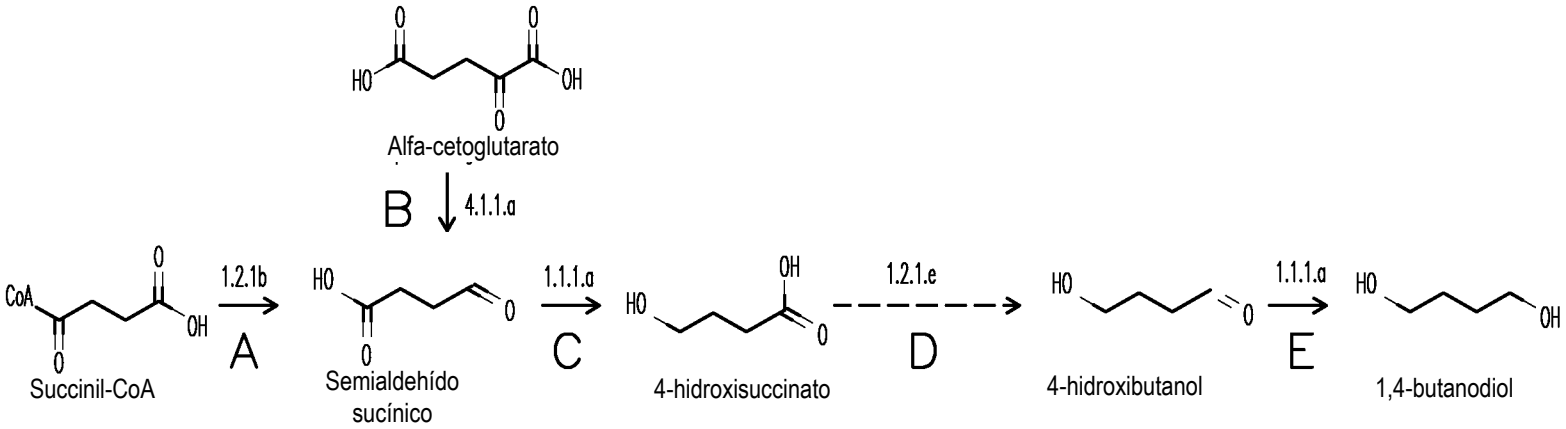

Alfa-cetoglutarato
B
4.1.1.a
CoA
OH
1.2.1b
A
Succinil-CoA
HO
Semialdehído
sucínico
1.1.1.a
C
OH
4-hidroxisuccinato
1.2.1.e
D
4-hidroxibutanol
1.1.1.a
E
1,4-butanodiol

FIG. 58

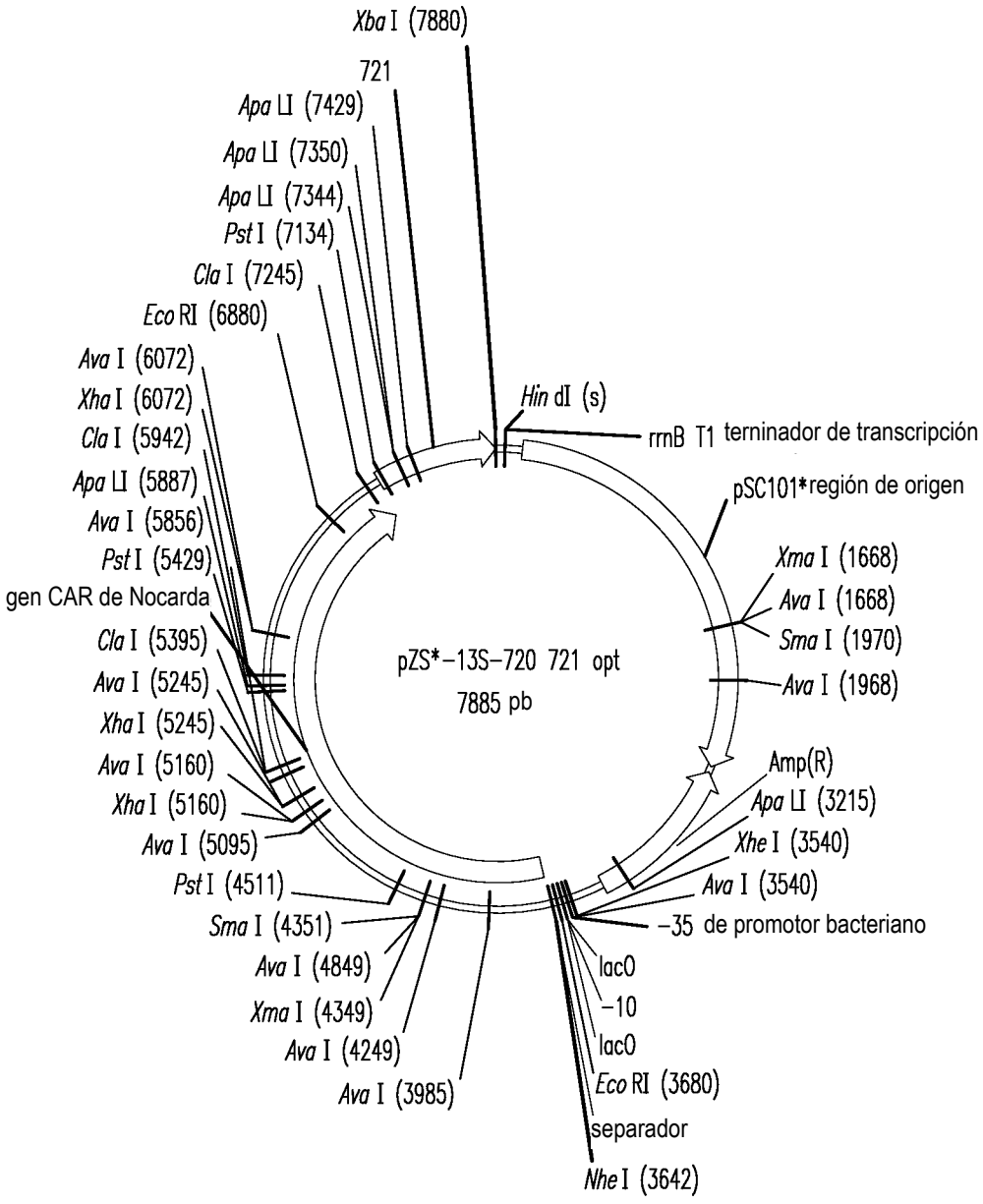

Xba I (7880)
721
Apa LI (7429)
Apa LI (7350)
Apa LI (7344)
Pst I (7134)
Cla I (7245)
Eco RI (6880)
Ava I (6072)
Xha I (6072)
Cla I (5942)
Apa LI (5887)
Ava I (5856)
Pst I (5429)
gen CAR de Nocarda
Cla I (5395)
Ava I (5245)
Xha I (5245)
Ava I (5160)
Xha I (5160)
Ava I (5095)
Pst I (4511)
Sma I (4351)
Ava I (4849)
Xma I (4349)
Ava I (4249)
Ava I (3985)
Hin dI (s)
rrnB T1 terninador de transcripción
pSC101*región de origen
Xma I (1668)
Ava I (1668)
Sma I (1970)
Ava I (1968)
pZS*-13S-720 721 opt
7885 pb
Amp(R)
Apa LI (3215)
Xhe I (3540)
Ava I (3540)
-35 de promotor bacteriano
lacO
-10
lacO
Eco RI (3680)
separador
Nhe I (3642)

FIG. 61

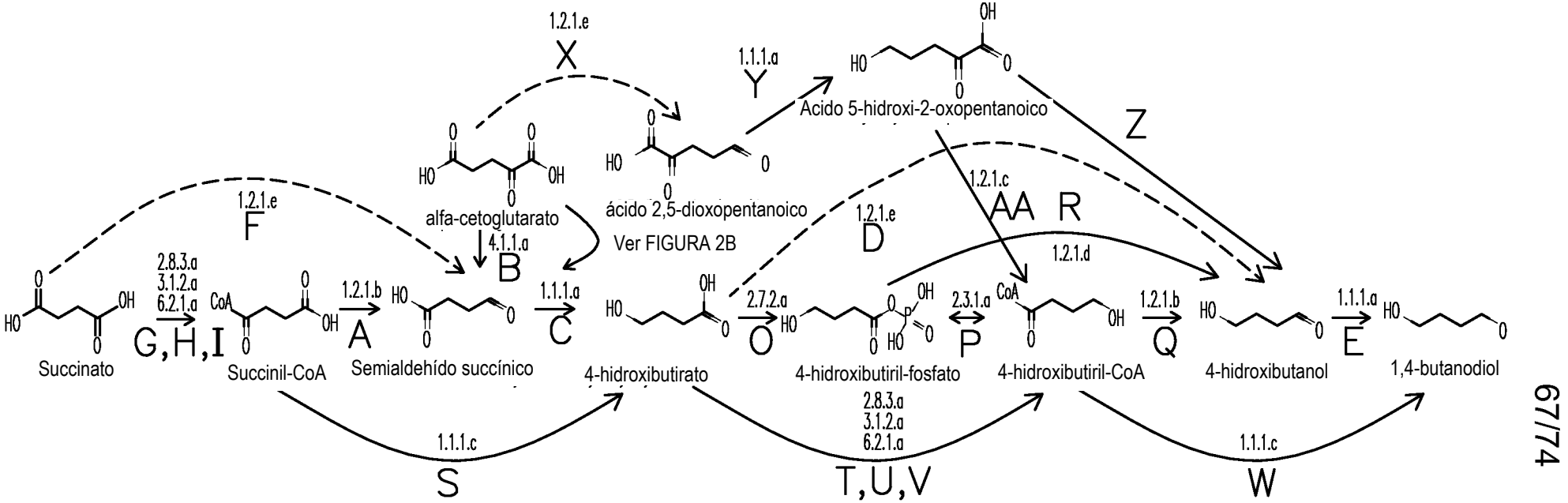


FIG. 62A

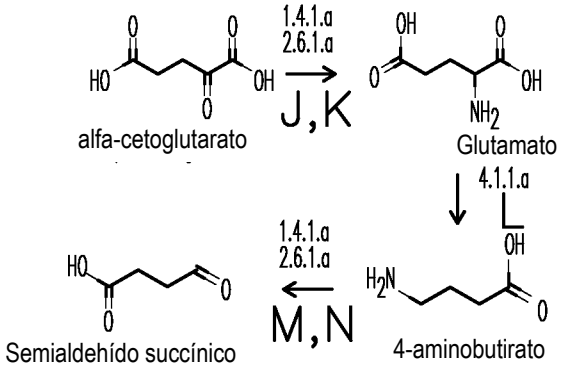


FIG. 62B

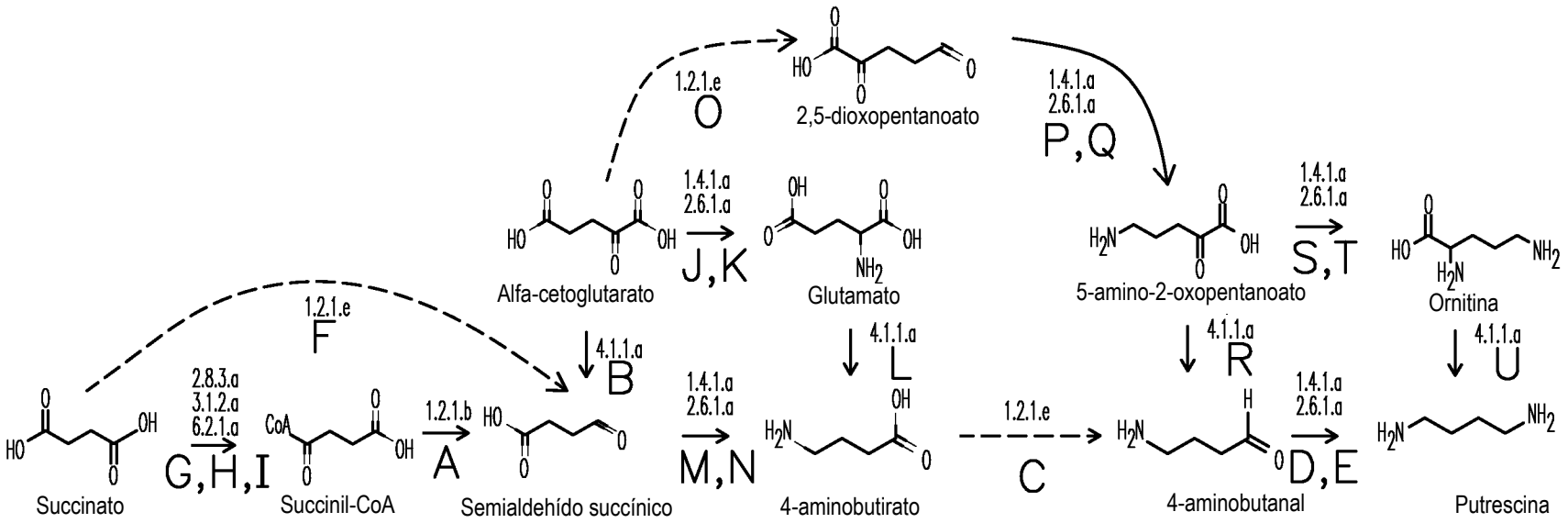

1.2.1.e
O
2,5-dioxopentanoato
1.4.1.a
2.6.1.a
P,Q
1.4.1.a
2.6.1.a
J,K
Alfa-cetoglutarato
Glutamato
5-amino-2-oxopentanoato
1.4.1.a
2.6.1.a
S,T
Ornitina
1.2.1.e
F
4.1.1.a
B
4.1.1.a
L
4.1.1.a
R
4.1.1.a
U
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
G,H,I
1.2.1.b
A
1.4.1.a
2.6.1.a
M,N
1.2.1.e
C
1.4.1.a
2.6.1.a
D,E
Succinato
Succinil-CoA
Semialdehído succínico
4-aminobutirato
4-aminobutanal
Putrescina

FIG. 63