

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 790**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 13/04 (2006.01)

C12P 7/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2009 PCT/US2009/038663**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2009 WO09151728**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2009 E 09763021 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2265709**

54 Título: **Microorganismos para la producción de ácido adípico y otros compuestos**

30 Prioridad:

27.03.2008 US 40059 P

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

28.02.2018

73 Titular/es:

**GENOMATICA, INC. (100.0%)
4757 Nexus Center Drive
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**BURGARD, ANTHONY, P.;
PHARKYA, PRITI y
OSTERHOUT, ROBIN, E.**

74 Agente/Representante:

CAMPello ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 656 790 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Microorganismos para la producción de ácido adípico y otros compuestos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a procesos biosintéticos, y más específicamente a organismos que tienen capacidad biosintética de ácido 6-aminocaproico y caprolactama.

- 10 El ácido adípico, un ácido dicarboxílico, con un peso molecular de 146,14, es un compuesto de importancia comercial. Su uso principal es producir nylon 6,6, una poliamida lineal hecha condensando ácido adípico con hexametildiamina que se emplea principalmente para fabricar diferentes tipos de fibras. Otros usos del ácido adípico incluyen su uso en plastificantes, poliésteres insaturados y polioles de poliéster. Los usos adicionales incluyen la producción de poliuretano, componentes lubricantes y como ingrediente alimenticio como un agente
- 15 aromatizante y gelificante.

- Históricamente, el ácido adípico se preparó a partir de diversas grasas usando oxidación. Los procesos comerciales actuales para la síntesis de ácido adípico se basan en la oxidación del aceite de KA, una mezcla de ciclohexanona, la cetona o componente K, y ciclohexanol, el alcohol o componente A, o de ciclohexanol puro usando un exceso de
- 20 ácido nítrico fuerte. Existen varias variaciones de este tema que difieren en las rutas de producción de KA o ciclohexanol. Por ejemplo, el fenol es una materia prima alternativa en la producción de aceite de KA, y se ha descrito el proceso para la síntesis de ácido adípico a partir de fenol. Las otras versiones de este proceso tienden a usar agentes oxidantes distintos del ácido nítrico, tal como peróxido de hidrógeno, aire u oxígeno.

- 25 La caprolactama es un compuesto orgánico que es una lactama del ácido 6-aminohexanoico (ácido ϵ -aminohexanoico, ácido aminocaproico). Como alternativa, puede considerarse una amida cíclica de ácido caproico. El uso industrial principal de la caprolactama es como un monómero en la producción de nylon-6. La mayor parte de la caprolactama se sintetiza a partir de ciclohexanona a través de un proceso de oximación usando sulfato de hidroxilamonio seguido de transposición catalítica usando la etapa del proceso de transposición de Beckmann.

- 30 Por lo tanto, existe la necesidad de métodos alternativos para producir de forma eficaz cantidades comerciales de compuestos tales como ácido adípico y caprolactama. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

- 35 El documento WO2005/068643 divulga la síntesis bioquímica del ácido 6-aminocaproico a partir del compuesto ácido 6-aminohex-2-enoico o del ácido 6-amino-2-hidroxihexanoico por tratamiento con una enzima que tiene actividad α,β -enoato reductasa hacia moléculas que contienen un grupo α,β -enoato y un grupo amino primario.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 40 La invención proporciona un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de ácido 6-aminocaproico. El organismo microbiano contiene al menos dos ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima en la ruta del ácido 6-aminocaproico y al menos una ruta para producir adipil-CoA. La invención proporciona adicionalmente un método para producir ácido 6-aminocaproico o caprolactama. El método puede incluir cultivar un
- 45 ácido 6-aminocaproico o caprolactama que produce un organismo microbiano, donde el organismo microbiano expresa al menos dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una enzima de la ruta del ácido 6-aminocaproico en una cantidad suficiente para producir el producto respectivo, en condiciones y durante un período de tiempo suficiente para producir ácido 6-aminocaproico o caprolactama.

50 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

- La figura 1 muestra una ruta ejemplar para la degradación de adipato en el peroxisoma de *Penicillium chrysogenum*.
- 55 La figura 2 muestra una ruta ejemplar para la formación de adipato a través de una ruta de degradación inversa. Se proporcionan varias opciones para la conversión final de adipil-CoA en adipato.
- La figura 3 muestra una ruta ejemplar para la formación de adipato a través de la ruta de 3-oxoadipato. La figura 4 muestra las químicas enzimáticas similares de las tres últimas etapas de la ruta de 3-oxoadipato para la síntesis de adipato y el ciclo de TCA reductivo.
- La figura 5 muestra una ruta ejemplar para la síntesis de ácido adípico a partir de glucosa a través de ácido

cis,cis-mucónico. Intermedios biosintéticos (abreviaturas): 4-fosfato de D-eritrosa (E4P), ácido fosfoenolpirúvico (PEP), 7-fosfato del ácido 3-desoxi-D-arabinoheptulosónico (DAHP), ácido 3-deshidroquinico (DHQ), ácido 3-deshidrosihikímico (DHS), ácido protocatecuico (PCA). Enzimas (genes codificantes) o condiciones de reacción: (a) DAHP sintasa (*aroFFBR*), (b) 3-deshidroquinato sintasa (*aroB*), (c) 3-deshidroquinato deshidratasa (*aroD*), (d) DHS deshidratasa (*aroZ*), (e) protocatecuato descarboxilasa (*aroY*), (f) catecol 1,2-dioxigenasa (*catA*), (g) Pt al 10 %/C, H₂, 3400 kPa, 25 °C. Figura tomada de Niu et al., *Biotechnol. Prog.* 18:201-211 (2002)).

La figura 6 muestra una ruta ejemplar para la síntesis de adipato a través de alfa-cetoadipato utilizando alfa-cetoglutarato como punto de partida.

La figura 7 muestra una ruta ejemplar para la síntesis de adipato usando lisina como punto de partida.

La figura 8 muestra una ruta de síntesis de caprolactama ejemplar usando adipil-CoA como punto de partida.

La figura 9 muestra rutas de síntesis de adipato ejemplares usando alfa-cetoadipato como punto de partida.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se dirige al diseño y producción de células y organismos que tienen capacidades de producción biosintética para ácido 6-aminocaproico o caprolactama. Los resultados descritos en el presente documento indican que las rutas metabólicas pueden diseñarse y modificarse por ingeniería genética de forma recombinante para lograr la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico o caprolactama en *Escherichia coli* y otras células u organismos. La producción biosintética de ácido 6-aminocaproico y caprolactama se puede confirmar mediante la construcción de cepas que tienen el genotipo metabólico diseñado. Estas células u organismos diseñados metabólicamente también pueden someterse a una evolución adaptativa para aumentar adicionalmente la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico o caprolactama, incluyendo en condiciones que se aproximan al crecimiento máximo teórico.

Como se describe en el presente documento, se describen varias rutas metabólicas para la producción de adipato, 6-aminocaproato y caprolactama. Se descubrió que dos rutas, la ruta de degradación de adipato inversa y la ruta 3-oxoadipato, eran beneficiosas con respecto a (i) los rendimientos de adipato (rendimiento molar del 92% en glucosa), (ii) la falta de oxígeno requerido para la síntesis de adipato, (iii) las energías asociadas, y (iv) la capacidad teórica de producir adipato como el único producto de fermentación. Las rutas metabólicas para la producción de adipato que pasan a través de α -cetoadipato o lisina también se describen, pero son de menor rendimiento y requieren aireación para obtener la máxima producción. También se divulga en el presente documento una ruta para producir uno o ambos de 6-aminocaproato y caprolactama a partir de adipil-CoA, un precursor en la ruta de degradación inversa.

Como se divulga en el presente documento, se describen varias rutas ejemplares para la biosíntesis de adipato. Una ruta ejemplar implica la síntesis de adipato a través de una ruta que se basa en la reversibilidad de la degradación del adipato como se describe en organismos tales como *P. chrysogenum* (véanse los Ejemplos I y II). Una segunda ruta ejemplar implica la formación de 3-oxoadipato seguido de su reducción, deshidratación y de nuevo reducción para formar adipato (véanse los Ejemplos III y IV). El rendimiento de adipato utilizando cualquiera de estas dos rutas es de 0,92 moles por mol de glucosa consumida. La captación de oxígeno no es necesaria para alcanzar estos rendimientos máximos teóricos, y las energías en condiciones anaerobias son favorables para el crecimiento y la secreción del producto. Se describió previamente un método para producir adipato a partir de ácido cis,cis-mucónico derivado de glucosa (Frost et al., Patente de Estados Unidos N.º 5.487.987, expedida el 30 de enero de 1996) (véase el Ejemplo V). Se analizan las ventajas de los métodos divulgados en el presente documento sobre este método descrito previamente. Las rutas metabólicas para la producción de adipato que pasan a través de precursores de α -cetoadipato (Ejemplo VI) o lisina (Ejemplo VII) son de menor rendimiento y requieren aireación para obtener la producción máxima. Se describe una ruta para producir uno o ambos de 6-aminocaproato y caprolactama a partir de adipil-CoA, un precursor en la ruta de degradación inversa (véanse los ejemplos VIII y IX). Se describen rutas adicionales para producir adipato en los Ejemplos X y XI. Se describen genes ejemplares y enzimas requeridas para construir microbios con estas capacidades, así como métodos para la clonación y la transformación, el control de la formación de productos, y el uso de microorganismos diseñados para la producción.

Como se divulga en el presente documento, se describen seis rutas diferentes para la síntesis de ácido adipico usando glucosa/sacarosa como sustrato de carbono. Para todos los cálculos de rendimiento máximo, las reacciones faltantes en una ruta dada se añadieron a la red estequiométrica de *E. coli* en SimPheny que es similar a la descrita previamente (Reed et al., *Genome Biol.* 4:R54 (2003)). El adipato es una molécula cargada en condiciones fisiológicas y se supuso que requería energía en forma de un sistema de simporte a base de protones para

secretarse fuera de la red. Tal sistema de transporte es termodinámicamente factible si las fermentaciones se realizan a un pH neutro o casi neutro. La formación de ácido adípico de bajo pH requerirá un mecanismo de exportación dependiente de ATP, por ejemplo, el sistema ABC en oposición al simporte de protones. Las reacciones en las rutas y los métodos de implementación de estas rutas se describen en los Ejemplos I-XI.

5

Como se usa en el presente documento, la expresión "de origen sintético" cuando se usa en referencia a un organismo microbiano o microorganismo de la invención pretende significar que el organismo microbiano tiene al menos una alteración genética que normalmente no se encuentra en una cepa de origen natural de la especie de referencia, incluyendo cepas de tipo salvaje de las especies de referencia. Las alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, modificaciones que introducen ácidos nucleicos expresables que codifican polipéptidos metabólicos, otras adiciones de ácidos nucleicos, deleciones de ácidos nucleicos y/u otras alteraciones funcionales del material genético microbiano. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, regiones codificantes y fragmentos funcionales de las mismas, para polipéptidos heterólogos, homólogos o tanto heterólogos como homólogos para las especies a las que se hace referencia. Las modificaciones adicionales incluyen, por ejemplo, regiones reguladoras no codificantes en las que las modificaciones alteran la expresión de un gen u operón. Los polipéptidos metabólicos ejemplares incluyen enzimas dentro de una ruta biosintética de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama.

Una modificación metabólica se refiere a una reacción bioquímica que se altera a partir de su estado natural. Por lo tanto, los microorganismos de origen sintético pueden tener modificaciones genéticas en ácidos nucleicos que codifican polipéptidos metabólicos o fragmentos funcionales de los mismos. Se divulgan ejemplos de modificaciones metabólicas en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "aislado" cuando se usa en referencia a un organismo microbiano pretende hacer referencia a un organismo que está sustancialmente libre de al menos un componente ya que el organismo microbiano de referencia se encuentra en la naturaleza. El término incluye un organismo microbiano que se elimina de algunos o de todos los componentes, ya que se encuentra en su entorno natural. El término también incluye un organismo microbiano que se elimina de algunos o de todos los componentes, ya que el organismo microbiano se encuentra en entornos de origen sintético. Por lo tanto, un organismo microbiano aislado está parcial o completamente separado de otras sustancias ya que se encuentra en la naturaleza o ya que se cultiva, almacena o subsiste en entornos de origen sintético. Los ejemplos específicos de organismos microbianos aislados incluyen microbios parcialmente puros, microbios sustancialmente puros y microbios cultivados en un medio que no se produce naturalmente.

Como se usa en el presente documento, los términos "microbiano", "organismo microbiano" o "microorganismo" pretenden significar cualquier organismo que existe como una célula microscópica que está incluida dentro de los dominios de arqueas, bacterias o eucariotas. Por lo tanto, el término pretende incluir células u organismos procariontes o eucariotas que tienen un tamaño microscópico e incluyen bacterias, arqueas y eubacterias de todas las especies, así como microorganismos eucariotas tales como levaduras y hongos. El término también incluye cultivos celulares de cualquier especie que pueda cultivarse para la producción de un compuesto bioquímico.

40

Como se usa en el presente documento, el término "CoA" o "coenzima A" pretende hacer referencia a un cofactor orgánico o grupo protésico (porción no proteica de una enzima) cuya presencia se requiere para la actividad de muchas enzimas (la apoenzima) para formar un sistema enzimático activo. La coenzima A funciona en ciertas enzimas de condensación, actúa en la transferencia de acetilo u otro grupo acilo y en la síntesis y oxidación de ácidos grasos, la oxidación de piruvato y en otras acetilaciones.

45

Como se usa en el presente documento, "adipato", que tiene la fórmula química $\text{-OOC-(CH}_2\text{)}_4\text{-COO-}$ (véase la figura 2) (nombre IUPAC hexanodioato), es la forma ionizada de ácido adípico (nombre IUPAC ácido hexanodioico), y se entiende que el adipato y el ácido adípico se pueden utilizar indistintamente para referirse al compuesto en cualquiera de sus formas neutra o ionizada, incluyendo cualquier forma de sal de los mismos. Los expertos entenderán que la forma específica dependerá del pH.

50

Como se usa en el presente documento, "6-aminocaproato", que tiene la fórmula química $\text{-OOC-(CH}_2\text{)}_5\text{-NH}_2$ (véase la figura 8), es la forma ionizada del ácido 6-aminocaproico (nombre de IUPAC 6-ácido aminohexanoico), y se entiende que el 6-aminocaproato y el ácido 6-aminocaproico se pueden utilizar indistintamente para referirse al compuesto en cualquiera de sus formas neutra o ionizada, incluyendo cualquier forma de sal de los mismos. Los expertos entenderán que la forma específica dependerá del pH.

55

Como se usa en el presente documento, "caprolactama" (nombre de IUPAC azepan-2-ona) es una lactama de ácido

6-aminohexanoico (véase la figura 8).

Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente anaerobio" cuando se usa en referencia a un cultivo o condición de crecimiento pretende hacer referencia a que la cantidad de oxígeno es menor de aproximadamente el 10 % de saturación para oxígeno disuelto en medios líquidos. El término también pretende incluir cámaras selladas de medio líquido o sólido mantenidas con una atmósfera de menos de aproximadamente el 1% de oxígeno.

"Exógeno", como se usa en el presente documento, pretende significar que la molécula de referencia o la actividad de referencia se introduce en el organismo microbiano huésped. La molécula se puede introducir, por ejemplo, mediante la introducción de un ácido nucleico codificante en el material genético huésped, tal como por integración en un cromosoma huésped, o como material genético no cromosómico, tal como un plásmido. Por lo tanto, el término, como se usa en referencia a la expresión de un ácido nucleico codificante, se refiere a la introducción del ácido nucleico codificante en una forma expresable en el organismo microbiano. Cuando se usa en referencia a una actividad biosintética, el término se refiere a una actividad que se introduce en el organismo de referencia huésped. La fuente puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico codificante homólogo o heterólogo que expresa la actividad de referencia después de la introducción en el organismo microbiano huésped. Por lo tanto, el término "endógeno" se refiere a una molécula o actividad de referencia que está presente en el huésped. De forma similar, el término, cuando se usa en referencia a la expresión de un ácido nucleico codificante, se refiere a la expresión de un ácido nucleico codificante contenido dentro del organismo microbiano. El término "heterólogo" se refiere a una molécula o actividad derivada de una fuente distinta de la especie de referencia, mientras que "homólogo" se refiere a una molécula o actividad derivada del organismo microbiano huésped. Por consiguiente, la expresión exógena de un ácido nucleico codificante de la invención puede utilizar uno o ambos ácidos nucleicos codificantes heterólogos u homólogos.

Los organismos microbianos de origen sintético de la invención pueden contener alteraciones genéticas estables, lo que se refiere a microorganismos que pueden cultivarse durante más de cinco generaciones sin pérdida de la alteración. Generalmente, las alteraciones genéticas estables incluyen modificaciones que persisten durante más de 10 generaciones, particularmente las modificaciones estables persistirán durante más de aproximadamente 25 generaciones, y más particularmente, las modificaciones genéticas estables serán mayores de 50 generaciones, incluso de manera indefinida.

Los expertos en la técnica comprenderán que las alteraciones genéticas, incluyendo las modificaciones metabólicas ilustradas en el presente documento, se describen con referencia a un organismo huésped adecuado tal como *E. coli* y sus correspondientes reacciones metabólicas o un organismo de origen adecuado para el material genético deseado tal como genes para una ruta metabólica deseada. Sin embargo, dada la secuenciación completa del genoma de una amplia diversidad de organismos y el alto nivel de habilidad en el área de la genómica, los expertos en la técnica podrán aplicar fácilmente las enseñanzas y la orientación proporcionadas en el presente documento a esencialmente todos los demás organismos. Por ejemplo, las alteraciones metabólicas de *E. coli* ilustradas en el presente documento se pueden aplicar fácilmente a otras especies incorporando el mismo ácido nucleico codificante o análogo de especies distintas de las especies de referencia. Dichas alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, alteraciones genéticas de especies homólogas, en general, y en particular, ortólogos, parálogos o desplazamientos génicos no ortólogos.

Un ortólogo es un gen o genes que están relacionados por descendencia vertical y son responsables de funciones sustancialmente iguales o idénticas en diferentes organismos. Por ejemplo, la epóxido hidrolasa de ratón y la epóxido hidrolasa humana pueden considerarse ortólogos para la función biológica de la hidrólisis de epóxidos. Los genes están relacionados por descendencia vertical cuando, por ejemplo, comparten similitud de secuencia de cantidad suficiente para indicar que son homólogos, o están relacionados por evolución a partir de un ancestro común. Los genes también se pueden considerar ortólogos si comparten estructura tridimensional pero no necesariamente similitud de secuencia, de una cantidad suficiente para indicar que han evolucionado a partir de un ancestro común en la medida en que la similitud de secuencia primaria no sea identificable. Los genes que son ortólogos pueden codificar proteínas con similitud de secuencia de aproximadamente el 25% al 100% de identidad de secuencia de aminoácidos. También se puede considerar que los genes que codifican proteínas que comparten una similitud de aminoácidos inferior al 25% han surgido por descendencia vertical si su estructura tridimensional también muestra similitudes. Se considera que los miembros de la familia de enzimas de la serina proteasa, incluyendo el activador del plasminógeno tisular y la elastasa, han surgido por descendencia vertical de un ancestro común.

- Los ortólogos incluyen genes o sus productos genéticos codificados que, por ejemplo, a través de la evolución, han divergido en su estructura o actividad general. Por ejemplo, cuando una especie codifica un producto génico que presenta dos funciones y cuando tales funciones se han separado en genes distintos en una segunda especie, los tres genes y sus productos correspondientes se consideran ortólogos. Para la producción de un producto bioquímico, los expertos en la técnica comprenderán que el gen ortólogo que alberga la actividad metabólica que debe introducirse o alterarse debe elegirse para la construcción del microorganismo de origen sintético. Un ejemplo de ortólogos que muestran actividades separables es cuando las distintas actividades se han separado en productos genéticos distintos entre dos o más especies o dentro de una sola especie. Un ejemplo específico es la separación de la proteólisis de elastasa y la proteólisis 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 la exonucleasa 5'-3' de *Mycoplasma* y la actividad de ADN polimerasa III de *Drosophila*. La ADN polimerasa de la primera especie se puede considerar un ortólogo para cualquiera o ambas de la exonucleasa o la polimerasa de la segunda especie y viceversa.
- 15 Por el contrario, los parálogos son homólogos relacionados, por ejemplo, por duplicación seguida de divergencia evolutiva, y tienen funciones similares o comunes, pero no idénticas. Los parálogos pueden originarse o derivarse, por ejemplo, de la misma especie o de una especie diferente. Por ejemplo, la epóxido hidrolasa microsomal (epóxido hidrolasa I) y la epóxido hidrolasa soluble (epóxido hidrolasa II) pueden considerarse parálogos porque representan dos enzimas distintas, evolucionadas conjuntamente a partir de un ancestro común, que catalizan reacciones distintas y tienen distintas funciones en la misma especie. Los parálogos son proteínas de la misma especie con una similitud de secuencia significativa entre sí, lo que sugiere que son homólogas, o se relacionan a través de la coevolución de un ancestro común. Los grupos de familias de proteínas parálogas incluyen homólogos de HipA, genes de luciferasa, peptidasas y otros.
- 25 Un desplazamiento génico no ortólogo es un gen no ortólogo de una especie que puede sustituir a una función génica de referencia en una especie diferente. La sustitución incluye, por ejemplo, poder realizar sustancialmente la misma función o una función similar en la especie de origen en comparación con la función de referencia en las diferentes especies. Aunque generalmente, un desplazamiento génico no ortólogo será identificable como estructuralmente relacionado con un gen conocido que codifica la función de referencia, genes menos relacionados estructuralmente pero funcionalmente similares, y sus correspondientes productos génicos, seguirán estando dentro del significado del término tal como se usa en el presente 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.
- 35 Por lo tanto, para identificar y construir los organismos microbianos de origen sintético de la invención que tienen capacidad biosintética de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama, los expertos en la técnica entenderán aplicando las enseñanzas y la orientación proporcionadas en el presente documento a una especie particular que la identificación de modificaciones metabólicas puede incluir la identificación e inclusión o inactivación de ortólogos. En la medida en que los parálogos y/o desplazamientos génicos no ortólogos 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 relacionados evolutivamente.
- 45 Los ortólogos, parálogos y desplazamientos génicos no ortólogos se pueden determinar por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la inspección de secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos para dos polipéptidos revelará la identidad de secuencia y las similitudes entre las secuencias comparadas. En base a tales similitudes, un experto en la técnica puede determinar si la similitud es suficientemente alta para indicar que las proteínas están relacionadas a través de la evolución a partir de un ancestro común. Los algoritmos ya conocidos por los expertos en la técnica, tales como Align, BLAST, Clustal W y otros, comparan y determinan una similitud o identidad de secuencia en bruto, y también determinan la presencia o el significado de los huecos en la secuencia a los que se les puede asignar un peso o puntuación. Dichos algoritmos también se conocen en la técnica y son igualmente aplicables para determinar la similitud o identidad de la secuencia de nucleótidos. Los parámetros para una similitud suficiente para determinar la relación se calculan en base a métodos bien conocidos para calcular la similitud estadística, o la posibilidad de encontrar una coincidencia similar en un polipéptido aleatorio, y la importancia de la coincidencia determinada. Una comparación informática de dos o más secuencias, si se desea, también puede optimizarse visualmente por los expertos en la técnica. Se puede esperar que los productos génicos relacionados o proteínas tengan una alta similitud, por ejemplo, una identidad de secuencia del 25% al 100%. Las proteínas que no están relacionadas pueden tener una identidad que es esencialmente la misma que se espera que ocurra por casualidad, si se escanea una base de datos de tamaño suficiente (aproximadamente 5%). Las

secuencias entre el 5% y el 24% pueden o no representar suficiente homología para concluir que las secuencias comparadas están relacionadas. Se puede realizar un análisis estadístico adicional para determinar la importancia de tales coincidencias dado el tamaño del conjunto de datos para determinar la relevancia de estas secuencias.

- 5 Los parámetros ejemplares para determinar la relación de dos o más secuencias usando el algoritmo BLAST, por ejemplo, pueden ser como se expone a continuación. Brevemente, las alineaciones de secuencias de aminoácidos se pueden realizar usando BLASTP versión 2.0.8 (5 de enero de 1999) y los siguientes parámetros: Matriz: 0 BLOSUM62; hueco abierto: 11; extensión de hueco: 1; x_dropoff: 50; esperado: 10,0; tamaño de palabra: 3; filtro: activado. Las alineaciones de secuencia de ácido nucleico se pueden realizar usando BLASTN versión 2.0.6 (16 de
- 10 septiembre de 1998) y los siguientes parámetros: Correspondencia: 1; discordancia: -2; hueco abierto: 5; extensión de hueco: 2; x_dropoff: 50; esperado: 10,0; tamaño de palabra: 11; filtro: desactivado. Los expertos en la técnica sabrán qué modificaciones se pueden hacer a los parámetros anteriores para aumentar o disminuir la rigurosidad de la comparación, por ejemplo, y determinar la relación de dos o más secuencias.
- 15 La invención proporciona organismos microbianos de origen sintético capaces de producir ácido 6-aminocaproico o caprolactama. También se divulga, por ejemplo, una ruta de adipato que puede ser una ruta de degradación de adipato inversa (véanse los Ejemplos I y II). En un ejemplo, se divulga un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de adipato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la
- 20 succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa, y adipil-CoA sintetasa o fosfotransadipilasa/adipato cinasa o adipil-CoA:acetil-CoA transferasa o adipil-CoA hidrolasa. Además, una ruta de adipato puede ser a través de una ruta de 3-oxoadipato (véanse los Ejemplos III y IV). Otra divulgación proporciona un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de adipato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la
- 25 ruta de adipato expresada en una cantidad suficiente para producir adipato, comprendiendo la ruta de adipato succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-oxoadipil-CoA transferasa, 3-oxoadipato reductasa, 3-hidroxiadipato deshidratasa, y 2-enoato reductasa.

En una realización, la invención proporciona un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de ácido

30 6-aminocaproico que comprende al menos dos ácidos nucleicos exógenos codificando cada uno una enzima de la ruta del ácido 6-aminocaproico expresada en una cantidad suficiente para producir 6-aminocaproico ácido, comprendiendo la ruta del ácido 6-aminocaproico aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA y transaminasa (véanse los Ejemplos VIII y IX). Como alternativa, la 6-aminocaproato deshidrogenasa puede usarse para convertir adipato semialdehído para formar 6-aminocaproato (véase la figura 8). En una realización adicional, la invención

35 proporciona un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de caprolactama que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta de caprolactama expresada en una cantidad suficiente para producir caprolactama, comprendiendo la ruta de caprolactama aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA, transaminasa o 6-aminocaproato deshidrogenasa, y amidohidrolasa (véanse los Ejemplos VIII y IX).

40 Como se divulga en el presente documento, un organismo microbiano que produce ácido 6-aminocaproico o caprolactama de la invención puede producir ácido 6-aminocaproico y/o caprolactama a partir de un precursor de adipil-CoA (véase la figura 8 y los Ejemplos VIII y IX). Por lo tanto, se entiende que un organismo microbiano que produce ácido 6-aminocaproico o caprolactama puede incluir además una ruta para producir adipil-CoA. Por

45 ejemplo, una ruta de adipil-CoA puede incluir las enzimas de la figura 2 que utilizan succinil-CoA y acetil-CoA como precursores a través de la producción de adipil-CoA, es decir, que carecen de una enzima para la etapa final de convertir adipil-CoA en adipato. Por lo tanto, una ruta de adipil-CoA ejemplar puede incluir succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa y 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa.

50 Además, como se muestra en la figura 1, una ruta de degradación de adipato incluye la etapa de convertir adipato en adipil-CoA mediante una adipato CoA ligasa. Por lo tanto, una ruta de adipil-CoA puede ser una ruta de adipato que incluye además una actividad enzimática que convierte adipato en adipil-CoA, incluyendo, por ejemplo, la actividad de adipato-CoA ligasa como en la primera etapa de la figura 1 o cualquiera de las enzimas en la etapa final

55 de la figura 2 realizada en la dirección inversa, por ejemplo, cualquiera de adipil-CoA sintetasa (también denominada adipato Co-A ligasa), fosfotransadipilasa/adipato cinasa, adipil-CoA; acetil-CoA transferasa o adipil-CoA hidrolasa. Una enzima que tiene actividad adipato:adipil-CoA puede ser una actividad endógena o puede proporcionarse como un ácido nucleico exógeno que codifica la enzima, como se divulga en el presente documento. Por lo tanto, se entiende que cualquier ruta de adipato puede utilizarse con una actividad enzimática adipato:adipil-CoA para generar

una ruta de adipil-CoA. Tal ruta puede incluirse en un organismo microbiano que produce ácido 6-aminocaproico o caprolactama para proporcionar un precursor de adipil-CoA para la producción de ácido 6-aminocaproico y/o caprolactama.

- 5 Una ruta de adipato ejemplar adicional utiliza alfa-cetoadipato como precursor (ver la figura 6 y el Ejemplo VI). Todavía otra divulgación proporciona un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de adipato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta de adipato expresada en una cantidad suficiente para producir adipato, comprendiendo la ruta de adipato una homocitrato sintasa, homoaconitasa, homoisocitrato deshidrogenasa, 2-cetoadipato reductasa, alfa-hidroxiadipato deshidratasa y oxidorreductasa.
- 10 Otra divulgación proporciona un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de adipato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta de adipato expresada en una cantidad suficiente para producir adipato, comprendiendo la ruta de adipato carbono nitrógeno liasa, oxidorreductasa, transaminasa y oxidorreductasa.
- 15 Aún otra ruta de adipato divulgada utiliza alfa-cetoadipato como precursor (véase la figura 9 y los Ejemplos X y XI). Por lo tanto, se divulga en el presente documento un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de adipato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta del adipato expresada en una cantidad suficiente para producir adipato, comprendiendo la ruta de adipato alfa-cetoadipil-CoA sintetasa, fosfotranscetoadipilasa/alfa-cetoadipato cinasa o alfa-cetoadipil-CoA:acetil-CoA transferasa; 2-hidroxiadipil-CoA deshidrogenasa; 2-hidroxiadipil-CoA deshidratasa; 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa; y adipil-CoA sintetasa, fosfotransadipilasa/adipato cinasa, adipil-CoA:acetil-CoA transferasa o adipil-CoA hidrolasa.
- 20 Aún otra divulgación proporciona un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de adipato que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta de adipato expresada en una cantidad suficiente para producir adipato, comprendiendo la ruta de adipato 2-hidroxiadipato deshidrogenasa; 2-hidroxiadipil-CoA sintetasa, fosfotranshidroxiadipilasa/2-hidroxiadipato cinasa o 2-hidroxiadipil-CoA:acetil-CoA transferasa; 2-hidroxiadipil-CoA deshidratasa; 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa; y adipil-CoA sintetasa, fosfotransadipilasa/adipato cinasa, adipil-CoA: acetil-CoA transferasa o adipil-CoA hidrolasa.
- 25 En una realización adicional, la invención proporciona un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama, en la que el organismo microbiano de origen sintético comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido que convierte un sustrato en un producto, como se divulga en el presente documento. Por lo tanto, la invención proporciona un organismo microbiano de origen sintético que contiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido, en el que el polipéptido es una enzima o proteína que convierte los sustratos y productos de una ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o ruta de caprolactama, tal como se muestra en las figuras 2, 3, 8 y 9.
- 30
- 35

Se divulga un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de adipato, en la que el organismo microbiano contiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido que convierte un sustrato en un producto seleccionado de succinil-CoA y acetil-CoA en 3-oxoadipil-CoA; 3-oxoadipil-CoA en 3-hidroxiadipil-CoA; 3-hidroxiadipil-CoA en 5-carboxi-2-pentenoil-CoA; 5-carboxi-2-pentenoil-CoA en adipil-CoA; adipil-CoA en adipato (véase la figura 2). También se divulga un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de adipato, en la que el organismo microbiano contiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido que convierte un sustrato en un producto seleccionado de succinil-CoA y acetil-CoA en 3-oxoadipil-CoA; 3-oxoadipil-CoA en 3-oxoadipato; 3-oxoadipato en 3-hidroxiadipato; 3-hidroxiadipato en hexa-2-enodioato; hexa-2-enodioato en adipato (véase la figura 3).

40

45

En una realización adicional, la invención proporciona un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de ácido 6-aminocaproico, en la que el organismo microbiano contiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido que convierte un sustrato en un producto seleccionado de adipil-CoA en adipato semialdehído; y adipato semialdehído en 6-aminocaproato (véase la figura 8). En aún otra realización, la invención proporciona un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de caprolactama, en la que el organismo microbiano contiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido que convierte un sustrato en un producto seleccionado de adipil-CoA en adipato semialdehído; adipato semialdehído en 6-aminocaproato; y 6-aminocaproato en caprolactama.

50

55

Aún otra divulgación proporciona un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de adipato, en la que el organismo microbiano contiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido que convierte un sustrato en un producto seleccionado de alfa-cetoadipato en alfa-cetoadipil-CoA; alfa-cetoadipil-CoA en 2-

hidroxiadipil-CoA; 2-hidroxiadipil-CoA en 5-carboxi-2-pentenoil-CoA; 5-carboxi-2-pentenoil-CoA en adipil-CoA; y adipil-CoA en adipato (véase la figura 9). Se divulga adicionalmente un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de adipato, en la que el organismo microbiano contiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido que convierte un sustrato en un producto seleccionado de alfa-cetoadipato en 2-hidroxiadipato; 2-hidroxiadipato en 2-hidroxiadipil-CoA; 2-hidroxiadipil-CoA en 5-carboxi-2-pentenoil-CoA; 5-carboxi-2-pentenoil-CoA en adipil-CoA; y adipil-CoA en adipato (figura 9).

La invención se describe en el presente documento con referencia general a la reacción metabólica, reactivo o producto de la misma, o con referencia específica a uno o más ácidos nucleicos o genes que codifican una enzima asociada con o que cataliza la reacción metabólica, reactivo o producto de referencia. A menos que se indique expresamente lo contrario en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que la referencia a una reacción también constituye una referencia a los reactivos y productos de la reacción. De forma similar, a menos que se indique expresamente en el presente documento, la referencia a un reactivo o producto también hace referencia a la reacción, y la referencia a cualquiera de estos constituyentes metabólicos también hace referencia al gen o genes que codifican las enzimas que catalizan la reacción, reactivo o producto de referencia. Asimismo, dados los campos ya conocidos de bioquímica metabólica, enzimología y genómica, la referencia en el presente documento a un gen o ácido nucleico codificante también constituye una referencia a la enzima codificada correspondiente y a la reacción que cataliza, así como a los reactivos y productos de la reacción.

Los organismos microbianos de origen sintético de la invención pueden producirse introduciendo ácidos nucleicos expresables que codifican una o más de las enzimas que participan en una o más rutas biosintéticas de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama. Dependiendo del organismo microbiano huésped elegido para la biosíntesis, se pueden expresar los ácidos nucleicos para una parte o la totalidad de una ruta biosintética particular de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama. Por ejemplo, si un huésped elegido es deficiente en una o más enzimas para una ruta biosintética deseada, entonces los ácidos nucleicos expresables para la enzima o enzimas deficientes se introducen en el huésped para la expresión exógena posterior. Como alternativa, si el huésped elegido presenta la expresión endógena de algunos genes de la ruta, pero es deficiente en otros, entonces se necesita un ácido nucleico codificante para la enzima o enzimas deficientes para lograr la biosíntesis de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama. Por lo tanto, un organismo microbiano de origen sintético de la invención puede producirse introduciendo actividades enzimáticas exógenas para obtener una ruta biosintética deseada o puede obtenerse una ruta biosintética deseada introduciendo una o más actividades enzimáticas exógenas que, junto con una o más enzimas endógenas, produce un producto deseado tal como adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama.

Dependiendo de los constituyentes de la ruta biosintética de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama de un organismo microbiano huésped seleccionado, los organismos microbianos de origen sintético de la invención incluirán al menos un ácido nucleico que codifica la ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama expresado de forma exógena y hasta todos los ácidos nucleicos codificantes para una o más rutas biosintéticas de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama. Por ejemplo, la biosíntesis de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama puede establecerse en un huésped deficiente en una enzima de la ruta a través de la expresión exógena del correspondiente ácido nucleico codificantes. En un huésped deficiente en todas las enzimas de una ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama, se puede incluir la expresión exógena de todas las enzimas en la ruta, aunque se entiende que todas las enzimas de una ruta se pueden expresar incluso si el huésped contiene al menos una de las enzimas de la ruta.

Por ejemplo, la expresión exógena de todas las enzimas en una ruta para la producción de adipato puede incluirse en un organismo huésped, tal como succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa, y adipil-CoA sintetasa o fosfotransadipilasa/adipato cinasa o adipil-CoA:acetil-CoA transferasa o adipil-CoA hidrolasa. En particular, un organismo huésped puede contener las enzimas de la ruta de adipato succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa, y adipil-CoA sintetasa. Como alternativa, un organismo huésped puede contener las enzimas de la ruta de adipato succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa, y fosfotransadipilasa/adipato cinasa. Además, un organismo huésped puede contener las enzimas de la ruta de adipato succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa, y adipil-CoA:acetil-CoA transferasa. Además, un organismo huésped puede contener las enzimas de la ruta de adipato succinil-CoA:acetil-CoA aciltransferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa, y adipil-CoA hidrolasa.

- En el caso de un organismo microbiano productor de ácido 6-aminocaproico, la expresión exógena de todas las enzimas en una ruta para la producción de ácido 6-aminocaproico puede incluirse en un organismo huésped, tal como aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA y transaminasa o aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA y 6-aminocaproato deshidrogenasa. Para un organismo microbiano que produce caprolactama, la expresión exógena de todas las enzimas en una ruta para la producción de caprolactama se puede incluir en un organismo huésped, tal como aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA, transaminasa o la 6-aminocaproato deshidrogenasa, y amidohidrolasa.
- 10 Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que el número de ácidos nucleicos codificantes para introducir en una forma expresable será, al menos, paralelo a las deficiencias de la ruta del adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama del organismo microbiano huésped seleccionado. Por lo tanto, un organismo microbiano de origen sintético de la invención puede tener uno, dos, tres, cuatro o cinco, hasta todos los ácidos nucleicos que codifican las enzimas anteriores que constituyen una
- 15 ruta biosintética de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama. En algunas realizaciones, los organismos microbianos de origen sintético también pueden incluir otras modificaciones genéticas que facilitan u optimizan la biosíntesis de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama o que confieren otras funciones útiles sobre el organismo microbiano huésped. Una de dichas funcionalidades diferentes puede incluir, por ejemplo, el aumento de la síntesis de uno o más de los precursores de la ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama tales como succinil-CoA y/o acetil-CoA en el caso de la síntesis de adipato, o adipil-CoA en el caso de la síntesis de ácido 6-aminocaproico o caprolactama, incluyendo las enzimas de la ruta de adipato divulgadas en el presente documento.

En algunas realizaciones, se genera un organismo microbiano de origen sintético de la invención a partir de un huésped que contiene la capacidad enzimática para sintetizar adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama. En esta realización específica, puede ser útil aumentar la síntesis o acumulación de un producto de la ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o de caprolactama para, por ejemplo, impulsar reacciones de la ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama hacia la producción de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama. El aumento de la síntesis o la acumulación puede lograrse, por ejemplo, mediante la sobreexpresión de ácidos nucleicos que codifican una o más de las enzimas de la ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama descritas

30 anteriormente. La sobreexpresión de la enzima o enzimas de la ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama puede ocurrir, por ejemplo, a través de la expresión exógena del gen o genes endógenos, o a través de la expresión exógena del gen o genes heterólogos. Por lo tanto, los organismos de origen natural se pueden generar fácilmente para que sean organismos microbianos de origen sintético de la invención, por ejemplo, que producen adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama, a través de la sobreexpresión de uno, dos, tres, cuatro, cinco, es decir, hasta todos los ácidos nucleicos que codifican enzimas de la ruta biosintética del adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama. Además, un organismo de origen sintético puede generarse por mutagénesis de un gen endógeno que da como resultado un aumento en la actividad de una enzima en la ruta biosintética de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama.

40 En realizaciones particularmente útiles, se emplea la expresión exógena de los ácidos nucleicos codificantes. La expresión exógena confiere la capacidad de personalizar la expresión y/o los elementos reguladores para el huésped y la aplicación para lograr un nivel de expresión deseado que esté controlado por el usuario. Sin embargo, la expresión endógena también se puede utilizar en otras realizaciones tales como eliminando un efector regulador negativo o la inducción del promotor del gen al unirse a un promotor inducible u otro elemento regulador. Por lo tanto, un gen endógeno que tiene un promotor inducible de origen natural se puede regular en aumento proporcionando el agente inductor apropiado, o la región reguladora de un gen endógeno se puede diseñar para incorporar un elemento regulador inducible, permitiendo de este modo la regulación de la expresión aumentada de un gen endógeno en un momento deseado. De forma similar, se puede incluir un promotor inducible como un elemento regulador para un gen exógeno introducido en un organismo microbiano de origen sintético.

50 Se entiende que, en los métodos de la invención, cualquiera de los uno o más ácidos nucleicos exógenos se puede introducir en un organismo microbiano para producir un organismo microbiano de origen sintético de la invención. Los ácidos nucleicos se pueden introducir para conferir, por ejemplo, una ruta biosintética de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama sobre el organismo microbiano. Como alternativa, se pueden introducir ácidos nucleicos codificantes para producir un organismo microbiano intermedio que tiene la capacidad biosintética de catalizar algunas de las reacciones requeridas para conferir la capacidad biosintética del adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama. Por ejemplo, un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta biosintética de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama puede comprender al menos dos ácidos nucleicos exógenos que codifican las enzimas deseadas. En el caso de la producción de adipato, los al menos dos ácidos

nucleicos exógenos pueden codificar las enzimas tales como la combinación de succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa y 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, o succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa y 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, o 3-hidroxiadipil-CoA y 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa, o 3-hidroxiacil-CoA y adipil-CoA sintetasa, y similares. En el caso de la producción de caprolactama, los al menos dos ácidos nucleicos exógenos
5 pueden codificar las enzimas tales como la combinación de aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA y transaminasa, o aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA y amidohidrolasa, o transaminasa y amidohidrolasa.

Por lo tanto, se entiende que puede incluirse cualquier combinación de dos o más enzimas de una ruta biosintética en un organismo microbiano de origen sintético de la invención.

10

De forma similar, se entiende que puede incluirse cualquier combinación de tres o más enzimas de una ruta biosintética en un organismo microbiano de origen sintético de la invención, por ejemplo, en el caso de la producción de adipato, la combinación de enzimas succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, y 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa; o succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y 5-
15 carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa; o succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y adipil-CoA sintetasa; o 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa y adipil-CoA:acetil-CoA transferasa, etc., según se desee, siempre que la combinación de enzimas de la ruta biosintética deseada dé como resultado la producción del producto deseado correspondiente. De manera similar, cualquier combinación de cuatro o más enzimas de una ruta biosintética como se divulga en el presente documento, se puede incluir en un
20 organismo microbiano de origen sintético de la invención, según se desee, siempre que la combinación de enzimas de la ruta biosintética deseada dé como resultado la producción del producto deseado correspondiente.

Además de la biosíntesis de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama como se describe en el presente documento, los organismos microbianos de origen sintético y los métodos de la invención también pueden utilizarse
25 en diversas combinaciones entre sí y con otros organismos microbianos y métodos ya conocidos en la técnica para lograr la biosíntesis del producto por otras rutas. Por ejemplo, una alternativa para producir adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama además del uso de los productores de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama es a través de la adición de otro organismo microbiano capaz de convertir un intermedio de la ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama en adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama. Uno de tales
30 procedimientos incluye, por ejemplo, la fermentación de un organismo microbiano que produce un intermedio de la ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama. El intermedio de la ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama se puede usar entonces como un sustrato para un segundo organismo microbiano que convierte el intermedio de la ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama en adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama. El intermedio de la ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama se puede añadir
35 directamente a otro cultivo del segundo organismo o el cultivo original de productores intermedios de la ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama puede agotarse de estos organismos microbianos, por ejemplo, por separación celular, y luego la adición posterior del segundo organismo al caldo de fermentación se puede utilizar para producir el producto final sin etapas de purificación intermedias.

En otras realizaciones, los organismos microbianos de origen sintético y los métodos de la invención se pueden ensamblar en una amplia diversidad de rutas secundarias para lograr la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico o caprolactama. En estas realizaciones, las rutas biosintéticas para un producto deseado de la invención se pueden
40 segregar en diferentes organismos microbianos, y los diferentes organismos microbianos se pueden co-cultivar para producir el producto final. En tal esquema biosintético, 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 ácido 6-aminocaproico o caprolactama puede lograrse construyendo un organismo microbiano que contenga rutas biosintéticas para la conversión de un intermedio de ruta a otro intermedio de ruta o el producto. Como alternativa, el ácido 6-aminocaproico o la caprolactama también pueden producirse biosintéticamente a partir de organismos microbianos a través del co-cultivo o la co-fermentación usando dos organismos en el mismo recipiente, donde el
45 primer organismo microbiano produce un intermedio de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama, y el segundo organismo microbiano convierte el intermedio en ácido 6-aminocaproico o caprolactama.

Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica comprenderán que existe una amplia diversidad de combinaciones y permutaciones para los organismos
55 microbianos no naturales y los métodos de la invención junto con otros organismos microbianos, teniendo el co-cultivo de otros organismos microbianos de origen sintético rutas secundarias y con combinaciones de otros procedimientos químicos y/o bioquímicos bien conocidos en la técnica para producir adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama.

- Las fuentes de ácidos nucleicos codificantes para una enzima de la ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama pueden incluir, por ejemplo, cualquier especie en la que el producto génico codificado sea capaz de catalizar la reacción de referencia. Dichas especies incluyen tanto organismos procariontes como eucariotes incluyendo, pero sin limitación, bacterias, incluyendo arqueas y eubacterias, y eucariotes, incluyendo levaduras, plantas, insectos, animales y mamíferos, incluyendo seres humanos. Los ejemplos de especies para dichas fuentes incluyen, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Pseudomonas kuackmussii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia proteamaculans*, *Streptomyces* sp. 2065, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia eutropha*, *Clostridium acetobutylicum*, *Euglena gracilis*, *Treponema denticola*, *Clostridium kluyveri*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Acinetobacter* sp. ADP1, *Streptomyces coelicolor*, *Eubacterium barkeri*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium thermoaceticum* (*Moorella thermoaceticum*), *Acinetobacter calcoaceticus*, *Mus musculus*, *Sus scrofa*, *Flavobacterium* sp, *Arthrobacter aureus*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium carboxydovorans*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Achromobacter denitrificans*, *Arabidopsis thaliana*, *Haemophilus influenzae*, *Acidaminococcus fermentans*, *Clostridium* sp. M62/1, *Fusobacterium nucleatum*, así como otras especies ejemplares divulgadas en el presente documento o disponibles como organismos de origen para los genes correspondientes (véanse los Ejemplos). Sin embargo, con la secuencia genómica completa disponible para más de 550 especies (con más de la mitad disponible en bases de datos públicas tal como el NCBI), incluyendo 395 genomas de microorganismos y una diversidad de genomas de levaduras, hongos, plantas y mamíferos, el identificación de genes que codifican la actividad biosintética de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama requerida para uno o más genes en especies relacionadas o distantes, incluyendo, por ejemplo, homólogos, ortólogos, parálogos y desplazamientos génicos no ortólogos de genes conocidos, y el intercambio de alteraciones genéticas entre organismos, es rutinario y ya conocido en la técnica. Por consiguiente, las alteraciones metabólicas que permiten la biosíntesis de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama descritas en el presente documento con referencia a un organismo particular, tal como *E. coli*, pueden aplicarse fácilmente a otros microorganismos, incluyendo organismos procariontes y eucariotes por igual. Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica sabrán que una alteración metabólica ilustrada en un organismo se puede aplicar por igual a otros organismos.
- En algunos casos, tal como cuando existe una ruta biosintética de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama alternativa en una especie no relacionada, la biosíntesis de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama se puede conferir a la especie huésped mediante, por ejemplo, la expresión exógena de un parólogo o parálogos de la especie no relacionada que cataliza una reacción metabólica similar, aunque no idéntica, para reemplazar la reacción de referencia. Debido a que existen ciertas diferencias entre las redes metabólicas entre diferentes organismos, los expertos en la técnica entenderán que el uso del gen real entre diferentes organismos puede diferir. Sin embargo, dadas las enseñanzas y la orientación proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica también comprenderán que las enseñanzas y métodos de la invención se pueden aplicar a todos los organismos microbianos usando las alteraciones metabólicas similares a las ilustradas en el presente documento para construir un organismo microbiano en una especie de interés que sintetizará ácido 6-aminocaproico o caprolactama.
- Los organismos microbianos huésped se pueden seleccionar de, y los organismos microbianos de origen sintético generados en, por ejemplo, bacterias, levaduras, hongos o cualquiera de una diversidad de otros microorganismos aplicables a procesos de fermentación. Los ejemplos de bacterias incluyen especies seleccionadas de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Rhizobium etli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Gluconobacter oxydans*, *Zymomonas mobilis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptomyces coelicolor*, *Clostridium acetobutylicum*, *Pseudomonas fluorescens*, y *Pseudomonas putida*. Los ejemplos de levaduras u hongos incluyen especies seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* y *Pichia pastoris*. Por ejemplo, *E. coli* es un organismo huésped particularmente útil ya que es un organismo microbiano bien caracterizado adecuado para ingeniería genética. Otros organismos huésped particularmente útiles incluyen levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*.
- Los métodos para construir y ensayar los niveles de expresión de un huésped que produce ácido 6-aminocaproico o caprolactama de origen sintético se pueden realizar, por ejemplo, mediante métodos recombinantes y de detección bien conocidos en la técnica. Dichos métodos se pueden encontrar descritos, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001); y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999).

Las secuencias de ácido nucleico exógeno implicadas en una ruta para la producción de ácido 6-aminocaproico o caprolactama se pueden introducir de forma estable o transitoria en una célula huésped usando técnicas bien conocidas en la técnica que incluyen, pero sin limitación, conjugación, electroporación, transformación química, transducción, transfección y transformación por ultrasonidos. Para la expresión exógena en *E. coli* u otras células procariontas, algunas secuencias de ácido nucleico en los genes o ADNc de ácidos nucleicos eucariotas pueden codificar señales de direccionamiento tal como una señal mitocondrial N-terminal u otra señal de direccionamiento, que pueden eliminarse antes de la transformación en células huésped procariontas, si se desea. Por ejemplo, la eliminación de una secuencia líder mitocondrial condujo a una expresión aumentada en *E. coli* (Hoffmeister et al., J. Biol. Chem. 280:4329-4338 (2005)). Para la expresión exógena en levaduras u otras células eucariotas, los genes pueden expresarse en el citosol sin la adición de secuencia líder, o pueden dirigirse a la mitocondria u otros orgánulos, o dirigirse a la secreción, mediante la adición de una secuencia de direccionamiento adecuada tal como una señal de direccionamiento mitocondrial o de secreción adecuada para las células huésped. Por lo tanto, se entiende que las modificaciones apropiadas en una secuencia de ácido nucleico para eliminar o incluir una secuencia de direccionamiento pueden incorporarse en una secuencia de ácido nucleico exógeno para impartir propiedades deseables. Además, los genes pueden someterse a optimización de codón con técnicas bien conocidas en la técnica para lograr la expresión optimizada de las proteínas.

Se puede construir un vector o vectores de expresión para incluir uno o más ácidos nucleicos que codifican la ruta biosintética de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama como se ilustra en el presente documento ligado operativamente a secuencias de control de la expresión funcionales 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 vectores y secuencias de selección o marcadores operables para la integración estable en un cromosoma huésped. Adicionalmente, los vectores de expresión pueden incluir uno o más genes marcadores seleccionables y secuencias de control de expresión apropiadas. También se pueden incluir genes marcadores seleccionables que, por ejemplo, proporcionan resistencia a antibióticos o toxinas, complementan deficiencias auxotróficas, o suministran nutrientes críticos no en los medios de cultivo. Las secuencias de control de la expresión pueden incluir promotores constitutivos e inducibles, potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, y similares, que se conocen bien en la técnica. Cuando se van a coexpresar dos o más ácidos nucleicos codificantes exógenos, se pueden insertar ambos ácidos nucleicos, por ejemplo, en un único vector de expresión o en vectores de expresión separados. Para la expresión de un solo vector, los ácidos nucleicos codificantes pueden vincularse operativamente a una secuencia de control de la expresión común o unirse a diferentes secuencias de control de la expresión, tales como un promotor inducible y un promotor constitutivo. La transformación de secuencias de ácido nucleico exógeno implicadas en una ruta metabólica o sintética se puede confirmar usando métodos bien conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, análisis de ácidos nucleicos tales como transferencias Northern o amplificación de ARNm por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o inmunotransferencia para la expresión de productos génicos, u otros métodos analíticos adecuados para ensayar la expresión de una secuencia de ácido nucleico introducida o su producto génico correspondiente. Los expertos en la técnica entenderán que el ácido nucleico exógeno se expresa en una cantidad suficiente para producir el producto deseado, y se entiende además que los niveles de expresión se pueden optimizar para obtener una expresión suficiente usando métodos bien conocidos en la técnica y como se divulga en el presente documento.

La invención proporciona adicionalmente métodos para producir un producto deseado tal como ácido 6-aminocaproico o caprolactama. Se divulga en el presente documento un método para producir adipato, que comprende cultivar un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de adipato, comprendiendo la ruta al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta de adipato expresada en una cantidad suficiente para producir adipato, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para producir adipato, comprendiendo la ruta de adipato succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa, y adipil-CoA sintetasa o fosfotransadipilasa/adipato cinasa o adipil-CoA:acetil-CoA transferasa o adipil-CoA hidrolasa. Otra divulgación proporciona un método para producir adipato, que comprende cultivar un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de adipato, comprendiendo la ruta al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta de adipato expresada en una cantidad suficiente para producir adipato, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para producir adipato, comprendiendo la ruta de adipato succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-oxoadipil-CoA transferasa, 3-oxoadipato reductasa, 3-hidroxiadipato deshidratasa, y 2-enoato reductasa.

En otra realización más, la invención proporciona un método para producir ácido 6-aminocaproico, que comprende cultivar un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de ácido 6-aminocaproico, comprendiendo la

ruta al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta de ácido 6-aminocaproico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido 6-aminocaproico, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para producir ácido 6-aminocaproico, comprendiendo la ruta de ácido 6-aminocaproico aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA y transaminasa o 6-aminocaproato deshidrogenasa. En una realización adicional, la invención proporciona un método para producir caprolactama, que comprende cultivar un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de caprolactama, comprendiendo la ruta al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta de caprolactama expresada en una cantidad suficiente para producir caprolactama, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para producir caprolactama, comprendiendo la ruta de caprolactama aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA, transaminasa o 6-aminocaproato deshidrogenasa, y amidohidrolasa.

También se divulga en el presente documento un método para producir adipato, que comprende cultivar un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de adipato, comprendiendo la ruta al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta de adipato expresada en una cantidad suficiente para producir adipato, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para producir adipato, comprendiendo la ruta de adipato alfa-cetoadipil-CoA sintetasa, fosfotranscetoadipilasa/alfa-cetoadipato cinasa o alfa-cetoadipil-CoA:acetil-CoA transferasa; 2-hidroxiadipil-CoA deshidrogenasa; 2-hidroxiadipil-CoA deshidratasa; 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa; y adipil-CoA sintetasa, fosfotransadipilasa/adipato cinasa, adipil-CoA:acetil-CoA transferasa o adipil-CoA hidrolasa.

En aún otra divulgación, se proporciona un método para producir adipato, que comprende cultivar un organismo microbiano de origen sintético que tiene una ruta de adipato, comprendiendo la ruta al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta de adipato expresada en una cantidad suficiente para producir adipato, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para producir adipato, comprendiendo la ruta de adipato 2-hidroxiadipato deshidrogenasa; 2-hidroxiadipil-CoA sintetasa, fosfotranshidroxiadipilasa/2-hidroxiadipato cinasa o 2-hidroxiadipil-CoA:acetil-CoA transferasa; 2-hidroxiadipil-CoA deshidratasa; 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa; y adipil-CoA sintetasa, fosfotransadipilasa/adipato cinasa, adipil-CoA:acetil-CoA transferasa o adipil-CoA hidrolasa.

Se pueden realizar una purificación y/o ensayos adecuados para ensayar la producción de ácido 6-aminocaproico o caprolactama usando métodos bien conocidos. Se pueden cultivar réplicas adecuadas, tales como cultivos por triplicado, para cada cepa diseñada a ensayar. Por ejemplo, se puede controlar la formación de productos y subproductos en el huésped de producción diseñado. El producto final e intermedios, y otros compuestos orgánicos, pueden analizarse mediante métodos tales como HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), GC-MS (cromatografía de gases-espectroscopía de masas) y LC-MS (cromatografía líquida-espectroscopía de masas) usando procedimientos rutinarios bien conocidos en la técnica. La liberación del producto en el caldo de fermentación también se puede analizar con el sobrenadante de cultivo. Los subproductos y la glucosa residual se pueden cuantificar mediante HPLC usando, por ejemplo, un detector de índice de refracción para glucosa y alcoholes, y un detector de UV para ácidos orgánicos (Lin et al., *Biotechnol. Bioeng.* 90:775-779 (2005)), u otros métodos de ensayo y detección adecuados ya conocidos en la técnica. Las actividades enzimáticas individuales de las secuencias de ADN exógeno también se pueden ensayar usando métodos bien conocidos en la técnica.

El ácido 6-aminocaproico o caprolactama se pueden separar de otros componentes en el cultivo usando una diversidad de métodos bien conocidos en la técnica. Dichos métodos de separación incluyen, por ejemplo, procedimientos de extracción, así como métodos que incluyen extracción líquido/líquido continua, pervaporación, filtración de membrana, separación de membrana, ósmosis inversa, electrodiálisis, destilación, cristalización, centrifugación, filtración extractiva, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de adsorción, y ultrafiltración. Todos los métodos anteriores se conocen bien en la técnica.

Cualquiera de los organismos microbianos de origen sintético descritos en el presente documento se puede cultivar para producir y/o secretar los productos biosintéticos de la invención. Por ejemplo, los productores de ácido 6-aminocaproico o caprolactama pueden cultivarse para la producción biosintética de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama.

Para la producción de ácido 6-aminocaproico o caprolactama, las cepas recombinantes se cultivan en un medio con fuente de carbono y otros nutrientes esenciales. Es altamente deseable mantener las condiciones anaerobias en el fermentador para reducir el coste del proceso global. Dichas condiciones se pueden obtener, por ejemplo, haciendo primero burbujear el medio con nitrógeno y luego sellando los matraces con un tapón y una tapa de rosca. Para las cepas donde el crecimiento no se observa de forma anaerobia, se pueden aplicar condiciones microaerobias perforando el tapón con un pequeño orificio para una aireación limitada. Las condiciones anaerobias ejemplares se

han descrito previamente y se conocen bien en la técnica. Las condiciones aerobias y anaerobias ejemplares se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º de serie 11/891.602, presentada el 10 de agosto de 2007. Las fermentaciones pueden realizarse de forma discontinua, en lote alimentado o de forma continua, como se divulga en el presente documento.

5

Si se desea, el pH del medio se puede mantener a un pH deseado, en particular pH neutro, como un pH de aproximadamente 7 mediante la adición de una base, tal como NaOH u otras bases, o ácido, según sea necesario para mantener el medio de cultivo a un pH deseable. La velocidad de crecimiento puede determinarse midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (600 nm), y la tasa de captación de glucosa controlando el agotamiento de la fuente de carbono a lo largo del tiempo.

10

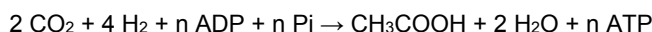
El medio de crecimiento puede ser, por ejemplo, cualquier fuente de carbohidratos que pueda suministrar una fuente de carbono al microorganismo de origen sintético. Dichas fuentes incluyen, por ejemplo, azúcares tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fructosa y almidón. Otras fuentes de carbohidratos incluyen, por ejemplo, materias primas renovables y biomasa. Los tipos ejemplares de biomasa que se pueden usar como materias primas en los métodos de la invención incluyen biomasa celulósica, biomasa hemicelulósica y materias primas de lignina o porciones de materias primas. Dichas materias primas de biomasa contienen, por ejemplo, sustratos de carbohidratos útiles como fuentes de carbono tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fructosa y almidón. Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que las materias primas renovables y la biomasa distintas de las ilustradas anteriormente también pueden usarse para cultivar los organismos microbianos de la invención para la producción de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama.

Además de materias primas renovables tales como las ilustradas anteriormente, los organismos microbianos de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama de la invención también pueden modificarse para su crecimiento en singás como su fuente de carbono. En esta realización específica, una o más proteínas o enzimas se expresan en los organismos productores de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama para proporcionar una ruta metabólica para la utilización de singás u otra fuente de carbono gaseoso.

El gas de síntesis, también conocido como singás o gas productor, es el producto principal de la gasificación de carbón y de materiales carbonosos tales como materiales de biomasa, incluyendo cultivos agrícolas y residuos. El singás es una mezcla principalmente de H₂ y CO y puede obtenerse a partir de la gasificación de cualquier materia prima orgánica, incluyendo, pero sin limitación, carbón, aceite de carbón, gas natural, biomasa y materia orgánica residual. La gasificación generalmente se realiza bajo una alta relación de combustible con respecto a oxígeno.

Aunque principalmente contiene H₂ y CO, el singás también puede incluir CO₂ y otros gases en cantidades inferiores. Por lo tanto, el gas de síntesis proporciona una fuente rentable de carbono gaseoso tal como CO y, adicionalmente, CO₂.

La ruta de Wood-Ljungdahl cataliza la conversión de CO y H₂ en acetyl-CoA y otros productos, tal como acetato. Los organismos capaces de utilizar CO y singás también tienen generalmente la capacidad de utilizar CO₂ y mezclas de CO₂/H₂ a través del mismo conjunto básico de enzimas y transformaciones incluidas por la ruta de Wood-Ljungdahl. La conversión dependiente de H₂ de CO₂ en acetato por microorganismos se reconoció mucho antes de que se revelara que el CO también podría ser utilizado por los mismos organismos y que estaban implicadas las mismas rutas. Se ha demostrado que muchos acetógenos crecen en presencia de CO₂ y producen compuestos tales como el acetato, siempre que haya hidrógeno presente para suministrar los equivalentes reductores necesarios (véase, por ejemplo, Drake, Acetogenesis, págs. 3-60 Chapman y Hall, Nueva York, (1994)). Esto se puede resumir por la siguiente ecuación:



50

Por lo tanto, los microorganismos de origen sintético que poseen la ruta de Wood-Ljungdahl pueden utilizar mezclas de CO₂ y H₂, también para la producción de acetyl-CoA y otros productos deseados.

La ruta de Wood-Ljungdahl se conocen bien en la técnica y consiste en 12 reacciones que pueden separarse en dos ramificaciones: (1) ramificación de metilo y (2) ramificación de carbonilo. La ramificación de metilo convierte el singás en metil-tetrahidrofolato (metil-THF), mientras que la ramificación de carbonilo convierte el metil-THF en acetyl-CoA. Las reacciones en la ramificación de metilo son catalizadas en orden por las siguientes enzimas: ferredoxina oxidoreductasa, formato deshidrogenasa, formiltetrahidrofolato sintetasa, meteniltetrahidrofolato ciclodeshidratasa, metilentetrahidrofolato deshidrogenasa y metilentetrahidrofolato reductasa. Las reacciones en la ramificación de

55

carbonilo están catalizadas en orden por las siguientes enzimas: cobalamida corrinoide/proteína hierro-azufre, metiltransferasa, monóxido de carbono deshidrogenasa, acetil-CoA sintasa, acetil-CoA sintasa disulfuro reductasa e hidrogenasa. Siguiendo las enseñanzas y la orientación proporcionadas en el presente documento para introducir un número suficiente de ácidos nucleicos codificantes para generar una ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o

5 caprolactama, los expertos en la técnica comprenderán que el mismo diseño también puede realizarse con respecto a la introducción de al menos los ácidos nucleicos que codifican las enzimas de Wood-Ljungdahl ausentes en el organismo huésped. Por lo tanto, la introducción de uno o más ácidos nucleicos codificantes en los organismos microbianos de la invención de manera que el organismo modificado contenga la ruta completa de Wood-Ljungdahl, conferirá la capacidad de utilización del singás.

10

Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica comprenderán que se puede producir un organismo microbiano de origen sintético que secreta los compuestos biosintetizados de la invención cuando se cultiva en una fuente de carbono tal como un carbohidrato. Dichos compuestos incluyen, por ejemplo, ácido 6-aminocaproico o caprolactama y cualquiera de los metabolitos

15 intermedios en la ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama. Todo lo que se requiere es diseñar en una o más de las actividades enzimáticas requeridas para lograr la biosíntesis del compuesto o intermedio deseado que incluye, por ejemplo, inclusión de algunas o todas las rutas biosintéticas de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama. Por consiguiente, la invención proporciona un organismo microbiano de origen sintético que produce y/o secreta ácido 6-aminocaproico o caprolactama cuando se cultiva en un carbohidrato y produce y/o secreta

20 cualquiera de los metabolitos intermedios que se muestran en la ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama al cultivarse en un carbohidrato. Por ejemplo, los organismos microbianos productores de adipato pueden iniciar la síntesis a partir de un intermediario, por ejemplo, 3-oxoadipil-CoA, 3-hidroxiadipil-CoA, 5-carboxi-2-pentenoil-CoA, o adipil-CoA (véase la figura 2), como se desee. Además, un organismo microbiano que produce adipato puede iniciar la síntesis a partir de un intermediario, por ejemplo, 3-oxoadipil-CoA, 3-oxoadipato, 3-

25 hidroxiadipato o hexa-2-enodioato (véase la figura 3). El organismo microbiano productor de ácido 6-aminocaproico de la invención puede iniciar la síntesis a partir de un intermedio, por ejemplo, adipato semialdehído (véase la figura 8). El organismo microbiano productor de caprolactama de la invención puede iniciar la síntesis a partir de un intermedio, por ejemplo, adipato semialdehído o ácido 6-aminocaproico (véase la figura 8), según se desee.

30 Los organismos microbianos de origen sintético de la invención se construyen usando métodos bien conocidos en la técnica como se ilustra en el presente documento para expresar exógenamente al menos un ácido nucleico que codifica una enzima de la ruta de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama en cantidades suficientes para producir ácido 6-aminocaproico o caprolactama. Se entiende que los organismos microbianos de la invención se cultivan en condiciones suficientes para producir ácido 6-aminocaproico o caprolactama. Siguiendo las enseñanzas

35 y la orientación proporcionadas en el presente documento, los organismos microbianos de origen sintético de la invención pueden lograr la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico o caprolactama dando como resultado concentraciones intracelulares entre aproximadamente 0,1-200 mM o más. Generalmente, la concentración intracelular de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama está entre aproximadamente 3-150 mM, particularmente entre aproximadamente 5-125 mM y más particularmente entre aproximadamente 8-100 mM,

40 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 ejemplares también se pueden conseguir a partir de los organismos microbianos de origen sintético de la invención.

En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo incluyen condiciones de crecimiento o mantenimiento

45 anaerobias o sustancialmente anaerobias. Las condiciones anaerobias ejemplares se han descrito previamente y se conocen bien en la técnica. Las condiciones anaerobias ejemplares para procesos de fermentación se describen en el presente documento y se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 11/891.602, presentada el 10 de agosto de 2007. Cualquiera de estas condiciones puede emplearse también con organismos microbianos de origen sintético, así como otras condiciones anaerobias ya conocidas en la técnica. En dichas

50 condiciones anaeróbicas, los productores de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama pueden sintetizar ácido 6-aminocaproico o caprolactama a concentraciones intracelulares de 5-10 mM o más, así como todas las otras concentraciones ilustradas en el presente documento. Se entiende que, aunque la descripción anterior se refiere a concentraciones intracelulares, los organismos microbianos productores de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama pueden producir adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama intracelularmente y/o secretar el

55 producto en el medio de cultivo.

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

cultivo anaerobias o sustancialmente anaerobias.

Como se describe en el presente documento, una condición de crecimiento ejemplar para lograr la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico o caprolactama incluye condiciones de cultivo o fermentación anaerobias. En ciertas realizaciones, los organismos microbianos de origen sintético de la invención pueden mantenerse, cultivarse o fermentarse en condiciones anaerobias o sustancialmente anaerobias. Brevemente, las condiciones anaerobias se refieren a un ambiente sin oxígeno. Las condiciones sustancialmente anaerobias incluyen, por ejemplo, un cultivo, fermentación discontinua o fermentación continua de tal forma que la concentración de oxígeno disuelto en el medio permanezca entre el 0 y el 10% de saturación. Las condiciones sustancialmente anaerobias también incluyen células en crecimiento o en reposo en medio líquido o en agar sólido dentro de una cámara sellada mantenida con una atmósfera de menos del 1% de oxígeno. El porcentaje de oxígeno puede mantenerse, por ejemplo, burbujando el cultivo con una mezcla de N_2/CO_2 u otro gas o gases distintos de oxígeno adecuados.

Las condiciones de cultivo descritas en el presente documento pueden ampliarse y crecer continuamente para la fabricación de ácido 6-aminocaproico o caprolactama. Los ejemplos de procedimientos de crecimiento incluyen, por ejemplo, fermentación por lotes alimentados y separación por lotes; fermentación en lotes alimentados y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Todos estos procesos se conocen bien en la técnica. Los procedimientos de fermentación son particularmente útiles para la producción biosintética de cantidades comerciales de ácido 6-aminocaproico o caprolactama. Generalmente, y como con procedimientos de cultivo no continuos, la producción continua y/o casi continua de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama incluirá el cultivo de un organismo productor de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama de origen sintético de la invención en suficientes nutrientes y medio para mantener y/o casi mantener el crecimiento en una fase exponencial. El cultivo continuo en dichas condiciones puede incluir, por ejemplo, 1 día, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días o más. Adicionalmente, el cultivo continuo puede incluir 1 semana, 2, 3, 4 o 5 o más semanas y hasta varios meses. Como alternativa, los organismos de la invención se pueden cultivar durante horas, si es adecuado para una aplicación particular. Debe entenderse que las condiciones de cultivo continuas y/o casi continuas también pueden incluir todos los intervalos de tiempo entre estos periodos ejemplares. Se entiende además que el tiempo de cultivo del organismo microbiano de la invención es durante un período de tiempo suficiente para producir una cantidad suficiente de producto para un fin deseado.

Los procedimientos de fermentación se conocen bien en la técnica. Brevemente, la fermentación para la producción biosintética de ácido 6-aminocaproico o caprolactama puede utilizarse, por ejemplo, en fermentación discontinua alimentada y separación discontinua; fermentación discontinua alimentada y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Los ejemplos de procedimientos de fermentación discontinua y continua se conocen bien en la técnica.

Además de los procedimientos de fermentación anteriores que usan los productores de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama de la invención para la producción continua de cantidades sustanciales de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama, los productores de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama también puede someterse, por ejemplo, simultáneamente a procedimientos de síntesis química para convertir el producto en otros compuestos, o el producto puede separarse del cultivo de fermentación y someterse secuencialmente a conversión química para convertir el producto en otros compuestos, si se desea. Como se describe en el presente documento, un intermedio en la ruta de adipato que utiliza 3-oxoadipato, hexa-2-enodioato, se puede convertir en adipato, por ejemplo, mediante hidrogenación química sobre un catalizador de platino (véase el Ejemplo III).

Para generar mejores productores, se puede utilizar un modelo metabólico para optimizar las condiciones de crecimiento. El modelado también puede usarse para diseñar inactivaciones génicas que optimizan adicionalmente la utilización de la ruta (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 y US 2004/0009466, y la Patente de Estados Unidos N.º 7.127.379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos sobre el crecimiento celular de cambiar el metabolismo hacia una producción más eficiente de ácido 6-aminocaproico o caprolactama.

Un método computacional para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorece la biosíntesis de un producto deseado es el marco computacional OptKnock, Burgard et al., *Biotechnol. Bioeng.* 84:647-657 (2003). OptKnock es un programa de simulación y modelado metabólico que sugiere estrategias de eliminación de genes que dan como resultado microorganismos genéticamente estables que producen en exceso el producto diana. Específicamente, el marco examina la red metabólica y/o bioquímica completa de un microorganismo con el fin de sugerir manipulaciones genéticas que obliguen al producto bioquímico deseado a convertirse en un subproducto

obligatorio del crecimiento celular. Mediante el acoplamiento de la producción bioquímica con el crecimiento celular mediante delecciones génicas ubicadas estratégicamente u otra alteración génica funcional, las presiones de selección de crecimiento impuestas sobre las cepas diseñadas después de largos períodos de tiempo en un biorreactor conducen a mejoras en el rendimiento como resultado de la producción bioquímica obligatoria asociada al crecimiento. Por último, cuando se construyen delecciones génicas, existe una posibilidad insignificante de que las cepas diseñadas vuelvan a sus estados de tipo salvaje porque los genes seleccionados por OptKnock deben eliminarse completamente del genoma. Por lo tanto, esta metodología computacional puede usarse para identificar rutas alternativas que conducen a la biosíntesis de un producto deseado o usarse en relación con organismos microbianos de origen sintético para una mayor optimización de la biosíntesis de un producto deseado.

10 Brevemente, OptKnock es un término usado en el presente documento para referirse a un método computacional 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 los modelos de análisis de balance de flujo (FBA). Estas restricciones incluyen, por ejemplo, información cinética cualitativa, información reguladora cualitativa, y/o datos experimentales de microarrays de ADN. OptKnock también calcula soluciones para diversos problemas metabólicos, por ejemplo, ajustando los límites de flujo derivados a través de modelos de balance de flujo y explorando posteriormente los límites de rendimiento de las redes metabólicas en presencia de adiciones o delecciones génicas. El marco computacional de OptKnock permite la construcción de formulaciones modelo que permiten una consulta eficaz de los límites de rendimiento de las redes metabólicas y proporciona métodos para resolver los problemas de programación lineal de enteros mixtos resultantes. Los métodos de simulación y modelado metabólico denominados en el presente documento como OptKnock se describen, por ejemplo, en la publicación de Estados Unidos 2002/0168654, presentada el 10 de enero de 2002, en la Patente Internacional N.º PCT/US02/00660, presentada el 10 de enero de 2002, y la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 11/891.602, presentada el 10 de agosto de 2007.

25 Otro método computacional para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorece la producción biosintética de un producto es un sistema de simulación y modelado metabólico denominado SimPheny®. Este método y sistema computacional se describe, por ejemplo, en la publicación de Estados Unidos 2003/0233218, presentada el 14 de junio de 2002, y en la solicitud de patente internacional N.º PCT/US03/18838, presentada el 13 de junio de 2003. SimPheny® es un sistema computacional que puede usarse para producir un modelo de red *in silico* 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 solución que contiene todas y cada una de las funcionalidades posibles de las reacciones químicas en el sistema, determinando así una gama de actividades permitidas para el sistema biológico. Este enfoque se conoce como modelado basado en restricciones porque el espacio de solución se define por restricciones tales como la estequiometría conocida de las reacciones incluidas, así como las limitaciones de capacidad y termodinámica de las reacciones asociadas con los flujos máximos a través de las reacciones. El espacio definido por estas restricciones puede interrogarse para determinar las capacidades fenotípicas y el comportamiento del sistema biológico o de sus componentes bioquímicos.

40 Estos enfoques computacionales son consistentes con las realidades biológicas ya que los sistemas biológicos son flexibles y pueden alcanzar el mismo resultado de muchas maneras diferentes. Los sistemas biológicos están diseñados a través de mecanismos evolutivos que han sido restringidos por restricciones fundamentales que todos los sistemas vivos deben afrontar. Por lo tanto, la estrategia de modelado basada en restricciones incluye estas realidades generales. Además, la capacidad de imponer continuamente restricciones adicionales en un modelo de red mediante el endurecimiento de las restricciones da como resultado una reducción en el tamaño del espacio de la solución, mejorando así la precisión con la que se puede predecir el rendimiento fisiológico o el fenotipo.

50 Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica podrán aplicar diversos marcos computacionales para la simulación y modelado metabólico para diseñar e implementar la biosíntesis de un compuesto deseado en organismos microbianos huésped. Dichos métodos de simulación y modelado metabólico incluyen, por ejemplo, los sistemas computacionales ilustrados anteriormente como SimPheny® y OptKnock. Para la ilustración de la invención, algunos métodos se describen en el presente documento con referencia al marco de computación OptKnock para modelado y simulación. Los expertos en la técnica sabrán cómo aplicar la identificación, el diseño y la implementación de las alteraciones metabólicas usando OptKnock a cualquiera de estos otros marcos y métodos computacionales de simulación y modelado metabólico ya conocidos en la técnica.

Los métodos descritos anteriormente proporcionarán un conjunto de reacciones metabólicas a interrumpir. La eliminación de cada reacción dentro del conjunto o la modificación metabólica pueden dar como resultado un

producto deseado como producto obligatorio durante la fase de crecimiento del organismo. Debido a que las reacciones son conocidas, una solución al problema de OptKnock binivel 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, realizado a través de la correlación de las reacciones con una base de datos de reacción que tiene una relación entre enzimas y genes codificantes.

Una vez identificado, el conjunto de reacciones que se van a alterar para lograr la producción de un producto deseado se implementa en la célula u organismo diana mediante la alteración funcional de al menos un gen que codifica cada reacción metabólica dentro del conjunto. Un medio particularmente útil para lograr la alteración funcional del conjunto de reacción es mediante la eliminación de cada gen codificante. Sin embargo, en algunos casos, puede ser beneficioso alterar la reacción mediante otras aberraciones genéticas incluyendo, por ejemplo, mutación, delección de regiones reguladoras tales como promotores o sitios de unión a cis para factores reguladores, o mediante el truncamiento de la secuencia codificante en cualquiera de una cantidad de ubicaciones. Estas últimas aberraciones, que dan como resultado una delección menos del total del conjunto de genes, pueden ser útiles, por ejemplo, cuando se desean evaluaciones rápidas del acoplamiento de un producto o cuando es menos probable que se produzca una reversión genética.

Para identificar soluciones productivas adicionales al problema de OptKnock binivel descrito anteriormente que conduzcan a otros conjuntos de reacciones a alterar o modificaciones metabólicas que puedan dar como resultado la biosíntesis, incluyendo la biosíntesis asociada al crecimiento de un producto deseado, puede implementarse un método de optimización, denominado corte de entero. Este método procede resolviendo iterativamente el problema de OptKnock ilustrado anteriormente con la incorporación de una restricción adicional denominada corte de entero en cada iteración. Las restricciones de corte de entero evitan eficazmente que el procedimiento de solución elija exactamente el mismo conjunto de reacciones identificadas en cualquier iteración previa que vincula obligatoriamente la biosíntesis del producto con el crecimiento. Por ejemplo, si una modificación metabólica asociada al crecimiento previamente identificada especifica las reacciones 1, 2 y 3 para la alteración, entonces la siguiente restricción evita que las mismas reacciones se consideren simultáneamente en soluciones posteriores. El método de corte de entero se conoce bien 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 el presente documento con referencia a su uso junto con el marco computacional OptKnock para modelado metabólico y simulación, el método de corte de entero para reducir la redundancia en un análisis computacional iterativo también se puede aplicar con otros marcos computacionales ya conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, SimPheny®.

Los métodos ilustrados en el presente documento permiten la construcción de células y organismos que producen biosintéticamente un producto deseado, incluyendo el acoplamiento obligatorio de la producción de un producto bioquímico diana al crecimiento de la célula u organismo diseñado para albergar las alteraciones genéticas identificadas. Por lo tanto, los métodos computacionales descritos en el presente documento permiten la identificación y la implementación de modificaciones metabólicas que se identifican mediante un método *in silico* seleccionado de OptKnock o SimPheny®. El conjunto de modificaciones metabólicas puede incluir, por ejemplo, la adición de una o más enzimas de la ruta biosintética y/o la alteración funcional de una o más reacciones metabólicas incluyendo, por ejemplo, la alteración por delección génica.

Como se ha analizado anteriormente, la metodología OptKnock se desarrolló sobre la premisa de que las redes microbianas mutantes pueden evolucionar hacia sus fenotipos de crecimiento máximo predichos computacionalmente cuando se someten a largos periodos de selección de crecimiento. En otras palabras, el enfoque aprovecha la capacidad de un organismo para autooptimizarse bajo presiones selectivas. El marco OptKnock permite la enumeración exhaustiva de combinaciones de delección génica que fuerzan un acoplamiento entre la producción bioquímica y el crecimiento celular basándose en la estequiometría de la red. La identificación de las inactivaciones génicas/de reacción óptimas requiere la solución de un problema de optimización binivel que elija el conjunto de reacciones activas de tal forma que una solución de crecimiento óptima para la red resultante produzca en exceso la bioquímica de interés (Burgard et al., Biotechnol. Bioeng. 84:647-657 (2003)).

Se puede emplear un modelo estequiométrico *in silico* del metabolismo de *E. coli* para identificar genes esenciales para rutas metabólicas como se ha ilustrado previamente y se describe, por ejemplo, en las publicaciones de patente de Estados Unidos US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 y US 2004/0009466, y en la Patente de Estados Unidos N.º 7.127.379. Como se describe en el presente documento, el marco matemático OptKnock se puede aplicar para identificar delecciones génicas que conducen a la producción asociada al crecimiento de un producto deseado. Además, la solución del problema de

OptKnock binivel proporciona solamente un conjunto de deleciones. Para enumerar todas las soluciones significativas, es decir, todos los conjuntos de inactivaciones que conducen a la formación de producción asociada al crecimiento, se puede implementar una técnica de optimización, denominada cortes de enteros. Esto implica resolver iterativamente el problema de OptKnock con la incorporación de una restricción adicional denominada corte de enteros en cada iteración, como se ha analizado anteriormente.

EJEMPLO I

Ruta de degradación de adipato inversa

Este ejemplo describe una ruta de la síntesis de adipato ejemplar a través de una ruta de degradación de adipato inversa.

Los organismos tal como *Penicillium chrysogenum* tienen la capacidad de degradar de forma natural el adipato (Thykaer et al., Melab. Eng. 4:151-158. (2002)). El mecanismo es similar a la oxidación de ácidos grasos (véase la figura 1). La primera etapa en la degradación de adipato es una reacción dependiente de ATP que activa el adipato con CoA. La segunda reacción es catalizada por una deshidrogenasa que forma 5-carboxi-2-pentenoil-CoA a partir de adipil-CoA. Durante la degradación del adipato peroxisomal, la enzima deshidrogenasa contiene FAD, que acepta los electrones y luego los transfiere directamente al oxígeno. Una enzima catalasa disipa el H₂O₂ formado por la reducción de oxígeno. En la oxidación de ácidos grasos mitocondriales, el FAD de la deshidrogenasa transfiere electrones directamente a la cadena de transporte de electrones. Una proteína de oxidación de ácidos grasos multifuncional en eucariotas tales como *S. cerevisiae* y *P. chrysogenum* realiza las siguientes etapas de hidratación y deshidrogenasa. La etapa final es una acil transferasa que divide 3-oxoadipil CoA en acetil-CoA y succinil-CoA.

Se consigue una ruta altamente eficiente para la producción de adipato alterando genéticamente un microorganismo de tal forma que se emplean reacciones enzimáticas similares para la síntesis de adipato a partir de succinil-CoA y acetil-CoA (véase la figura 2). La implementación exitosa de esto implica expresar los genes apropiados, adaptar su expresión, y alterar las condiciones de cultivo de manera que las altas proporciones de acetil-CoA, succinil-CoA y/o redox (por ejemplo, NADH/NAD⁺) impulsen el flujo metabólico a través de esta ruta en la dirección de síntesis de adipato en lugar de degradación. Fuertes paralelismos con la formación de butirato en *Clostridia* (Kanehisa y Goto, Nucl. Acids Res. 28:27-30 (2000)) respaldan que cada etapa en la ruta de la síntesis de adipato es termodinámicamente factible con direccionalidad de reacción gobernada por las concentraciones de los metabolitos participantes. La etapa final, que forma adipato a partir de adipil-CoA, puede tener lugar a través de un mecanismo de sintetasa, fosfotransadipilasa/cinasa, transferasa o hidrolasa.

Los rendimientos teóricos máximos de adipato usando esta ruta se calcularon tanto en presencia como en ausencia de un aceptor de electrones externo tal como oxígeno. Estos cálculos muestran que la ruta puede transformar eficientemente la glucosa en adipato y CO₂ en condiciones anaerobias con un rendimiento molar del 92 % (Tabla 1). La producción de adipato usando esta ruta no requiere la captación de oxígeno ya que NAD⁺ se puede regenerar en las dos etapas de hidrogenasa que forman 3-hidroxiadipil-CoA y adipil-CoA (véase la figura 2). Además, la ruta es favorable energéticamente ya que se forman hasta 1,55 moles de ATP por mol de glucosa consumida al máximo rendimiento teórico de adipato, suponiendo un mecanismo sintetasa, fosfotransadipilasa/cinasa o transferasa para la etapa de conversión final. El rendimiento de ATP puede mejorarse aún más a 2,47 moles de ATP producido por mol de glucosa si se supone que la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PPCK) funciona en la dirección de generación de ATP hacia la formación de oxalacetato. A continuación, se realizaron cálculos del rendimiento máximo de ATP suponiendo que la transformación de adipil-CoA en adipato es una etapa de hidrólisis. Esto reduce los rendimientos máximos de ATP en la producción máxima de adipato a 0,85 y 1,77 moles de ATP por mol de glucosa consumida si se supone que PPCK es irreversible y reversible, respectivamente. Sin embargo, estos rendimientos de ATP son suficientes para el crecimiento, el mantenimiento y la producción celular.

Tabla 1: Los rendimientos máximos teóricos de adipato y los rendimientos de ATP asociados por mol de glucosa usando la ruta de degradación inversa suponiendo que la etapa final en la ruta es una sintetasa, fosfotransadipilasa/cinasa o transferasa.

	Aerobias	Anaerobias
Rendimiento del adipato	0,92	0,92
Rendimiento máx. de ATP con respecto al rendimiento máx. de adipato	1,55	1,55
Rendimiento máx. de ATP con respecto al rendimiento máx. de adipato PPCK supuesta	2,47	2,47

Diseñar con éxito esta ruta implica identificar un conjunto apropiado de enzimas con suficiente actividad y

especificidad. Esto implica identificar un conjunto apropiado de enzimas, clonar sus genes correspondientes en un huésped de producción, optimizar las condiciones de fermentación, y ensayar la formación del producto después de la fermentación. Para diseñar un huésped de producción para la producción de adipato, se expresa una o más secuencias de ADN exógeno en un microorganismo huésped adecuado. Además, los microorganismos pueden tener uno o más genes endógenos funcionalmente delecionados. Estas modificaciones permiten la producción de adipato utilizando materia prima renovable.

A continuación se describen varios genes candidatos caracterizados bioquímicamente que codifican enzimas que catalizan cada etapa de la ruta de degradación inversa de adipato en un huésped de producción. Aunque se describe el uso de *E. coli* como organismo huésped para diseñar la ruta, se puede usar esencialmente cualquier organismo huésped adecuado. Específicamente, se enumeran los genes que son nativos de *E. coli*, así como los genes en otros organismos que se pueden aplicar para catalizar las transformaciones apropiadas cuando se clonan y se expresan correctamente.

Haciendo referencia a la figura 2, la etapa 1 implica succinil CoA:acetil CoA acil transferasa (β -cetotiolasa). La primera etapa en la ruta combina acetil-CoA y succinil-CoA para formar 3-oxoadipil-CoA. Los productos génicos codificados por *pcaF* en la cepa B13 de *Pseudomonas* (Kaschabek et al., J. Bacteriol. 184:207-215 (2002)), *phaD* en *Pseudomonas putida* U (Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6419-6424 (1998)), *paaE* en *Pseudomonas fluorescens* ST (Di Gennaro et al., Arch. Microbiol. 188:117-125 (2007)), y *paaJ* de *E. coli* (Nogales et al., Microbiol. 153:357-365 (2007)) catalizan la conversión de 3-oxoadipil-CoA en succinil-CoA y acetil-CoA durante la degradación de compuestos aromáticos tales como fenilacetato o estireno. Dado que las enzimas β -cetotilasas catalizan transformaciones reversibles, estas enzimas pueden emplearse para la primera etapa en la síntesis de adipato que se muestra en la figura 2. Por ejemplo, la cetotiolasa *phaA* de *R. eutropha* combina dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA (Sato et al., J. Biosci. Bioengineer. 103:38-44 (2007)). De forma similar, se ha informado que una β -ceto tiolasa (*bktB*) cataliza la condensación de acetil-CoA y propionil-CoA para formar β -cetovaleril-CoA (Slater et al., J. Bacteriol. 180: 1979-1987 (1998)) en *R. eutropha*. Las secuencias de proteínas para los productos génicos mencionados anteriormente se conocen bien en la técnica y se puede acceder a ellas en las bases de datos públicas tales como GenBank, utilizando los siguientes números de acceso.

Nombre del gen	Acceso al GenBank N.º	Organismo
<i>paaJ</i>	NP_415915.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>pcaF</i>	AAL02407	<i>Pseudomonas knackmussii</i> (B13)
<i>phaD</i>	AAC24332.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaE</i>	ABF82237.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Estas secuencias ejemplares se pueden usar para identificar proteínas homólogas en GenBank u otras bases de datos a través de búsquedas de similitud de secuencias (por ejemplo, BLASTp). Las proteínas homólogas resultantes y sus secuencias génicas correspondientes proporcionan secuencias de ADN exógeno adicionales para la transformación en *E. coli* u otros microorganismos huésped adecuados para generar huéspedes de producción.

Por ejemplo, pueden encontrarse ortólogos de *paaJ* de *Escherichia coli* K12 usando los siguientes números de acceso a GenBank:

YP_001335140.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
YP_001479310.1	<i>Serratia proteamaculans</i>
AAC24332.1	<i>Pseudomonas putida</i>

Pueden encontrarse ortólogos ejemplares de *pcaF* de *Pseudomonas knackmussii* usando los siguientes números de acceso a GenBank:

AAD22035.1	<i>Streptomyces</i> sp. 2065
AAN67000.1	<i>Pseudomonas putida</i>
ABJ15177.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Los genes candidatos nativos adicionales para la etapa de cetotiolasa incluyen *atoB*, que puede catalizar la condensación reversible de 2 moléculas de acetil-CoA (Sato et al., J. Biosci. Bioengineer. 103:38-44 (2007)), y su homólogo *yqeF*. Los candidatos génicos no nativos incluyen *phaA* (Sato et al., anteriormente, 2007) y *bktB* (Slater et al., J. Bacteriol. 180:1979-1987 (1998)) de *R. eutropha*, y las dos cetotilasas, *thiA* y *thiB*, de *Clostridium acetobutylicum* (Winzer et al., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2:531-541 (2000)). Las secuencias de proteínas para

cada uno de estos productos génicos ejemplares se pueden encontrar usando los siguientes números de acceso de GenBank:

<i>atoB</i>	NP_416728.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>yqeF</i>	NP_417321.2	<i>Escherichia coli</i>
<i>phaA</i>	YP_725941	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>bktB</i>	AAC38322.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>thiA</i>	NP_349476.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>thiB</i>	NP_149242.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>

- 5 Haciendo referencia a la figura 2, la etapa 2 implica 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa. La segunda etapa en la ruta implica la reducción de 3-oxoadipil-CoA en 3-hidroxiadipil-CoA. Los productos génicos codificados por *phaC* en *Pseudomonas putida* U (Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6419-6424 (1998)) y *paaC* en *Pseudomonas fluorescens* ST (Di Gennaro et al., Arch. Microbiol. 188:117-125 (2007)) catalizan la reacción inversa, es decir, la oxidación de 3-hidroxiadipil-CoA para formar 3-oxoadipil-CoA, durante el catabolismo de fenilacetato o estireno. Las reacciones catalizadas por dichas deshidrogenasas son reversibles y, por consiguiente, estos genes representan candidatos para realizar la segunda etapa de síntesis de adipato como se muestra en la figura 2. También se realiza una transformación similar por el producto génico de *hbd* en *Clostridium acetobutylicum* (Atsumi et al., Metab. Eng. (epub Sep. 14, 2007); Boynton et al., J. Bacteriol. 178:3015-3024 (1996)). Esta enzima convierte acetoacetil-CoA en 3-hidroxiacil-CoA. Por último, dada la proximidad en *E. coli* de *paaH* a otros genes en el operón de degradación de fenilacetato (Nogales et al., Microbiol. 153:357-365 (2007)) y el hecho de que los mutantes *paaH* no pueden crecer en fenilacetato (Ismail et al., Eur. J. Biochem. 270:3047-3054 (2003)), se espera que el gen de *E. coli paaH* codifique una 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa. Las secuencias de proteínas para cada uno de estos productos génicos ejemplares se pueden encontrar usando los siguientes números de acceso de GenBank:

<i>paaH</i>	NP_415913.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>phaC</i>	NP_745425.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaC</i>	ABF82235.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>hbd</i>	NP_349314.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>

- 20 Haciendo referencia a la figura 2, la etapa 3 implica 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa. El producto génico de *crt* de *C. acetobutylicum* cataliza la deshidratación de 3-hidroxiacil-CoA en crotonil-CoA (véase la figura 2) (Atsumi et al., anteriormente, 2007; Boynton et al., J. Bacteriol. 178:3015-3024 (1996)). Los homólogos de este gen son candidatos fuertes para realizar la tercera etapa en la ruta de síntesis de adipato ilustrada en la figura 2. Además, los genes conocidos para catalizar la hidroxilación de dobles enlaces en compuestos de enoil-CoA representan candidatos adicionales dada la reversibilidad de dichas transformaciones enzimáticas. Por ejemplo, se cree que las enoil-CoA hidratatasas, *phaA* y *phaB*, de *P. putida* realizan la hidroxilación de dobles enlaces durante el catabolismo de fenilacetato (Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6419-6424 (1998)) y, por lo tanto, representan candidatos adicionales para la incorporación en *E. coli*. La delección de estos genes impide la degradación de fenilacetato en *P. putida*. *paaA* y *paaB* de *P. fluorescens* catalizan transformaciones análogas (Olivera et al., anteriormente, 1998). Por último, se ha mostrado que varios genes de *Escherichia coli* demuestran la funcionalidad de enoil-CoA hidratasa que incluye *maoC* (Park y Lee, J. Bacteriol. 185:5391-5397 (2003)), *paaF* (Ismail et al., Eur. J. Biochem. 270:3047-3054 (2003); Park y Lee, Biotechnol. Bioeng. 86:681-686 (2004); Park y Lee, Appl. Biochem. Biotechnol. 113-116:335-346 (2004)), y *paaG* (Ismail et al., anteriormente, 2003; Park y Lee, anteriormente, 2004; Park y Lee, anteriormente, 2004). Las secuencias de proteínas para cada uno de estos productos génicos ejemplares se pueden encontrar usando los siguientes números de acceso de GenBank:

<i>maoC</i>	NP_415905.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaF</i>	NP_415911.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaG</i>	NP_415912.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>crt</i>	NP_349318.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>paaA</i>	NP_743427.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaB</i>	NP_745426.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>phaA</i>	ABF82233.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>phaB</i>	ABF82234.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

- 40 Como alternativa, los genes de β -oxidación son candidatos para las primeras tres etapas en la síntesis de adipato. Los genes candidatos para la ruta de síntesis de adipato propuesta también incluyen los genes de oxidación de ácidos grasos nativos de *E. coli* y sus homólogos en otros organismos. Los genes de *E. coli fadA* y *fadB* codifican un

complejo multienzimático que presenta actividades de cetoacil-CoA tiolasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, y enoil-CoA hidratasa (Yang et al., Biochem. 30:6788-6795 (1991); Yang et al., J. Biol. Chem. 265:10424-10429 (1990); Yang et al., J. Biol. Chem. 266:16255 (1991); Nakahigashi e Inokuchi, Nucl. Acids Res. 18: 4937 (1990)). Estas actividades son mecánicamente similares a las tres primeras transformaciones que se muestran en la figura 2.

- 5 Los genes *fadI* y *fadJ* codifican funciones similares y se expresan naturalmente solo de forma anaerobia (Campbell et al., Mol. Microbiol. 47:793-805 (2003)). Estos productos genéticos funcionan naturalmente para degradar los compuestos grasos de acil-CoA de cadena corta, media y larga en acetil-CoA, en lugar de convertir succinil-CoA y acetil-CoA en 5-carboxi-2-pentenoil-CoA como se propone en la figura 2. Sin embargo, se sabe bien que las enzimas cetoacil-CoA tiolasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y enoil-CoA hidratasa catalizan transformaciones reversibles. Además, la evolución dirigida y los enfoques relacionados se pueden aplicar para adaptar las especificidades del sustrato de la maquinaria de β -oxidación nativa de *E. coli*. Por lo tanto, estas enzimas u homólogos de las mismas se pueden aplicar para la producción de adipato. Si los genes nativos funcionan para degradar el adipato o sus precursores *in vivo*, se realizan las modificaciones genéticas apropiadas para atenuar o eliminar estas funciones. Sin embargo, puede no ser necesario dado que se ha descrito un método para producir poli[(R)-3-hidroxiacil-CoA] en *E. coli* que implica la activación de *fadB*, inactivando un regulador negativo, *fadR*, y coexpresando una cetotiolasa no nativa, *phaA* de *Ralstonia eutropha* (Sato et al., J. Biosci. Bioeng. 103:38-44 (2007)). Este trabajo demostró claramente que una enzima de β -oxidación, en particular el producto génico de *fadB* que codifica tanto la actividad de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa como de enoil-CoA hidratasa, puede funcionar como parte de una ruta para producir moléculas de cadena más larga de precursores acetil-CoA. Las secuencias de proteínas para cada uno de estos productos genéticos ejemplares se pueden encontrar usando los siguientes números de acceso de GenBank:

<i>fadA</i>	YP_026272.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadE</i>	NP_418288.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadI</i>	NP_416844.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadJ</i>	NP_416843.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadR</i>	NP_415705.1	<i>Escherichia coli</i>

- Haciendo referencia a la figura 2, la etapa 4 implica 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa. Mientras que las etapas de cetotiolasa, deshidrogenasa, y enoil-CoA hidratasa son generalmente reversibles, la etapa de enoil-CoA reductasa es casi siempre oxidativa e irreversible en condiciones fisiológicas (Hoffmeister et al., J. Biol. Chem. 280:4329-4338 (2005)). *FadE* cataliza esta posible transformación irreversible en *E. coli* (Campbell y Cronan, J. Bacteriol. 184:3759-3764 (2002)). La ruta requiere una enzima que puede reducir un intermedio 2-enoil-CoA, no uno tal como *FadE* que solamente oxidará un acil-CoA en un compuesto 2-enoil-CoA. Además, aunque se ha sugerido que *E. coli* posee de forma natural enzimas para la reducción de enoil-CoA (Mizugaki et al., J. Biochem. 92:1649-1654 (1982); Nishimaki et al., J. Biochem. 95:1315-1321 (1984)), no se ha caracterizado bioquímicamente ningún gen de *E. coli* que posea esta función.

- Un gen candidato para la etapa de enoil-CoA reductasa es el producto génico de *bcd* de *C. acetobutylicum* (Atsumi et al., anteriormente, 2007; Boynton et al., J. Bacteriol. 178:3015-3024 (1996)), que cataliza naturalmente la reducción de crotonil-CoA en butiril-CoA, una reacción similar en el mecanismo a la reducción deseada de 5-carboxi-2-pentenoil-CoA en adipil-CoA en la ruta de síntesis de adipato. La actividad de esta enzima se puede potenciar mediante la expresión de *bcd* junto con la expresión de los genes de *C. acetobutylicum* *effAB*, *C.* que codifican una flavoproteína de transferencia de electrones. Un candidato adicional para la etapa de enoil-CoA reductasa es la enoil-CoA reductasa mitocondrial de *E. gracilis* (Hoffmeister et al., J. Biol. Chem. 280:4329-4338 (2005)). Una construcción derivada de esta secuencia después de la eliminación de su secuencia líder de direccionamiento mitocondrial se clonó en *E. coli*, dando como resultado una enzima activa (Hoffmeister et al., anteriormente, 2005). Este enfoque se conoce bien por los expertos en la técnica para la expresión de genes eucariotas, particularmente aquellos con secuencias líder que pueden dirigir el producto génico a un compartimento intracelular específico, en organismos procariontes. Un homólogo cercano de este gen, TDE0597, del procarionte *Treponema denticola* representa una tercera enoil-CoA reductasa que se ha clonado y expresado en *E. coli* (Tucci y Martin, FEBS Lett. 581:1561-1566 (2007)). Las secuencias de proteínas para cada uno de estos productos genéticos ejemplares se pueden encontrar usando los siguientes números de acceso de GenBank:

<i>bcd</i>	NP_349317.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>effA</i>	NP_349315.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>effB</i>	NP_349316.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
TER	Q5EU90.1	<i>Euglena gracilis</i>
TDE0597	NP_971211.1	<i>Treponema denticola</i>

Haciendo referencia a la figura 2, la etapa 5 implica adipil-CoA sintetasa (también denominada adipato-CoA ligasa), fosfotransadipilasa/adipato cinasa, adipil-CoA:acetil-CoA transferasa, o adipil-CoA hidrolasa. Desde un punto de vista energético, es deseable que la etapa final en la ruta de síntesis de adipato sea catalizada por una enzima o par
 5 de enzimas que pueda conservar el equivalente de ATP almacenado en el enlace tioéster de adipil-CoA. El producto de los genes *sucC* y *sucD* de *E. coli*, u homólogos de los mismos, puede catalizar potencialmente la transformación final que se muestra en la figura 2 si presentan actividad en adipil-CoA. Los genes *sucCD* forman naturalmente un complejo de succinil-CoA sintetasa que cataliza la formación de succinil-CoA a partir del succinato con el consumo concomitante de ATP, una reacción que es reversible *in vivo* (Buck et al., Biochem. 24:6245-6252 (1985)). Dada la
 10 similitud estructural entre succinato y adipato, es decir, ambos son ácidos dicarboxílicos de cadena lineal, es razonable esperar alguna actividad de la enzima *sucCD* en adipil-CoA. Una enzima que presenta actividad adipil-CoA ligasa puede realizar de forma equivalente la producción que genera ATP de adipato a partir de adipil-CoA, usando aquí AMP y PPi como cofactores, al funcionar en la dirección fisiológica opuesta como se representa en la figura 1. Las CoA-ligasas ejemplares incluyen la dicarboxilato-CoA ligasa de rata, para la cual la secuencia aún no
 15 está caracterizada (Vamecq et al., Biochem. J. 230:683-693 (1985)), cualquiera de las dos fenilacetato-CoA ligasas caracterizadas de *P. chrysogenum* (Lamas-Maceiras et al., Biochem. J. 395, 147-155 (2005); Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 360:453-458 (2007)), la fenilacetato-CoA ligasa de *Pseudomonas putida* (Martinez-Blanco et al., J. Biol. Chem. 265:7084-7090 (1990)), y la 6-carboxihexanoato-CoA ligasa de *Bacillus subtilis* (Bower et al., J. Bacteriol. 178:4122-4130 (1996)). Las secuencias de proteínas para cada uno de estos productos génicos
 20 ejemplares se pueden encontrar usando los siguientes números de acceso de GenBank:

<i>sucC</i>	NP_415256.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>sucD</i>	AAC73823.1	<i>Escherichia coli</i>

Otra opción, usando fosfotransadipilasa/adipato cinasa, es catalizada por los productos génicos de *buk1*, *buk2*, y *ptb* de *C. acetobutylicum* (Walter et al., Gene 134:107-111 (1993); Huang et al., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2:33-38
 25 (2000)), u homólogos de los mismos. El gen *ptb* codifica una enzima que puede convertir butiril-CoA en butiril-fosfato, que luego se convierte en butirato a través de cualquiera de los productos génicos de *buk* con la generación concomitante de ATP. El conjunto análogo de transformaciones, es decir, la conversión de adipil-CoA en adipil-fosfato seguido de la conversión de adipil-fosfato en adipato, puede realizarse mediante los productos génicos de *buk1*, *buk2* y *ptb*. Las secuencias de proteínas para cada uno de estos productos génicos ejemplares se pueden
 30 encontrar usando los siguientes números de acceso de GenBank:

<i>ptb</i>	NP_349676	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>buk1</i>	NP_349675	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>buk2</i>	Q97111	<i>Clostridium acetobutylicum</i>

Como alternativa, se puede aplicar una acetiltransferasa capaz de transferir el grupo CoA de adipil-CoA a acetato. Las transformaciones similares son catalizadas por los productos génicos de *cat1*, *cat2* y *cat3* de *Clostridium kluyveri*
 35 que han mostrado actividad de succinil-CoA, 4-hidroxi-butil-CoA, y butiril-CoA acetiltransferasa, respectivamente (Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996); Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:2128-2133 (2008)). Las secuencias de proteínas para cada uno de estos productos génicos ejemplares se pueden encontrar usando los siguientes números de acceso de GenBank:

<i>cat1</i>	P38946.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>cat2</i>	P38942.2	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>cat3</i>	EDK35586.1	<i>Clostridium kluyveri</i>

40 Finalmente, aunque no es deseable desde un punto de vista energético, la conversión de adipil-CoA en adipato también puede realizarse mediante una acil-CoA hidrolasa o una tioesterasa equivalente. El candidato del gen de *E. coli* superior es *tesB* (Naggert et al., J. Biol. Chem. 266:11044-11050 (1991)), que muestra una alta similitud con la *acot8* humana, que es una acetiltransferasa de ácido dicarboxílico con actividad en adipil-CoA (Westin et al., J. Biol. Chem. 280:38125-38132 (2005)). Esta actividad también se ha caracterizado en el hígado de rata (Deana, Biochem. Int. 26:767-773 (1992)). Las secuencias de proteínas para cada uno de estos productos génicos ejemplares se
 45 pueden encontrar usando los siguientes números de acceso de GenBank:

<i>tesB</i>	NP_414986	<i>Escherichia coli</i>
<i>acot8</i>	CAA15502	<i>Homo sapiens</i>
<i>acot8</i>	NP_570112	<i>Rattus norvegicus</i>

Otros genes candidatos nativos incluyen *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)), *paal* (Song et al., J. Biol. Chem. 281:11028-11038 (2006)), e *ybdB* (Leduc et al., J. Bacteriol. 189:7112-7126 (2007)). Las 5 secuencias de proteínas para cada uno de estos productos génicos ejemplares se pueden encontrar usando los siguientes números de acceso de GenBank:

<i>tesA</i>	NP_415027	<i>Escherichia coli</i>
<i>ybgC</i>	NP_415264	<i>Escherichia coli</i>
<i>paal</i>	NP_415914	<i>Escherichia coli</i>
<i>ybdB</i>	NP_415129	<i>Escherichia coli</i>

La descripción anterior proporciona una ruta de síntesis de adipato por medio de una ruta de degradación de adipato 10 inversa.

EJEMPLO II

Preparación de un organismo microbiano productor de adipato que tiene una ruta de degradación inversa

15 Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir adipato usando la ruta de degradación inversa.

Se usa *Escherichia coli* como un organismo diana para diseñar una ruta de degradación de adipato inversa como se 20 muestra en la figura 2. *E. coli* proporciona un buen huésped para generar un microorganismo de origen sintético capaz de producir adipato. *E. coli* es susceptible de manipulación genética y se sabe que es capaz de producir diversos productos, como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, eficazmente en condiciones anaerobias o microaerobias.

25 Para generar una cepa de *E. coli* diseñada para producir adipato, los ácidos nucleicos que codifican las enzimas utilizadas en la ruta de degradación inversa se expresan en *E. coli* usando técnicas de biología molecular bien conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook, anteriormente, 2001; Ausubel anteriormente, 1999). En particular, los genes *paaJ* (NP_415915.1), *paaH* (NP_415913.1), y *maoC* (NP_415905.1) que codifican las actividades de succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, y 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, 30 respectivamente, se clonan en el vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el promotor PA1/lacO. Además, los genes *bcd* (NP_349317.1), *ettAB* (349315.1 y 349316.1), y *sucCD* (NP_415256.1 y AAC73823.1) que codifican las actividades de 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa y adipil-CoA sintetasa, respectivamente, se clonan en el vector pZA33 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el promotor PA1/lacO. Los dos conjuntos de plásmidos se transforman en la cepa MG1655 de *E. coli* para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la síntesis de 35 adipato a través de la ruta de degradación inversa.

El organismo genéticamente modificado resultante se cultiva en medio que contiene glucosa siguiendo procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., anteriormente, 2001). La expresión de genes de la ruta de degradación inversa se corrobora usando métodos bien conocidos en la técnica 40 para determinar la expresión de polipéptidos o la actividad enzimática, incluyendo, por ejemplo, transferencias Northern, amplificación por PCR de ARNm, inmunotransferencia y similares. Las actividades enzimáticas de las enzimas expresadas se confirman usando ensayos específicos para las actividades individuales. La capacidad de la cepa de *E. coli* modificada para producir adipato se confirma usando HPLC, cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS), y/o cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS).

45 Las cepas microbianas diseñadas para tener una ruta de síntesis de adipato funcional se aumentan adicionalmente mediante la optimización para la utilización eficiente de la ruta. Brevemente, se evalúa la cepa diseñada para determinar si alguno de los genes exógenos se expresa a un nivel limitante de la velocidad. La expresión se aumenta para cualquier enzima expresada a niveles bajos que pueda limitar el flujo a través de la ruta, por ejemplo, 50 mediante la introducción de números adicionales de copias génicas.

Para generar mejores productores, se puede utilizar un modelo metabólico para optimizar las condiciones de crecimiento. El modelado también se usa para diseñar inactivaciones génicas que optimizan adicionalmente la utilización de la ruta (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos US 2002/0012939, US 55 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 y US 2004/0009466, y

la Patente de Estados Unidos N.º 7.127.379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos sobre el crecimiento celular de cambiar el metabolismo hacia una producción más eficiente de adipato. Un método de modelado es el enfoque de optimización binivel, OptKnock (Burgard et al., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar inactivaciones génicas que colectivamente dan como resultado una mejor producción de adipato. La evolución adaptativa también puede usarse para generar mejores productores de, por ejemplo, los intermedios acetil-CoA y succinil-CoA o el producto adipato. La evolución adaptativa se realiza para mejorar las características de crecimiento y producción (Fong y Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et al., *Science* 314:1565-1568 (2006)). Basándose en los resultados, las rondas posteriores de modelado, ingeniería genética y evolución adaptativa se pueden aplicar al productor de adipato para aumentar aún más la producción.

10

Para la producción a gran escala de adipato, el organismo que contiene la ruta de degradación inversa anterior se cultiva en un fermentador usando un medio conocido en la técnica para soportar el crecimiento del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan de forma discontinua, discontinua alimentada o continua. Las condiciones anaerobias se mantienen burbujeando primero el medio con nitrógeno y luego sellando el recipiente de cultivo, por ejemplo, los matraces pueden sellarse con un tapón y una tapa de rosca. También se pueden utilizar condiciones microaerobias proporcionando un pequeño orificio en el tapón para una aireación limitada. El pH del medio se mantiene a un pH de aproximadamente 7 mediante la adición de un ácido, como H₂SO₄. La velocidad de crecimiento se determina midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (600 nm), y la tasa de captación de glucosa controlando el agotamiento de la fuente de carbono a lo largo del tiempo. Los subproductos tales como alcoholes no deseados, ácidos orgánicos y glucosa residual, se pueden cuantificar por HPLC (Shimadzu, Columbia MD), por ejemplo, usando una serie Aminex® de columnas de HPLC (por ejemplo, HPX-87 series) (BioRad, Hercules CA), usando un detector de índice de refracción para glucosa y alcoholes, y un detector de UV para ácidos orgánicos (Lin et al., *Biotechnol. Bioeng.* 775-779 (2005)).

25 Este ejemplo describe la preparación de un organismo microbiano productor de adipato que usa una ruta de degradación inversa.

EJEMPLO III

30 Síntesis de adipato a través de 3-oxoadipato

Este ejemplo describe una ruta de síntesis de adipato ejemplar a través de 3-oxoadipato.

Se muestra una ruta adicional a la descrita en los Ejemplos I y II que usa acetil-CoA y succinil-CoA como precursores para la formación de adipato y pasa a través del intermedio metabólico, 3-oxoadipato, en la figura 3. Las dos transformaciones iniciales en esta ruta son las dos etapas terminales de la ruta de degradación para compuestos aromáticos y cloroaromáticos que funcionan en la dirección inversa (Kaschabek et al., *J. Bacteriol.* 184:207-215 (2002); Nogales et al., *Microbiol.* 153:357-365 (2007); Ismail et al., *Eur. J. Biochem.* 270:3047-3054 (2003)). Específicamente, la primera etapa forma 3-oxoadipil CoA por la condensación de succinil- y acetil-CoA. La segunda etapa forma 3-oxoadipato y se indica como en la cepa de *Pseudomonas* sp. B 13 (Kaschabek et al., *J. Bacteriol.* 184:207-215 (2002)).

Las etapas posteriores implican la reducción de 3-oxoadipato en 3-hidroxi-adipato (conversión de un grupo ceto en grupo hidroxilo), la deshidratación de 3-hidroxiadipato para producir hexa-2-enodioato, y la reducción de hexa-2-enodioato para formar adipato. Estas etapas de la ruta son análogas a la conversión de oxalacetato en succinato a través del ciclo de TCA reductivo (véase la figura 4). Esto respalda las etapas en la ruta que son termodinámicamente favorables sujetas a la presencia de concentraciones apropiadas de metabolitos. La etapa final de reducción se puede realizar bioquímicamente o empleando un catalizador químico para convertir el hexa-2-enodioato en adipato. La hidrogenación química puede realizarse utilizando un catalizador de Pt sobre carbono activado como se ha descrito en (Niu et al., *Biotechnol. Prog.* 18:201-211 (2002)).

El máximo rendimiento teórico de adipato usando esta ruta es 0,92 moles por mol de glucosa consumida, y no se requiere oxígeno para alcanzar estos rendimientos (véase la Tabla 2). Los energéticos asociados son idénticos a los de la ruta de adipato inversa. Teóricamente, se observa una formación de ATP de hasta 1,55 moles por mol de glucosa utilizada a través de esta ruta. El rendimiento de ATP mejora a aproximadamente 2,47 moles si se supone que la fosfoenolpiruvato cinasa (PFCK) funciona en la dirección de la generación de ATP. Curiosamente, el rendimiento del producto puede aumentarse aún más a 1 mol de adipato por mol de glucosa consumida si se utiliza la hidrogenación química para la última etapa y se asume una eficacia del 100% de la catálisis. En este escenario, se forman teóricamente hasta 1,95 moles de ATP sin asumir la funcionalidad inversa de PFCK.

Tabla 2: Los rendimientos teóricos máximos de adipato y los rendimientos de ATP asociados por mol de glucosa usando la ruta de 3-oxoadipato.

	Etapa final enzimática		Etapa final de hidrogenación química	
	Aerobias	Anaerobias	Aerobias	Anaerobias
Rendimiento del adipato	0,92	0,92	1,00	1,00
Rendimiento máx. de ATP con respecto al rendimiento máx. de adipato	1,55	1,55	1,95	1,95

- 5 Diseñar con éxito esta ruta implica identificar un conjunto apropiado de enzimas con suficiente actividad y especificidad. Esto implica identificar un conjunto apropiado de enzimas, clonar sus genes correspondientes en un huésped de producción, optimizar las condiciones de fermentación, y ensayar la formación del producto después de la fermentación. Para diseñar un huésped de producción para la producción de adipato, se puede expresar una o más secuencias de ADN exógeno en un microorganismo huésped. Además, el microorganismo huésped puede tener uno o más genes endógenos funcionalmente delecionados. Estas modificaciones permiten la producción de adipato utilizando materia prima renovable.

A continuación se describen varios genes candidatos caracterizados bioquímicamente capaces de codificar enzimas que catalizan cada etapa de la ruta 3-oxoadipato para la síntesis de adipato. Aunque este método se describe para *E. coli*, un experto en la técnica puede aplicar estas enseñanzas a cualquier otro organismo huésped adecuado. Específicamente, se enumeran a continuación los genes que son nativos de *E. coli*, así como los genes en otros organismos que se pueden aplicar para catalizar las transformaciones apropiadas cuando se clonan y se expresan correctamente.

- 20 Haciendo referencia a la figura 3, la etapa 1 implica succinil CoA:acetil CoA acil transferasa (β -cetotiolasa). La primera etapa en la ruta combina acetil-CoA y succinil-CoA para formar 3-oxoadipil-CoA. Los productos génicos codificados por *pcaF* en la cepa de *Pseudomonas* B 13 (Kaschabek et al., J. Bacteriol. 184:207-215 (2002)), *phaD* en *Pseudomonas putida* U (Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6419-6424 (1998)), *paaE* en *Pseudomonas fluorescens* ST (Di Gennaro et al., Arch. Microbiol. 188:117-125 (2007)), y *paaJ* de *E. coli* (Nogales et al., Microbiol. 153:357-365 (2007)) catalizan la conversión de 3-oxoadipil-CoA en succinil-CoA y acetil-CoA durante la degradación de compuestos aromáticos tales como fenilacetato o estireno. Dado que las enzimas β -cetotilasas catalizan transformaciones reversibles, estas enzimas pueden emplearse para la primera etapa en la síntesis de adipato que se muestra en la figura 3. Por ejemplo, la cetotiolasa *phaA* de *R. eutropha* combina dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA (Sato et al., J. Biosci. Bioengineer. 103:38-44 (2007)). De forma similar, se ha informado que una β -ceto tiolasa (*bktB*) cataliza la condensación de acetil-CoA y propionil-CoA para formar β -cetovaleril-CoA (Slater et al., J. Bacteriol. 180:1979-1987 (1998)) en *R. eutropha*. Las secuencias de proteínas para los productos génicos mencionados anteriormente se conocen bien en la técnica y se puede acceder a ellas en las bases de datos públicas tales como GenBank, utilizando los siguientes números de acceso.

Nombre del gen	Acceso al GenBank N.º	Organismo
<i>paaJ</i>	NP_415915.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>pcaF</i>	AAL02407	<i>Pseudomonas knackmussii</i> (B13)
<i>phaD</i>	AAC24332.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaE</i>	ABF82237.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

- 35 Estas secuencias se pueden usar para identificar proteínas homólogas en GenBank u otras bases de datos a través de búsquedas de similitud de secuencias, por ejemplo, BLASTp. Las proteínas homólogas resultantes y sus secuencias génicas correspondientes proporcionan secuencias de ADN exógeno adicionales para la transformación en *E. coli* u otros microorganismos para generar huéspedes de producción.

40 Por ejemplo, pueden encontrarse ortólogos de *paaJ* de *Escherichia coli* K12 usando los siguientes números de acceso a GenBank:

YP_001335140.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
YP_001479310.1	<i>Serratia proteamaculans</i>
AAC24332.1	<i>Pseudomonas putida</i>

- 45 Pueden encontrarse ortólogos ejemplares de *pcaF* de *Pseudomonas knackmussii* usando los siguientes números de

acceso a GenBank:

AAD22035.1	<i>Streptomyces</i> sp. 2065
AAN67000.1	<i>Pseudomonas putida</i>
ABJ15177.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Los genes candidatos nativos adicionales para la etapa de cetotiolasa incluyen *atoB*, que puede catalizar la condensación reversible de 2 moléculas de acetyl-CoA (Sato et al., J. Biosci. Bioengineer. 103:38-44 (2007)), y su homólogo *yqeF*. Los candidatos génicos no nativos incluyen *phaA* (Sato et al., anteriormente, 2007) y *bktB* (Slater et al., J. Bacteriol. 180:1979-1987 (1998)) de *R. eutropha*, y las dos cetotiolasas, *thiA* y *thiB*, de *Clostridium acetobutylicum* (Winzer et al., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2:531-541 (2000)). Las secuencias de proteínas para cada uno de estos productos génicos ejemplares se pueden encontrar usando los siguientes números de acceso de GenBank:

<i>atoB</i>	NP_416728.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>yqeF</i>	NP_417321.2	<i>Escherichia coli</i>
<i>phaA</i>	YP_725941	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>bldB</i>	AAC38322.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>thiA</i>	NP_349476.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>thiB</i>	NP_149242.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>

Es menos deseable usar los genes que codifican tiolasas, *fadA* y *fadB*, genes en la ruta de degradación de ácidos grasos en *E. coli*, en esta ruta ejemplar. Estos genes forman un complejo que codifica múltiples actividades, la mayoría de las cuales no son deseadas en esta ruta.

Haciendo referencia a la figura 3, la etapa 2 implica 3-oxoadipil-CoA transferasa. En esta etapa, el 3-oxoadipato se forma por la transferencia del grupo CoA de 3-oxoadipil-CoA a succinato. Esta actividad se indica en una enzima de dos unidades codificada por *pcaI* y *pcaJ* en *Pseudomonas* (Kaschabek et al., J. Bacteriol. 184:207-215 (2002)). Esta enzima cataliza una transformación reversible. Las secuencias de proteínas de productos génicos ejemplares para la subunidad A de este complejo pueden encontrarse usando los siguientes números de acceso a GenBank:

<i>pcaI</i>	AAN69545.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>pcaI</i>	YP_046368.1	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1
<i>pcaI</i>	NP_630776.1	<i>Streptomyces coelicolor</i>

Las secuencias de proteínas de productos génicos ejemplares para la subunidad B de este complejo pueden encontrarse usando los siguientes números de acceso a GenBank:

<i>pcaJ</i>	NP_746082.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>pcaJ</i>	NP_630775.1	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>pcaJ</i>	AAC37147.1	<i>Acinetobacter</i> sp, ADP1

Haciendo referencia a la figura 3, la etapa 3 implica 3-oxoadipato reductasa. *E. coli* tiene varias alcohol deshidrogenasas candidatas; dos que tienen funciones análogas son la malato deshidrogenasa (*mdh*) y la lactato deshidrogenasa (*ldhA*). Si bien no se ha demostrado que estas dos enzimas tengan amplias especificidades de sustrato en *E. coli*, se ha demostrado que la lactato deshidrogenasa de *Ralstonia eutropha* demuestra altas actividades en sustratos de diversas longitudes de cadena tal como lactato, 2-oxobutirato, 2-oxopentanoato y 2-oxoglutarato (Steinbuechel y Schlegel, Eur. J. Biochem. 130:329-334 (1983)). Un candidato de enzima no nativa adicional para esta etapa es la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa mitocondrial (*bdh*) del corazón humano que se ha clonado y caracterizado (Marks et al., J. Biol. Chem. 267:15459-15463 (1992)). Esta enzima es particularmente interesante porque es una deshidrogenasa que opera con un 3-hidroxiácido. Dado que las deshidrogenasas son típicamente reversibles, se espera que este producto génico, o un homólogo del mismo, sea capaz de reducir un 3-oxoácido, por ejemplo, 3-oxoadipato, en el 3-hidroxiácido correspondiente, por ejemplo, 3-hidroxiacil-CoA. Las secuencias de proteínas para cada uno de estos productos génicos ejemplares se pueden encontrar usando los siguientes números de acceso de GenBank:

<i>mdh</i>	AAC76268.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>ldhA</i>	NP_415898.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>ldh</i>	YP_725182.1	<i>Ralstonia eutropha</i>

bdh AAA58352.1 *Homo sapiens*

Haciendo referencia a la figura 3, la etapa 4 implica 3-hidroxiadipato deshidratasa. En esta reacción, 3-hidroxiadipato se deshidrata en hexa-2-enodioato. Aunque no se han identificado pruebas directas para esta transformación enzimática, la mayoría de las deshidratatas catalizan la eliminación α , β del agua. Esto implica la activación del α -hidrógeno por un grupo carbonilo, carboxilato o CoA-tioléster aceptor de electrones, y la eliminación del grupo hidroxilo de la posición β (Martins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:15645-15649 (2004); Buckel y Golding, FEMS Microbiol. Rev. 22:523-541 (1998)). Las secuencias de proteínas para productos génicos ejemplares pueden encontrarse usando los siguientes números de acceso a GenBank:

<i>acnA</i>	P25516.3	<i>Escherichia coli</i>
<i>fumB</i>	P14407.2	<i>Escherichia coli</i>
<i>ilvD</i>	AAA24013.1	<i>Escherichia coli</i>

10

Otros buenos candidatos para llevar a cabo esta función son las serina deshidratatas. Estas enzimas catalizan una transformación muy similar en la eliminación de amoniaco de serina según se requiere en esta etapa de deshidratación. La secuencia de proteínas para el producto génico ejemplar puede encontrarse usando el siguiente número de acceso a GenBank:

15

dsdA P00926 *Escherichia coli*

También se han identificado candidatos genéticos no nativos para esta transformación. Por ejemplo, se demostró que la L-serina deshidratasa de subunidades múltiples de *Peptostreptococcus asaccharolyticus* complementa una cepa de *E. coli* deficiente en actividad de L-serina deshidratasa (Hofmeister et al., J. Bacteriol. 179:4937-4941 (1997)). Además, una supuesta 2-(hidroximetil)glutarato deshidratasa, codificada por el gen *hmd* en *Eubacterium barkeri* muestra similitud con ambas subunidades α y β de serina deshidratatas bacterianas que contienen [4Fe-4S] (Alhapel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:12341-12346 (2006)). La secuencia de proteínas para el producto génico ejemplar puede encontrarse usando el siguiente número de acceso a GenBank:

25

hmd ABC88407.1 *Eubacterium barkeri*

Haciendo referencia a la figura 3, la etapa 5 implica 2-enoato reductasa. La etapa final en la ruta de 3-oxoadipato es la reducción del doble enlace en hexa-3-enodioato para formar adipato. Bioquímicamente, esta transformación puede ser catalizada por 2-enoato reductasa (EC 1.3.1.31) conocida por catalizar la reducción dependiente de NADH de una amplia diversidad de ácidos carboxílicos α , β -insaturados y aldehídos (Rohdich et al., J. Biol. Chem. 276:5779-5787 (2001)). Esta enzima se codifica por *enr* en varias especies de *Clostridia* (Giesel y Simon, Arch. Microbiol. 135:51-57 (1983)) incluyendo *C. tyrobutyricum* y *C. thermoaceticum* (ahora denominada *Moorella thermoaceticum*) (Rohdich, et al., J. Biol. Chem. 276:5779-5787 (2001)). En la secuencia genómica recientemente publicada de *C. kluyveri*, se han indicado 9 secuencias codificantes para enoato reductasas, una de las cuales se ha caracterizado (Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:2128-2133 (2008)). Los genes *enr* tanto de *C. tyrobutyricum* como de *C. thermoaceticum* se han clonado y secuenciado y muestran un 59% de identidad entre sí. También se encontró que el primer gen tiene aproximadamente un 75% de similitud con el gen caracterizado en *C. kluyveri* (Giesel y Simon, Arch. Microbiol. 135:51-57 (1983)). Se ha informado en base a estos resultados de secuencia que *enr* es muy similar a la dienol CoA reductasa en *E. coli* (*fadH*) (Rohdich et al., J. Biol. Chem. 276:5779-5787 (2001)). Por lo tanto, existen varios genes candidatos para catalizar esta última etapa en la ruta de 3-oxoadipato y se han enumerado a continuación. El gen de *C. thermoaceticum* *enr* también se ha expresado en una forma enzimáticamente activa en *E. coli* (Rohdich et al., anteriormente, 2001). Las secuencias de proteínas para productos génicos ejemplares pueden encontrarse usando los siguientes números de acceso a GenBank:

<i>fadH</i>	NP_417552.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>enr</i>	ACA54153.1	<i>Clostridium botulinum</i> A3 str
<i>enr</i>	CAA71086.1	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>
<i>enr</i>	CAA76083.1	<i>Clostridium kluyveri</i>

45 La descripción anterior proporciona una ruta de síntesis de adipato ejemplar por medio de una ruta de 3-oxoadipato.

EJEMPLO IV

Preparación de un organismo microbiano productor de adipato que tiene una ruta de 3-oxoadipato

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir adipato usando la ruta de 3-oxiadipato.

5 Se usa *Escherichia coli* como un organismo diana para diseñar una ruta de 3-oxiadipato como se muestra en la figura 3. *E. coli* proporciona un buen huésped para generar un microorganismo de origen sintético capaz de producir adipato. *E. coli* es susceptible de manipulación genética y se sabe que es capaz de producir diversos productos, como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, eficazmente en condiciones anaerobias o microaerobias.

10

Para generar una cepa de *E. coli* diseñada para producir adipato, los ácidos nucleicos que codifican las enzimas utilizadas en la ruta de 3-oxiadipato se expresan en *E. coli* usando técnicas de biología molecular bien conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook, anteriormente, 2001; Ausubel anteriormente, 1999). En particular, los genes *paaJ* (NP_415915.1), *pcaJ* (AAN69545.1 y NP_746082.1), y *bdh* (AAA58352.1) que codifican las actividades de succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-oxoadipil-CoA transferasa, y 3-oxoadipato reductasa, respectivamente, se clonan en el vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el promotor PA1/lacO. Además, los genes *acnA* (P25516.3) y *enr* (ACA54153.1) que codifican actividades de 3-hidroxiadipato deshidratasa y 2-enoato reductasa, respectivamente, se clonan en el vector pZA33 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el promotor PA1/lacO. Los dos conjuntos de plásmidos se transforman en la cepa MG1655 de *E. coli* para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la síntesis de adipato a través de la ruta de 3-oxoadipato.

El organismo genéticamente modificado resultante se cultiva en medio que contiene glucosa siguiendo procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., anteriormente, 2001). La expresión de genes de la ruta de 3-oxoadipato para la síntesis de adipato se corrobora usando métodos bien conocidos en la técnica para determinar la expresión de polipéptidos o la actividad enzimática, incluyendo, por ejemplo, transferencias Northern, amplificación por PCR de ARNm, inmunotransferencia y similares. Las actividades enzimáticas de las enzimas expresadas se confirman usando ensayos específicos para las actividades individuales. La capacidad de la cepa de *E. coli* modificada para producir adipato se confirma usando HPLC, cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS), y/o cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS).

30

Las cepas microbianas diseñadas para tener una ruta de síntesis de adipato funcional se aumentan adicionalmente mediante la optimización para la utilización eficiente de la ruta. Brevemente, se evalúa la cepa diseñada para determinar si alguno de los genes exógenos se expresa a un nivel limitante de la velocidad. La expresión se aumenta para cualquier enzima expresada a niveles bajos que pueda limitar el flujo a través de la ruta, por ejemplo, mediante la introducción de números adicionales de copias génicas.

35

Para generar mejores productores, se puede utilizar un modelo metabólico para optimizar las condiciones de crecimiento. El modelado también se usa para diseñar inactivaciones génicas que optimizan adicionalmente la utilización de la ruta (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 y US 2004/0009466, y la Patente de Estados Unidos N.º 7.127.379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos sobre el crecimiento celular de cambiar el metabolismo hacia una producción más eficiente de adipato. Un método de modelado es el enfoque de optimización binivel, OptKnock (Burgard et al., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar inactivaciones génicas que colectivamente dan como resultado una mejor producción de adipato. La evolución adaptativa también puede usarse para generar mejores productores de, por ejemplo, los intermedios acetil-CoA y succinil-CoA o el producto adipato. La evolución adaptativa se realiza para mejorar las características de crecimiento y producción (Fong y Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et al., *Science* 314:1565-1568 (2006)). Basándose en los resultados, las rondas posteriores de modelado, ingeniería genética y evolución adaptativa se pueden aplicar al productor de adipato para aumentar aún más la producción.

50

Para la producción a gran escala de adipato, el organismo que contiene la ruta de 3-oxoadipato se cultiva en un fermentador usando un medio conocido en la técnica para soportar el crecimiento del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan de forma discontinua, discontinua alimentada o continua. Las condiciones anaerobias se mantienen burbujeando primero el medio con nitrógeno y luego sellando el recipiente de cultivo, por ejemplo, los matraces pueden sellarse con un tapón y una tapa de rosca. También se pueden utilizar condiciones microaerobias proporcionando un pequeño orificio en el tapón para una aireación limitada. El pH del medio se mantiene a un pH de aproximadamente 7 mediante la adición de un ácido, como H₂SO₄. La velocidad de crecimiento se determina midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (600 nm), y la tasa de captación de glucosa controlando el agotamiento de la fuente de carbono a lo largo del tiempo. Los subproductos tales como

55

alcoholes no deseados, ácidos orgánicos y glucosa residual, se pueden cuantificar por HPLC (Shimadzu), por ejemplo, usando una serie Aminex® de columnas de HPLC (por ejemplo, HPX-87 series) (BioRad), usando un detector de índice de refracción para glucosa y alcoholes, y un detector de UV para ácidos orgánicos (Lin et al., *Biotechnol. Bioeng.* 775-779 (2005)).

5

Este ejemplo describe la preparación de un organismo microbiano producto de adipato que contiene una ruta de 3-oxoadipato.

EJEMPLO V

10

Síntesis de adipato a través de ácido cis,cis-mucónico

Este ejemplo describe una ruta de la síntesis de adipato descrita previamente (véase Niu et al., *Biotechnol. Prog.* 18(2): pág. 201-11. 2002; Frost et al., Patente de Estados Unidos N.º 5.487.987, expedida el 30 de enero de 1996).

15

Se ha descrito previamente la síntesis de adipato a través de un proceso combinado de conversión biológica y química. (Niu et al., *Biotechnol. Prog.* 18:201-211 (2002)) y se muestra en la figura 5. Este método se describe además en la Patente de Estados Unidos N.º 5.487.987. La síntesis de adipato a través de esta ruta implica la introducción de tres genes heterólogos en *E. coli* que pueden convertir el deshidroshikimato en ácido cis,cis-mucónico (Niu et al., anteriormente, 2002). Una última etapa de hidrogenación química conduce a la formación de ácido adípico. En esta etapa, el caldo de fermentación pretratado que contenía cis,cis-muconato 150 mM se mezcló con platino al 10% (Pt) sobre carbono activado. La reacción de hidrogenación se realizó a 3400 KPa de presión de hidrógeno durante dos horas y media a 250 °C con agitación. Los rendimientos de adipato calculados se muestran en la Tabla 3, suponiendo que se utiliza una etapa de catálisis enzimática o química para convertir cis,cis-muconato en adipato. En condiciones aerobias, se puede obtener un rendimiento del 85% molar de adipato si se emplea una reacción química para hidrogenación y se obtiene un rendimiento del 75% molar si se utiliza una hidrogenasa a base de NADH.

20

25

Tabla 3: Los rendimientos máximos teóricos de adipato por mol de glucosa que utilizan la ruta del ácido cis,cis-mucónico.

30

Rendimiento del adipato	Etapa final enzimática		Etapa final de hidrogenación química	
	Aerobias	Anaerobias	Aerobias	Anaerobias
	0,75	0,00	0,85	0,00

Aunque éste es un método ejemplar, existen desventajas de este método en comparación con otros, tales como las descritas en los Ejemplos I-IV. Por ejemplo, la primera limitación de este método son los rendimientos teóricos más bajos en comparación con la degradación del adipato inversa y las rutas de 3-oxoadipato. La segunda limitación es que los rendimientos de ATP de esta ruta son insignificantes. Una tercera limitación de esta ruta es que implica una dioxigenasa, lo que requiere un suministro de oxígeno al biorreactor y excluye la opción de la fermentación anaerobia.

35

La descripción anterior proporciona una ruta de síntesis de adipato ejemplar por medio de una ruta de ácido cis,cis-mucónico.

40

EJEMPLO VI

Síntesis de adipato a través de alfa-cetoadipato

45

Este ejemplo describe una ruta de la síntesis de adipato ejemplar a través de una ruta de alfa-cetoadipato.

El alfa-ceto adipato es un intermedio conocido en la biosíntesis de lisina en *S. cerevisiae*, y esta información se usó para identificar una ruta adicional para la biosíntesis de ácido adípico (véase la figura 6). La conversión de alfa-cetoglutarato en alfa-cetoadipato está catalizada por homocitrato sintasa, homoaconitasa y homoisocitrato deshidrogenasa, como se indica por las flechas discontinuas en la figura 6. La conversión de alfa-cetoadipato en alfa-hidroxiadipato puede ser catalizada por 2-cetoadipato reductasa, una enzima indicada que se encuentran en placenta de rata y humana (Suda et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 176:610-620 (1976); Suda et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77:586-591 (1977)). Las etapas posteriores implican una deshidratasa para la conversión de alfa-hidroxiadipato en hexa-2-enodioato seguido de su reducción en ácido adípico. Esta última etapa puede ser catalizada por una enzima o puede tener lugar a través de una reacción química como se describe en el Ejemplo II.

50

55

Los genes que codifican las enzimas para la ruta de alfa-cetoadipato se identifican como se describe en los Ejemplos I-IV.

Los rendimientos de adipato asociados con esta ruta se muestran en la Tabla 4. Debido a la pérdida de dos moléculas de CO₂ durante la conversión de acetil-CoA en adipato, solo el 67% de la glucosa puede convertirse en adipato. Esto se refleja en los rendimientos molares para esta ruta en condiciones aerobias. Los rendimientos se reducen adicionalmente en ausencia de captación de oxígeno. Además, dado que los rendimientos máximos de ATP en condiciones anaerobias son insignificantes, el organismo diseñado tendrá que utilizar sustrato adicional para formar energía para el crecimiento y el mantenimiento celular en dichas condiciones.

10

Tabla 4: Los rendimientos teóricos máximos de adipato y los rendimientos de ATP asociados por mol de glucosa usando la ruta alfa-cetoadipato.

	Etapa final enzimática		Etapa final de hidrogenación química	
	Aerobias	Anaerobias	Aerobias	Anaerobias
Rendimiento del adipato	0,67	0,45	0,67	0,40
Rendimiento máx. de ATP con respecto al rendimiento máx. de adipato	6,17	0,00	7,50	0,00

La descripción anterior proporciona una ruta de síntesis de adipato ejemplar por medio de una ruta de alfa-cetoadipato.

15

EJEMPLO VII

Síntesis de adipato a través de la degradación de lisina

20

Este ejemplo describe una ruta de la síntesis de adipato ejemplar a través de una ruta de degradación de lisina.

Dos rutas adicionales para la síntesis de adipato se basan en la degradación de la lisina para formar adipato. Una ruta comienza desde alfa-cetoglutarato para formar lisina (ruta no nativa a *E. coli* y se encuentra en *S. cerevisiae*), y la otra usa aspartato como punto de partida para la biosíntesis de lisina (ruta nativa a *E. coli*). La figura 7 muestra la formación de adipato a partir de lisina. Los rendimientos teóricos máximos para adipato, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, usando el modelo estequiométrico de *E. coli* se muestran en las Tablas 5 y 6, con alfa-cetoglutarato y aspartato como los respectivos puntos de partida para la lisina. Los rendimientos máximos de ATP que acompañan a estos rendimientos teóricos también se calcularon y se muestran en las mismas tablas. Estos rendimientos son menores en comparación con las otras rutas descritas en los Ejemplos I-IV. Los genes que codifican las enzimas para la ruta de alfa-cetoadipato se identifican como se describe en los Ejemplos I-IV.

25

30

Tabla 5: El rendimiento teórico máximo de adipato y el rendimiento de ATP asociado por mol de glucosa suponiendo la ruta de biosíntesis de lisina con alfa-cetoglutarato como punto de partida.

	Aerobias	Anaerobias
Rendimiento del adipato	0,40	0,20
Rendimiento máx. de ATP con respecto al rendimiento máx. de adipato	5,60	0,00

35

Tabla 6: El rendimiento teórico máximo de adipato y el rendimiento de ATP asociado por mol de glucosa suponiendo la ruta de biosíntesis de lisina con aspartato como punto de partida.

	Aerobias	Anaerobias
Rendimiento del adipato	0,50	0,34
Rendimiento máx. de ATP con respecto al rendimiento máx. de adipato	0,50	0,04

La descripción anterior proporciona una ruta de síntesis de adipato por medio de una ruta de degradación de lisina.

40

EJEMPLO VIII

Producción de caprolactama y ácido 6-aminocaproico a través de adipil-CoA

Este ejemplo describe una ruta de síntesis ejemplar de caprolactama y/o ácido 6-aminocaproico a través de una ruta de adipil-CoA.

45

Se muestra una ruta ejemplar para formar caprolactama y/o ácido 6-aminocaproico usando adipil-CoA como el precursor en la figura 8. La ruta implica una aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA que puede reducir la adipil-CoA en adipato semialdehído y una transaminasa o 6-aminocaproato deshidrogenasa que puede transformar esta molécula en ácido 6-aminocaproico. La etapa terminal que convierte el 6-aminocaproato en caprolactama puede lograrse a través de una amidohidrolasa o por conversión química (Guit y Buijs, Patente de Estados Unidos N.º 6.353.100, expedida el 7 de marzo de 2002; Wolters et al., Patente de Estados Unidos N.º 5.700.934, expedida el 23 de diciembre de 1997; Agterberg et al., Patente de Estados Unidos N.º 6.660.857, expedida el 9 de diciembre de 2003). El rendimiento teórico máximo de caprolactama se calculó en 0,8 moles por mol de glucosa consumida (véase la Tabla 7) suponiendo que la ruta de degradación del adipato inversa se complementó con el esquema de reacción que se muestra en la figura 8. La ruta es favorable energéticamente ya que se forman hasta 0,78 moles de ATP por mol de glucosa consumida al máximo rendimiento teórico de la caprolactama. El rendimiento de ATP puede mejorarse aún más a 1,63 moles de ATP producido por mol de glucosa si se supone que la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PPCK) funciona en la dirección de generación de ATP hacia la formación de oxalacetato.

La etapa final de amidohidrolasa es neutra energéticamente y en cuanto a redox y, por lo tanto, el rendimiento molar del producto y de ATP asociado con la producción de ácido 6-aminocaproico es equivalente al asociado con la producción de caprolactama. Por lo tanto, se puede prever alternativamente un microorganismo y un proceso de fermentación asociado que forme ácido 6-aminocaproico en lugar de caprolactama, seguido de una operación unitaria adicional para deshidratar/ciclar el ácido 6-aminocaproico en caprolactama.

Tabla 7: El rendimiento teórico máximo de caprolactama y el rendimiento de ATP asociado por mol de glucosa, suponiendo que la ruta de degradación inversa de ácidos grasos se complementa con el esquema de reacción de la figura 8.

	Aerobias	Anaerobias
Rendimiento de caprolactama	0,80	0,80
Rendimiento máx. de ATP con respecto al rendimiento máx. de caprolactama	0,78	0,78
Rendimiento máx. de ATP con respecto al rendimiento máx. de caprolactama PPCK supuesta	1,63	1,63

Diseñar con éxito esta ruta implica identificar un conjunto apropiado de enzimas con suficiente actividad y especificidad. Esto implica identificar un conjunto apropiado de enzimas, clonar sus genes correspondientes en un huésped de producción, optimizar las condiciones de fermentación, y ensayar la formación del producto después de la fermentación. Para diseñar un huésped de producción para la producción de ácido 6-aminocaproico o caprolactama, se puede expresar una o más secuencias de ADN exógeno en un microorganismo huésped. Además, el microorganismo puede tener uno o más genes endógenos funcionalmente deletados. Estas modificaciones permitirán la producción de 6-aminocaproato o caprolactama usando materia prima renovable.

A continuación se describen varios genes candidatos caracterizados bioquímicamente capaces de codificar enzimas que catalizan cada etapa de la ruta de formación de caprolactama descrita en la figura 8. Aunque se describe para *E. coli*, un experto en la técnica puede aplicar estas enseñanzas a cualquier otro organismo huésped adecuado. Específicamente, los genes enumerados son nativos de *E. coli*, o son genes en otros organismos que se pueden aplicar para catalizar las transformaciones apropiadas cuando se clonan y se expresan correctamente.

Haciendo referencia a la figura 8, la etapa 1 implica aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA. Los genes ejemplares que codifican enzimas para catalizar la reducción de una acil-coA en su aldehído correspondiente incluyen *Acinetobacter calcoaceticus* *acr1* que codifica una acil graso-CoA reductasa (Reiser y Somerville, J. Bacteriol. 179:2969-2975 (1997)), la acil graso-CoA reductasa de *Acinetobacter* sp. M-1 (Ishige et al., Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195 (2002)) y el gen *sucD* de *Clostridium kluveri* (Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996)), que pueden convertir succinil-CoA en succinato semialdehído.

Nombre del gen	Acceso al GenBank N.º	Organismo
<i>acr1</i>	YP_047869.1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	BAB85476.1	<i>Acinetobacter</i> sp. Cepa M-1
<i>sucD</i>	P38947.1	<i>Clostridium kluveri</i>

Haciendo referencia a la figura 8, la etapa 2 implica transaminasa. La segunda etapa en la ruta es la conversión del 6-aldehído en una amina. Esta transformación puede lograrse mediante gamma-aminobutirato transaminasa (GABA transaminasa), una enzima nativa codificada por *gabT* que transfiere un grupo amino del glutamato al aldehído

terminal de succinil semialdehído (Bartsch et al., J. Bacteriol. 172:7035-7042 (1990)). Se ha demostrado que las GABA transaminasas en *Mus musculus*, *Pseudomonas fluorescens*, y *Sus scrofa* reaccionan con ácido 6-aminocaproico (Cooper, Methods Enzymol. 113:80-82 (1985); Scott y Jakoby, J. Biol. Chem. 234:932-936 (1959)). Las secuencias de proteínas para productos génicos ejemplares pueden encontrarse usando los siguientes números de acceso a GenBank:

<i>gabT</i>	NP_417148.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>abat</i>	NP_766549.2	<i>Mus musculus</i>
<i>gabT</i>	YP_257332.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>abat</i>	NP_999428.1	<i>Sus scrofa</i>

Haciendo referencia a la figura 8, la etapa 2 puede incluir alternativamente 6-aminocaproato deshidrogenasa que comprende la aminación reductora de adipato semialdehído para formar 6-aminocaproato. Esta transformación puede lograrse mediante la lisina-6-deshidrogenasa, que convierte de forma natural la L-lisina en 2-aminoadipato-6-semialdehído. Pueden encontrarse enzimas ejemplares en *Geobacillus stearothermophilus* (Heydari et al., Appl. Environ. Microbiol. 70(2):937-942 (2004)), *Agrobacterium tumefaciens* (Hashimoto et al., J. Biochem. (Tokio), 106(1):76-80 (1989); Misono et al., J. Biochem. (Tokio), 105(6):1002-1008 (1989)), y *Achromobacter denitrificans* (Ruldeekulthamrong et al., BMB Reports 790-795 (2008)).

15

<i>lysDH</i>	BAB39707	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>lysDH</i>	NP_353966	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>lysDH</i>	AAZ94428	<i>Achromobacter denitrificans</i>

Haciendo referencia a la figura 8, la etapa 3 implica amidohidrolasa. La etapa final de la síntesis de caprolactama es la ciclación de ácido 6-aminocaproico. Esta transformación no se ha caracterizado enzimáticamente pero es muy similar a la ciclación de lisina por D-lisina lactamasa (EC 3.52.11) de *Cryptococcus laurentii* (Fukumura et al., FEBS Lett. 89:298-300 (1978)). Sin embargo, las secuencias de proteínas y nucleótidos de esta enzima no se conocen actualmente y, hasta el momento, la actividad de la lisina lactamasa no se ha demostrado en otros organismos.

Los plásmidos contenidos en varias cepas de *Pseudomonas sp.* aisladas del suelo han demostrado que confieren capacidad para crecer sobre la caprolactama como única fuente de carbono (Boronin et al., FEMS Microbiol. Lett. 22:167-170 (1984)); sin embargo, las secuencias de genes o proteínas asociadas no se han asociado con esta función hasta la fecha.

La enzima candidata más estrechamente relacionada con la información de secuencia disponible es la 6-aminohexanoato-dímero hidrolasa cíclica, que se ha caracterizado en *Pseudomonas sp.* y *Flavobacterium sp.* El producto génico *nylB* de *Pseudomonas sp* NK87 se clonó y se expresó en *E. coli* (Kanagawa et al., J. Gen. Microbiol. 139:787-795 (1993)). La especificidad de sustrato de la enzima se ensayó en *Flavobacterium sp* K 172 y se mostró que reaccionaba con oligómeros de orden superior de 6-aminohexanoato pero no de caprolactama (Kinoshita et al., Eur. J. Biochem. 116:547-551 (1981)). La reversibilidad y la capacidad de las 6-aminohexanoato dímero hidrolasas en otros organismos para reaccionar con el sustrato deseado en la dirección de interés pueden ser ensayarse adicionalmente. Las secuencias de proteínas para productos génicos ejemplares pueden encontrarse usando los siguientes números de acceso a GenBank:

35

<i>nylB</i>	AAA24929.1	<i>Pseudomonas sp</i> NK87
<i>nylB</i>	P13397	<i>Flavobacterium sp</i> K172
<i>nylB</i>	YP_949627.1	<i>Arthrobacter aurescens</i> TC1

La descripción anterior proporciona una ruta a modo de ejemplo para producir caprolactama y/o ácido 6-aminocaproico por medio de una ruta de adipil-CoA.

40

EJEMPLO IX

Preparación de un organismo microbiano productor de 6-aminocaproato o caprolactama que tiene una ruta de 3-oxoadipato

45

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir adipato usando la ruta de degradación inversa y convirtiendo el adipato intracelular en 6-aminocaproato y/o caprolactama.

Se usa *Escherichia coli* como organismo diana para diseñar los genes necesarios para la síntesis de adipato, 6-aminocaproato y/o caprolactama (véanse la figura 2 y la figura 8). *E. coli* proporciona un buen huésped para generar un microorganismo de origen sintético capaz de producir adipato, 6-aminocaproato, y/o caprolactama. *E. coli* es susceptible de manipulación genética y se sabe que es capaz de producir diversos productos, como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, eficazmente en condiciones anaerobias o microaerobias.

Para generar una cepa de *E. coli* diseñada para producir 6-aminocaproato y/o caprolactama, los ácidos nucleicos que codifican las enzimas utilizadas en la ruta de degradación de adipato inversa y las rutas de síntesis de 6-aminocaproato o caprolactama se expresan en *E. coli* usando técnicas ya conocidas de biología molecular (véase, por ejemplo, Sambrook, anteriormente, 2001; Ausubel, anteriormente, 1999). En particular, los genes *paaJ* (NP_415915.1), *paaH* (NP_415913.1), y *maoC* (NP_415905.1) que codifican las actividades de succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, y 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, respectivamente, se clonan en el vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el promotor PA1/lacO. Además, los genes *bcd* (NP_349317.1), *etfAB* (349315.1 y 349316.1), y *sucCD* (NP_415256.1 y AAC73823.1) que codifican las actividades de 5-carboxi-2-pentenil-CoA reductasa y adipil-CoA sintetasa, respectivamente, se clonan en el vector pZA33 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el promotor PA1/lacO. Por último, los genes *acr1* (YP_047869.1), *gabT* (NP_417148.1), y *nylB* (AAA24929.1) que codifican las actividades de aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA, transaminasa, y amidohidrolasa se clonan en un tercer plásmido compatible, pZS23, bajo el promotor PA1/lacO. pZS23 se obtiene reemplazando el módulo de resistencia a la ampicilina del vector pZS 13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con un módulo de resistencia a la kanamicina mediante técnicas de biología molecular ya conocidas. Los tres conjuntos de plásmidos se transforman en la cepa MG1655 de *E. coli* para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la síntesis de 6-aminocaproato y/o caprolactama.

El organismo genéticamente modificado resultante se cultiva en medio que contiene glucosa siguiendo procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., anteriormente, 2001). La expresión de los genes de la síntesis de 6-aminocaproato y caprolactama se corrobora usando métodos bien conocidos en la técnica para determinar la expresión de polipéptidos o la actividad enzimática, incluyendo, por ejemplo, transferencias Northern, amplificación por PCR de ARNm, inmunotransferencia y similares. Las actividades enzimáticas de las enzimas expresadas se confirman usando ensayos específicos para las actividades individuales. La capacidad de la cepa de *E. coli* modificada para producir 6-aminocaproato y/o caprolactama se confirma usando HPLC, cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS), y/o cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS).

Las cepas microbianas diseñadas para tener una ruta funcional para la síntesis de 6-aminocaproato y/o caprolactama se aumentan adicionalmente mediante la optimización para la utilización eficiente de la ruta. Brevemente, se evalúa la cepa diseñada para determinar si alguno de los genes exógenos se expresa a un nivel limitante de la velocidad. La expresión se aumenta para cualquier enzima expresada a niveles bajos que pueda limitar el flujo a través de la ruta, por ejemplo, mediante la introducción de números adicionales de copias génicas.

Para generar mejores productores, se puede utilizar un modelo metabólico para optimizar las condiciones de crecimiento. El modelado también se usa para diseñar inactivaciones génicas que optimizan adicionalmente la utilización de la ruta (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 y US 2004/0009466, y la Patente de Estados Unidos N.º 7.127.379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos sobre el crecimiento celular de cambiar el metabolismo hacia una producción más eficiente de 6-aminocaproato y/o caprolactama. Un método de modelado es el enfoque de optimización binivel, OptKnock (Burgard et al., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar inactivaciones génicas que colectivamente dan como resultado una mejor producción de 6-aminocaproato y/o caprolactama. La evolución adaptativa también puede usarse para generar mejores productores de, por ejemplo, los intermedios acetil-CoA y succinil-CoA de los productos. La evolución adaptativa se realiza para mejorar las características de crecimiento y producción (Fong y Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et al., *Science* 314:1565-1568 (2006)). Basándose en los resultados, las rondas posteriores de modelado, ingeniería genética y evolución adaptativa se pueden aplicar al productor de 6-aminocaproato y/o caprolactama para aumentar aún más la producción.

Para la producción a gran escala de 6-aminocaproato y/o caprolactama, el organismo anterior se cultiva en un fermentador usando un medio conocido en la técnica para soportar el crecimiento del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan de forma discontinua, discontinua alimentada o continua. Las condiciones anaerobias se mantienen burbujeando primero el medio con nitrógeno y luego sellando el recipiente de cultivo, por ejemplo, los matraces pueden sellarse con un tapón y una tapa de rosca. También se pueden utilizar

condiciones microaerobias proporcionando un pequeño orificio en el tapón para una aireación limitada. El pH del medio se mantiene a un pH de aproximadamente 7 mediante la adición de un ácido, como H₂SO₄. La velocidad de crecimiento se determina midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (600 nm), y la tasa de captación de glucosa controlando el agotamiento de la fuente de carbono a lo largo del tiempo. Los subproductos tales como 5 alcoholes no deseados, ácidos orgánicos y glucosa residual, se pueden cuantificar por HPLC (Shimadzu), por ejemplo, usando una serie Aminex® de columnas de HPLC (por ejemplo, HPX-87 series) (BioRad), usando un detector de índice de refracción para glucosa y alcoholes, y un detector de UV para ácidos orgánicos (Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 775-779 (2005)).

10 EJEMPLO X

Síntesis de adipato a través de 2-hidroxiadipil-CoA

Este ejemplo describe dos rutas de síntesis de adipato ejemplares procedentes de alfa-cetoadipato y que pasan a 15 través de un intermedio 2-hidroxiadipil-CoA.

Como se describe en el ejemplo VI, el alfa-cetoadipato es un intermedio conocido en la biosíntesis de lisina que puede formarse a partir de alfa-cetoglutarato a través de homocitrato sintasa, homoaconitasa, y homoisocitrato deshidrogenasa. El alfa-cetoadipato se puede convertir a 2-hidroxiadipil-CoA mediante las dos rutas representadas 20 en la figura 9. El 2-hidroxiadipil-CoA se puede deshidratar y reducir posteriormente en adipil-CoA, que luego se puede convertir en adipato como se muestra en la figura 9. El rendimiento máximo de adipato a partir de glucosa a través de estas rutas es de 0,67 mol/mol.

La conversión de alfa-cetoadipato en 2-hidroxiadipato puede ser catalizada por 2-cetoadipato reductasa, una enzima 25 indicada que se encuentran en placenta de rata y humana (Suda et al., Arch. Biochem. Biophys. 176:610-620 (1976); Suda et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 77:586-591 (1977)). Como alternativa, las enzimas capaces de reducir el alfa-cetoglutarato en 2-hidroxiadipato también pueden mostrar actividad sobre alfa-cetoadipato, que es solo un átomo de carbono más largo. Una de dichas enzimas que posee actividad de alfa-cetoglutarato reductasa es *serA* de *Escherichia coli* (Zhao y Winkler, J. Bacteriol. 178(1):232-9 (1996)). Pueden encontrarse enzimas ejemplares 30 adicionales en *Arabidopsis thaliana* (Ho, et al., J. Biol. Chem. 274(1):397-402 (1999)) y *Haemophilus influenzae*.

<i>serA</i>	NP_417388.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>PGDH</i>	NP_564034	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>serA</i>	P43885	<i>Haemophilus influenzae</i>

Haciendo referencia a la figura 9, es probable que 2-hidroxiadipato se convierta en 2-hidroxiadipil-CoA por las sintetasas, transferasas, fosfotransadipilasas y cinasas descritas en el ejemplo I. Como alternativa, es probable que 35 las enzimas con actividad 2-hidroxiadipato CoA-transferasa o glutacolato CoA-transferasa sean adecuadas para transferir un resto CoA a 2-hidroxiadipato. Un ejemplo de tal enzima se codifica por los genes *gctA* y *gctB* de *Acidaminococcus fermentans* (Buckel, et al., Eur. J. Biochem. 118(2):315-321 (1981); Mack, et al., Eur. J. Biochem. 226(1):41-51 (1994)). De forma similar, se requerirán actividades de sintetasa, transferasa o fosfotransadipilasa y cinasa para convertir alfa-cetoadipato en alfa-cetoadipil-CoA, como se representa en la figura 9. La conversión de 40 alfa-cetoadipil-CoA en 2-hidroxiadipil-CoA puede realizarse por una enzima de alfa-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa. Se informó una actividad similar en células de *E. coli* adaptadas a propionato cuyos extractos catalizaron la oxidación de lactil-CoA para formar piruvil-CoA (Megraw et al., J. Bacteriol. 90(4): 984-988 (1965)). Se describieron hidroxiacil-CoA deshidrogenasas adicionales en el ejemplo I.

<i>gctA</i>	Q59111	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>gctB</i>	Q59112	<i>Acidaminococcus fermentans</i>

45

La deshidratación de 2-hidroxiadipil-CoA para formar 5-carboxi-2-pentenoil-CoA puede realizarse por una 2-hidroxiacil-CoA deshidratasa. Se ha caracterizado sistema de 2-hidroxiadipil-CoA deshidratasa en *Acidaminococcus fermentans* y requiere tanto la subunidad *hgdA* como *hgdB* y la proteína activadora, *hgdC*, para una actividad óptima (Dutschko et al., Eur. J. Biochem. 181(3):741-746 (1989); Locher et al. J. Mol. Biol. 307(1):297-308; Muller y Buckel, Eur. J. Biochem. 230(2):698-704 (2001); Schweiger et al. Eur. J. Biochem. 169(2):441-448 (1987)). Este sistema enzimático es similar en mecanismo a la lactoil-CoA deshidratasa de *Clostridium propionicum* (Hofmeister y Buckel, Eur. J. Biochem. 206(2):547-552 (1992); Kuchta y Abeles, J. Biol. Chem. 260(24):13181-13189 (1985)). Los homólogos de *hgdA*, *hgdB*, y *hgdC* existen en varios organismos.

50

<i>hgdA</i>	P11569	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>hgdB</i>	P11570	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>hgdC</i>	P11568	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>hgdA</i>	ZP_03731126.1	<i>Clostridium</i> sp. M62/1
<i>hgdB</i>	ZP_03731125.1	<i>Clostridium</i> sp. M62/1
<i>hgdC</i>	ZP_03731127.1	<i>Clostridium</i> sp. M62/1
<i>hgdA</i>	NP_603114.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586
<i>hgdB</i>	NP_603115.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586
<i>hgdC</i>	NP_603113.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586

La conversión de 5-carboxi-2-pentenoil-CoA en adipato se realiza por las enzimas descritas en el Ejemplo I.

La descripción anterior proporciona una ruta de síntesis de adipato ejemplar por medio de una ruta de 2-5 hidroxidipil-CoA.

EJEMPLO XI

Preparación de un organismo microbiano productor de adipato que tiene una ruta de 2-hidroxidipil-CoA

10 Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir adipato usando una ruta de 2-hidroxidipil-CoA.

15 Se usa *Escherichia coli* como organismo diana para diseñar los genes necesarios para la síntesis de adipato (véanse la figura 9). *E. coli* proporciona un buen huésped para generar un microorganismo de origen sintético capaz de producir adipato. *E. coli* es susceptible de manipulación genética y se sabe que es capaz de producir diversos productos, como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, eficazmente en condiciones anaerobias o microaerobias.

20 Para generar una cepa de *E. coli* diseñada para producir adipato, los ácidos nucleicos que codifican las enzimas utilizadas en una ruta de 2-hidroxidipil-CoA a adipato se expresan en *E. coli* usando técnicas de biología molecular bien conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook, anteriormente, 2001; Ausubel anteriormente, 1999). En particular, los genes *serA* (NP_417388.1), *gctA* (Q59111), y *gctB* (Q59112) que codifican las actividades de 2-hidroxidipil-CoA deshidrogenasa y 2-hidroxidipil-CoA:acetil-CoA transferasa, respectivamente, se clonan en el vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el promotor PA1/lacO. Además, los genes *hgdA* (P11569), *hgdB* (P11570), y *hgdC* (P11568) que codifican la actividad de 2-hidroxidipil-CoA deshidratasa, respectivamente, se clonan en el vector pZA33 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el promotor PA1/lacO. Además, los genes *bcd* (NP_349317.1), *etfAB* (349315.1 y 349316.1), y *sucCD* (NP_415256.1 y AAC73823.1) que codifican las actividades de 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa y adipil-CoA sintetasa se clonan en un tercer plásmido compatible, pZS23, bajo el promotor PA1/lacO. pZS23 se obtiene reemplazando el módulo de resistencia a la ampicilina del vector pZS13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con un módulo de resistencia a la kanamicina mediante técnicas de biología molecular bien conocidas. Los tres conjuntos de plásmidos se transforman en la cepa MG1655 de *E. coli* para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la síntesis de adipato.

35 El organismo genéticamente modificado resultante se cultiva en medio que contiene glucosa siguiendo procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., anteriormente, 2001). La expresión de genes de la ruta de 2-hidroxidipil-CoA para la síntesis de adipato se corrobora usando métodos bien conocidos en la técnica para determinar la expresión de polipéptidos o la actividad enzimática, incluyendo, por ejemplo, transferencias Northern, amplificación por PCR de ARNm, inmunotransferencia y similares. Las actividades enzimáticas de las enzimas expresadas se confirman usando ensayos específicos para las actividades individuales. La capacidad de la cepa de *E. coli* modificada para producir adipato se confirma usando HPLC, cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS), y/o cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS).

45 Las cepas microbianas diseñadas para tener una ruta de síntesis de adipato funcional se aumentan adicionalmente mediante la optimización para la utilización eficiente de la ruta. Brevemente, se evalúa la cepa diseñada para determinar si alguno de los genes exógenos se expresa a un nivel limitante de la velocidad. La expresión se aumenta para cualquier enzima expresada a niveles bajos que pueda limitar el flujo a través de la ruta, por ejemplo, mediante la introducción de números adicionales de copias génicas.

50 Para generar mejores productores, se puede utilizar un modelo metabólico para optimizar las condiciones de

crecimiento. El modelado también se usa para diseñar inactivaciones génicas que optimizan adicionalmente la utilización de la ruta (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 y US 2004/0009466, y la Patente de Estados Unidos N.º 7.127.379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos
5 sobre el crecimiento celular de cambiar el metabolismo hacia una producción más eficiente de adipato. Un método de modelado es el enfoque de optimización binivel, OptKnock (Burgard et al., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar inactivaciones génicas que colectivamente dan como resultado una mejor producción de adipato. La evolución adaptativa también puede usarse para generar mejores productores de, por ejemplo, el intermedio de alfa-ceto adipato o el producto de adipato. La evolución adaptativa se realiza para mejorar
10 las características de crecimiento y producción (Fong y Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et al., *Science* 314:1565-1568 (2006)). Basándose en los resultados, las rondas posteriores de modelado, ingeniería genética y evolución adaptativa se pueden aplicar al productor de adipato para aumentar aún más la producción.

Para la producción a gran escala de adipato, el organismo que contiene la ruta de 2-hidroxiadipil-CoA se cultiva en
15 un fermentador usando un medio conocido en la técnica para soportar el crecimiento del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan de forma discontinua, discontinua alimentada o continua. Las condiciones anaerobias se mantienen burbujando primero el medio con nitrógeno y luego sellando el recipiente de cultivo, por ejemplo, los matraces pueden sellarse con un tapón y una tapa de rosca. También se pueden utilizar condiciones microaerobias proporcionando un pequeño orificio en el tapón para una aireación limitada. El pH del
20 medio se mantiene a un pH de aproximadamente 7 mediante la adición de un ácido, como H₂SO₄. La velocidad de crecimiento se determina midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (600 nm), y la tasa de captación de glucosa controlando el agotamiento de la fuente de carbono a lo largo del tiempo. Los subproductos tales como alcoholes no deseados, ácidos orgánicos y glucosa residual, se pueden cuantificar por HPLC (Shimadzu), por ejemplo, usando una serie Aminex® de columnas de HPLC (por ejemplo, HPX-87 series) (BioRad), usando un
25 detector de índice de refracción para glucosa y alcoholes, y un detector de UV para ácidos orgánicos (Lin et al., *Biotechnol. Bioeng.* 775-779 (2005)).

Este ejemplo describe la preparación de un organismo microbiano productor de adipato que contiene una ruta de 2-hidroxiadipil-CoA.

30

REIVINDICACIONES

1. Un organismo microbiano de origen sintético, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta para convertir adipil-CoA en ácido 6-aminocaproico (ruta de ácido 6-aminocaproico) y al menos una ruta para producir adipil-CoA (ruta adipil-CoA), comprendiendo dicha ruta de ácido 6-aminocaproico dos ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la ruta de ácido 6-aminocaproico expresada en una cantidad suficiente para producir ácido 6-aminocaproico, comprendiendo dicha ruta de ácido 6-aminocaproico aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA, y transaminasa o 6-aminocaproato deshidrogenasa,
- 5 en el que dicha al menos una ruta de adipil-CoA comprende al menos una de una ruta para convertir adipato en adipil CoA y una ruta para convertir succinil-CoA más acetil-CoA en adipil-CoA, en el que dicha ruta para convertir adipato en adipil CoA comprende adipil-CoA sintetasa o fosfotransadipilasa/adipato cinasa; y
- 10 en el que dicha ruta para convertir succinil-CoA más acetil-CoA en adipil-CoA comprende succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-oxoadipil-CoA transferasa, 3-oxoadipato reductasa, 3-hidroxiadipato deshidratasa, 2-enoato reductasa, y adipil-CoA sintetasa, fosfotransadipilasa/adipato cinasa, adipil-CoA:acetil-CoA transferasa o adipil-CoA hidrolasa.
- 15
2. El organismo microbiano de origen sintético de la reivindicación 1, en el que dichos dos ácidos nucleicos exógenos codifican aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA y transaminasa.
- 20
3. El organismo microbiano de origen sintético de la reivindicación 1, en el que dichos dos ácidos nucleicos exógenos codifican aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA y 6-aminocaproato deshidrogenasa.
- 25
4. El organismo microbiano de origen sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha ruta de adipil-CoA comprende una ruta para convertir adipato en adipil CoA que comprende adipil-CoA sintetasa.
5. El organismo microbiano de origen sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha ruta de adipil-CoA comprende una ruta para convertir adipato en adipil CoA que comprende fosfotransadipilasa/adipato cinasa.
- 30
6. El organismo microbiano de origen sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicha ruta de adipil-CoA comprende una ruta para convertir succinil-CoA más acetil-CoA en adipil-CoA y dicha ruta para convertir succinil-CoA más acetil-CoA en adipil-CoA comprende succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, y 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa.
- 35
7. El organismo microbiano de origen sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicha ruta de adipil-CoA comprende una ruta para convertir adipato en adipil CoA que comprende adipil-CoA sintetasa y comprende además una ruta para convertir succinil-CoA más acetil-CoA en adipato (ruta de adipato) que comprende succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-oxoadipil-CoA transferasa, 3-oxoadipato reductasa, 3-hidroxiadipato deshidratasa, y 2-enoato reductasa.
- 40
8. El organismo microbiano de origen sintético de la reivindicación 7, en el que dicha ruta de adipato comprende uno, dos, tres, cuatro o cinco ácidos nucleicos exógenos, codificando cada uno una enzima de la ruta de adipato.
- 45
9. El organismo microbiano de origen sintético de la reivindicación 7, en el que dicha ruta de adipil-CoA comprende además adipil-CoA:acetil-CoA transferasa.
- 50
10. El organismo microbiano de origen sintético de la reivindicación 7, en el que dicha ruta de adipil-CoA comprende además adipil-CoA hidrolasa.
11. El organismo microbiano de origen sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha ruta de adipil-CoA comprende una ruta para convertir succinil-CoA más acetil-CoA en adipil-CoA que comprende uno, dos, tres, cuatro o cinco ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la ruta de adipil-CoA.
- 55
12. El organismo microbiano de origen sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que al

menos uno de dichos ácidos nucleicos exógenos es un ácido nucleico heterólogo.

- 5 13. El organismo microbiano de origen sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el organismo microbiano de origen sintético es una especie de bacteria, levadura u hongo.
- 10 14. El organismo microbiano de origen sintético de la reivindicación 13, en el que dichas bacterias se seleccionan del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Rhizobium etli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Gluconobacter oxydans*, *Zymomonas mobilis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptomyces coelicolor*, *Clostridium acetobutylicum*, *Pseudomonas fluorescens*, y *Pseudomonas putida*.
- 15 15. El organismo microbiano de origen sintético de la reivindicación 13, en el que dicha levadura u hongo se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, y *Pichia pastoris*.
16. El organismo microbiano de origen sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que dicho organismo microbiano comprende además una ruta de caprolactama que comprende amidohidrolasa.
- 20 17. Un cultivo sustancialmente anaerobio que comprende el organismo microbiano de origen sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1-16.
- 25 18. Un método para producir ácido 6-aminocaproico, que comprende cultivar el organismo microbiano de origen sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en condiciones y durante un período de tiempo suficiente para producir ácido 6-aminocaproico.
- 30 19. El método de la reivindicación 18, en el que dicho método comprende además separar el ácido 6-aminocaproico de otros componentes en el cultivo.
20. El método según la reivindicación 19, en el que la separación comprende extracción, extracción líquido/líquido continua, pervaporación, filtración de membrana, separación de membrana, ósmosis inversa, electrodiálisis, destilación, cristalización, centrifugación, filtración extractiva, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de adsorción, y ultrafiltración.
- 35 21. Un método para producir caprolactama, que comprende cultivar el organismo microbiano de origen sintético de la reivindicación 16 en condiciones y durante un período de tiempo suficiente para producir caprolactama.
- 40 22. El método de la reivindicación 21, en el que dicho método comprende además separar la caprolactama de otros componentes en el cultivo.
- 45 23. El método según la reivindicación 22, en el que la separación comprende extracción, extracción líquido/líquido continua, pervaporación, filtración de membrana, separación de membrana, ósmosis inversa, electrodiálisis, destilación, cristalización, centrifugación, filtración extractiva, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de adsorción, y ultrafiltración.

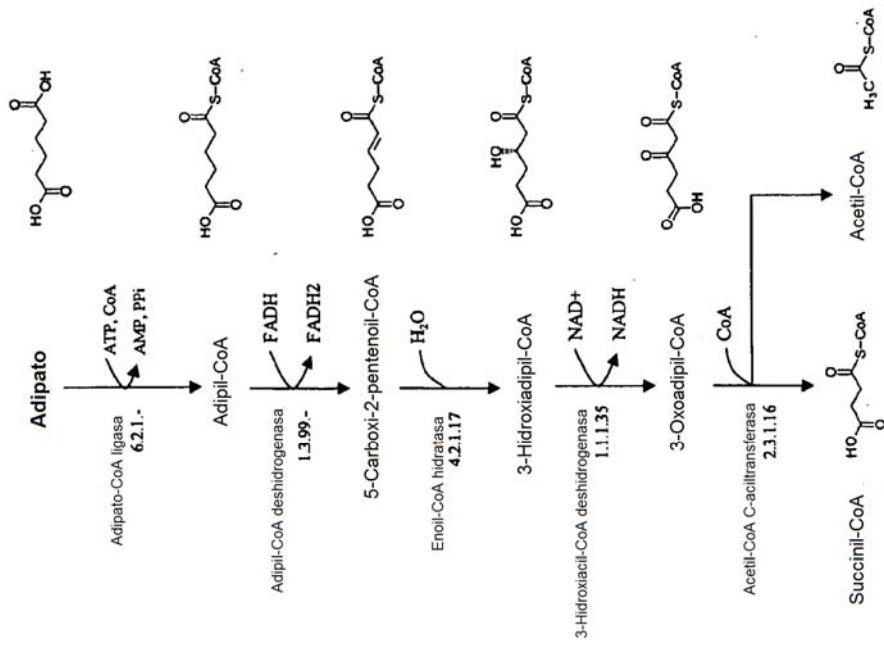


FIGURA 1

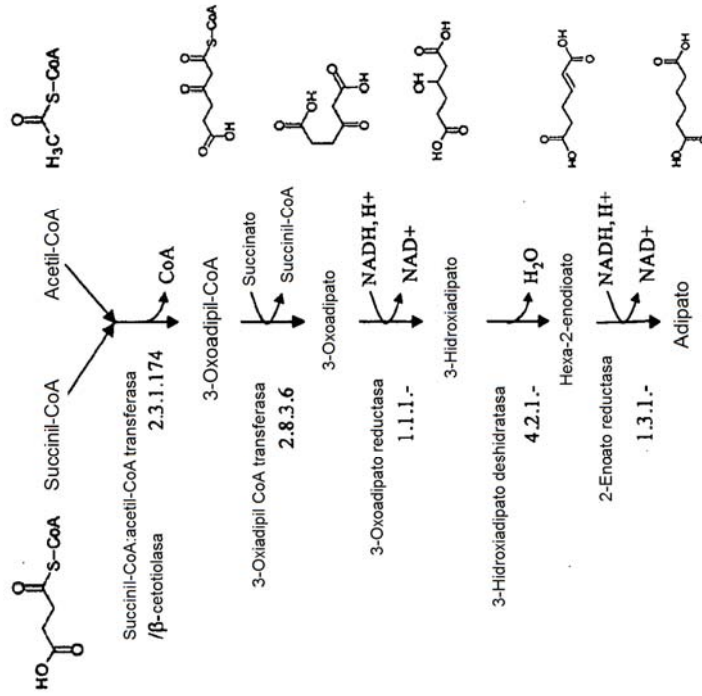


FIGURA 3

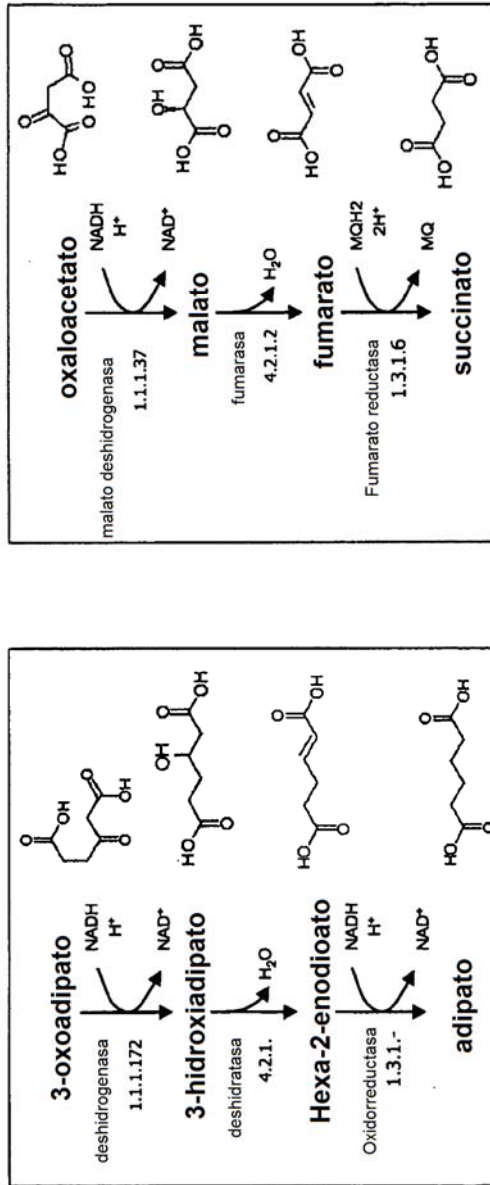


FIGURA 4

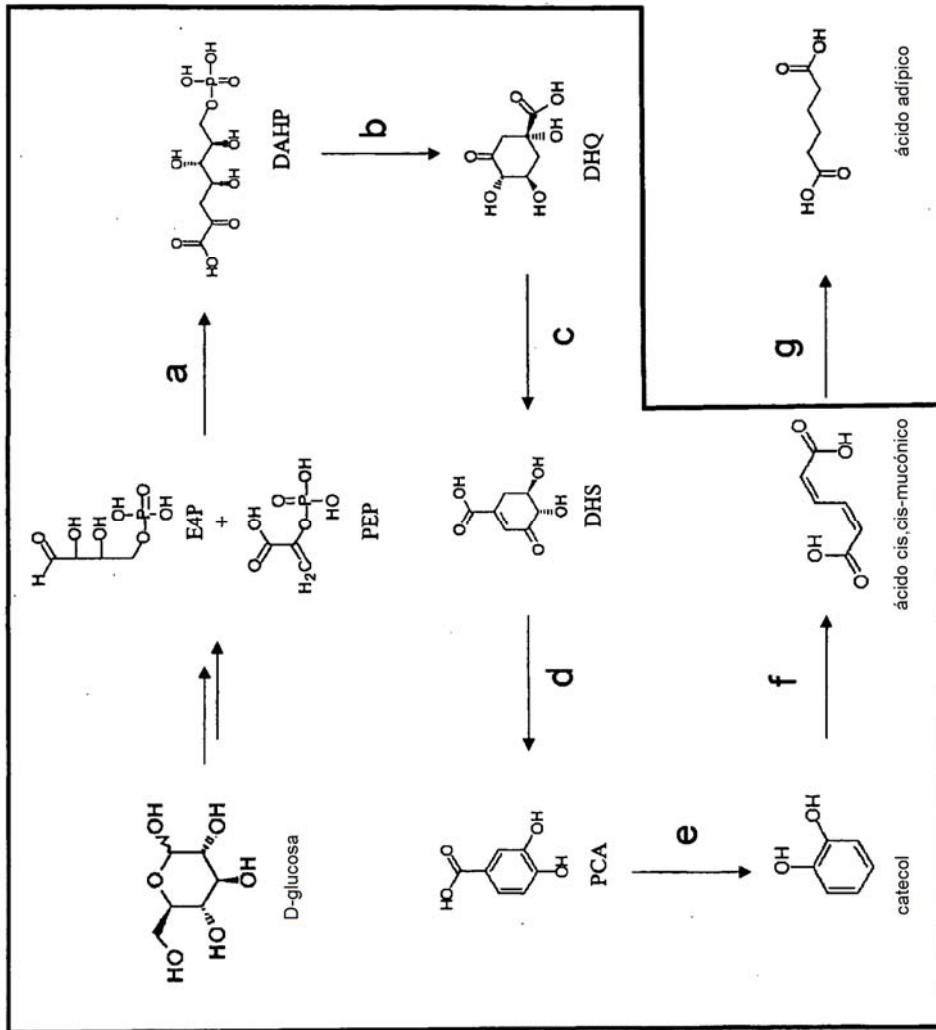


FIGURA 5

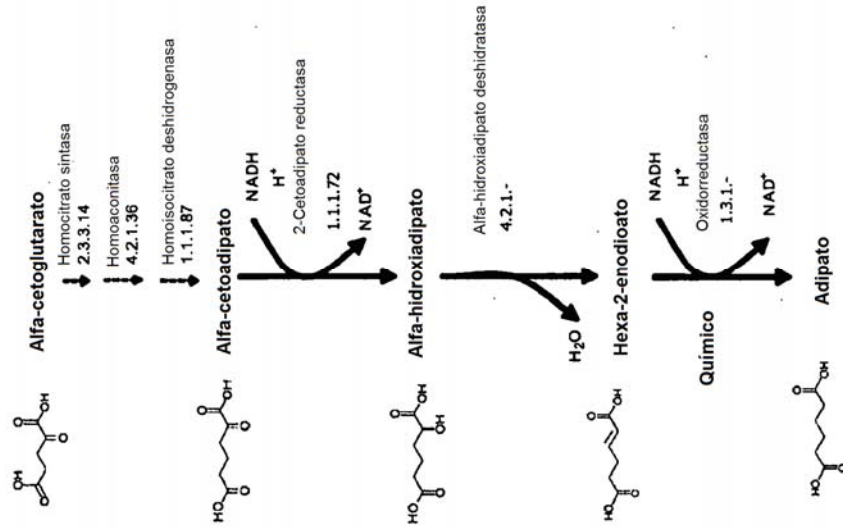


FIGURA 6

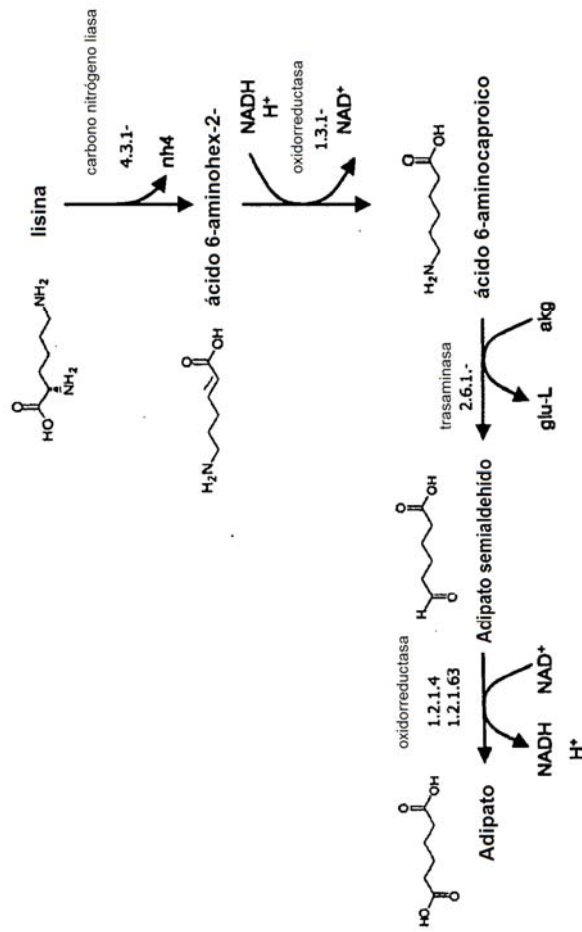


FIGURA 7

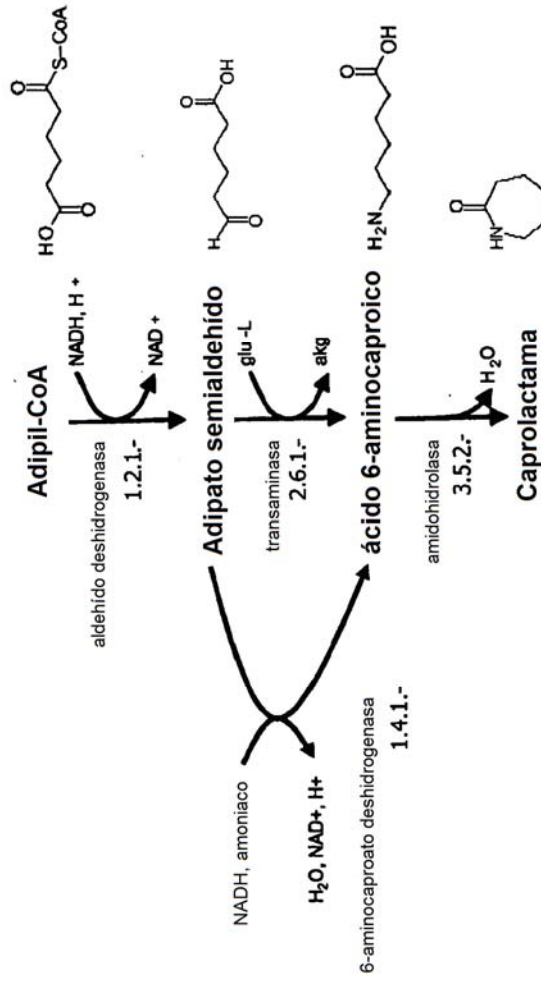


FIGURA 8

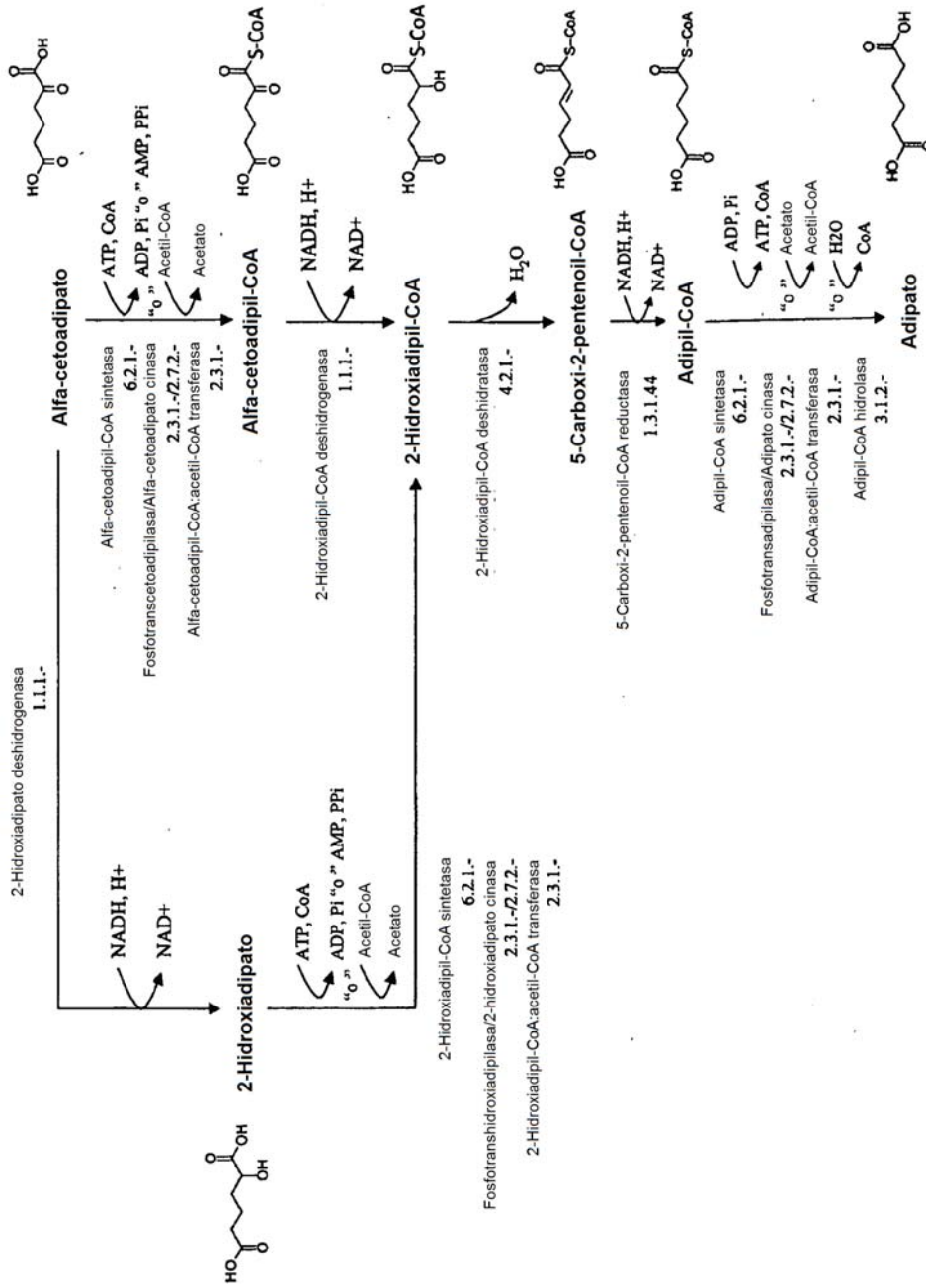


FIGURA 9