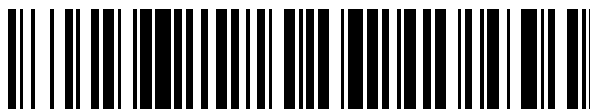


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 423**

51 Int. Cl.:

C12N 1/38 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12P 7/40 (2006.01)
C12P 7/44 (2006.01)
C12P 13/02 (2006.01)
C12P 17/10 (2006.01)
C12P 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2010** **PCT/US2010/034144**
87 Fecha y número de publicación internacional: **11.11.2010** **WO10129936**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2010** **E 10772921 (2)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019** **EP 2427544**

54 Título: **Microorganismos y métodos para la biosíntesis de adipato, hexametildiamina y ácido 6-aminocaproico**

30 Prioridad:

07.05.2009 US 176196 P
22.06.2009 US 219365 P
22.09.2009 US 244844 P
29.09.2009 US 246973 P
30.09.2009 US 247533 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BURK, MARK, J.;
BURGARD, ANTHONY, P.;
OSTERHOUT, ROBIN, E. y
PHARKYA, PRITI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 749 423 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 y métodos para la biosíntesis de adipato, hexametildiamina y ácido 6-aminocaproico

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad con respecto a la solicitud provisional de EE. UU. n.º 61/176,196, presentada el 7 de mayo de 2009, la solicitud provisional de EE. UU. con el n.º de serie 61/219,365, presentada el 22 de junio de 2009, la solicitud provisional de EE. UU. con el n.º de serie 61/244,844, presentada el 22 de septiembre de 2009, la solicitud provisional de EE. UU. con el n.º de serie 61/246,973, presentada el 29 de septiembre de 2009 y la solicitud provisional de EE. UU. con el n.º de serie: 61/247,533, presentada el 30 de septiembre de 2009.

Antecedentes de la invención

La presente invención hace referencia, en términos generales, a procesos biosintéticos y, más específicamente, a organismos con capacidad de biosíntesis de hexametildiamina.

El ácido adípico, un ácido dicarboxílico, tiene un peso molecular de 146,14. Se puede usar para producir nailon 6,6, una poliamida lineal elaborada mediante la condensación de ácido adípico con hexametildiamina. Este se emplea para fabricar diferentes tipos de fibras. Otros usos del ácido adípico incluyen su uso en plastificantes, poliésteres insaturados y polioles de poliéster. Otros usos incluyen la producción de poliuretano, componentes lubricantes y como ingrediente en alimentos para saborizar y ayudar a la gelificación.

Históricamente, se ha preparado el ácido adípico a partir de diversas grasas mediante el uso de oxidación. Algunos procesos actuales para la síntesis de ácido adípico dependen de la oxidación de aceite de KA, una mezcla de ciclohexanona, la cetona o el componente K, y ciclohexanol, el alcohol o componente A, o de ciclohexanol puro mediante el uso de ácido nítrico fuerte. Hay varias variaciones en este sentido que difieren en cuanto a las vías 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 la producción para la síntesis de ácido adípico a partir de fenol. Las otras versiones de este proceso tienden a usar agentes de oxidación que no sean ácido nítrico, tales como peróxido de hidrógeno, aire u oxígeno.

Además de usarse en la producción de nailon-6,6 como se describió anteriormente, la hexametildiamina (HMDA) también se utiliza para elaborar diisocianato de hexametileno, una materia prima monomérica usada en la producción de poliuretano. La diamina también sirve como agente de reticulación en resinas epoxi. La HMDA es producida actualmente mediante la hidrogenación de adiponitrilo.

La caprolactama es un compuesto orgánico que es una lactama de ácido 6-aminohexanoico (ácido ε-aminohexanoico, ácido 6-aminocaproico). De manera alternativa, puede considerarse la amida cíclica de ácido caproico. Un uso de la caprolactama es un monómero en la producción de nailon-6. La caprolactama puede sintetizarse a partir de ciclohexanona a través de un proceso de oximación mediante el uso de sulfato de hidroxilamonio seguido por la reorganización catalítica mediante el uso de la etapa del proceso de reorganización de Beckmann.

Los métodos para producir de manera eficaz cantidades comerciales de compuestos tales como hexametildiamina, ácido 6-aminocaproico, ácido levulínico y caprolactama se describen en la presente memoria e incluyen ventajas relacionadas.

Compendio de la invención

La invención proporciona un organismo microbiano de origen no natural que tiene una vía de hexametildiamina. El organismo microbiano contiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima en la vía de hexametildiamina. La invención proporciona de manera adicional un método para producir hexametildiamina. El método puede incluir cultivar un organismo microbiano productor de hexametildiamina, donde el organismo microbiano exprese al menos un ácido nucleico exógeno que codifique una enzima de hexametildiamina en una cantidad suficiente como para producir el producto respectivo, en condiciones y durante un período de tiempo suficiente como para producir hexametildiamina.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un ejemplo de vía para la degradación de adipato en el peroxisoma de *Penicillium chrysogenum*.

La Figura 2 muestra un ejemplo de vía para la formación de adipato a través de una vía de degradación inversa. Se proporcionan varias opciones para la conversión final de adipil-CoA en adipato.

La Figura 3 muestra un ejemplo de vía para la formación de adipato a través de la vía de 3-oxoadipato.

La Figura 4 muestra las estructuras químicas enzimáticas similares de las tres últimas etapas de la vía de 3-oxoadipato para la síntesis de adipato y el ciclo de TCA de reducción.

La Figura 5 muestra un ejemplo de vía para la síntesis de ácido adípico a partir de glucosa a través de ácido *cis,cis*-mucónico. Productos intermedios biosintéticos (abreviaciones): ácido D-eritrosa 4-fosfato (E4P), ácido fosfoenolpirúvico (PEP), 7-fosfato de ácido 3-desoxi-D-arabinoheptulosónico (DAHP), ácido 3-deshidroquinico (DHQ), ácido 3-deshidroshikímico (DHS), ácido protocatecuico (PCA). Enzimas (genes de codificación) 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/C al 10 %, H₂, 3400 kPa, 25 °C. Figura tomada de Niu et ál., *Biotechnol. Prog.* 18:201-211 (2002)).

La Figura 6 muestra un ejemplo de vía para la síntesis de adipato a través de alfa-cetoadipato mediante el uso de alfa-cetoglutarato como punto de partida.

La Figura 7 muestra un ejemplo de vía para la síntesis de adipato mediante el uso de lisina como punto de partida.

La Figura 8 muestra un ejemplo de vía para la síntesis de caprolactama mediante el uso de adipil-CoA como punto de partida.

La Figura 9 muestra ejemplos de vías para la síntesis de adipato mediante el uso de alfa-cetoadipato como punto de partida.

La Figura 10 muestra ejemplos de vías a partir de succinil-CoA y acetil-CoA para hexametilendiamina (HMDA) y caprolactama. Se ilustran vías para la producción de adipato, 6-aminocaproato, caprolactama y hexametilendiamina a partir de succinil-CoA y acetil-CoA. Abreviaturas: A) 3-oxoadipil-CoA tiolasa, B) 3-oxoadipil-CoA reductasa, C) 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, D) 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa, E) 3-oxoadipil-CoA/acil-CoA transferasa, F) 3-oxoadipil-CoA sintasa, G) 3-oxoadipil-CoA hidrolasa, H) 3-oxoadipato reductasa, I) 3-hidroxiadipato deshidratasa, J) 5-carboxi-2-pentenoato reductasa, K) adipil-CoA/acil-CoA transferasa, L) adipil-CoA sintasa, M) adipil-CoA hidrolasa, N) adipil-CoA reductasa (formadora de aldehído), O) 6-aminocaproato transaminasa, P) 6-aminocaproato deshidrogenasa, Q) 6-aminocaproil-CoA/acil-CoA transferasa, R) 6-aminocaproil-CoA sintasa, S) amidohidrolasa, T) ciclación espontánea, U) 6-aminocaproil-CoA reductasa (formadora de aldehído), V) HMDA transaminasa, W) HMDA deshidrogenasa.

La Figura 11 muestra ejemplos de vías a partir de 4-aminobutiril-CoA y acetil-CoA para hexametilendiamina y caprolactama. Se ilustran vías para la producción de 6-aminocaproato, caprolactama y hexametilendiamina a partir de 4-aminobutiril-CoA y acetil-CoA. Abreviaturas: A) 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA tiolasa, B) 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA reductasa, C) 3-hidroxi-6-aminohexanoil-CoA deshidratasa, D) 6-aminohex-2-enoil-CoA reductasa, E) 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA/acil-CoA transferasa, F) 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA sintasa, G) 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA hidrolasa, H) 3-oxo-6-aminohexanoato reductasa, I) 3-hidroxi-6-aminohexanoato deshidratasa, J) 6-aminohex-2-enoato reductasa, K) 6-aminocaproil-CoA/acil-CoA transferasa, L) 6-aminocaproil-CoA sintasa, M) 6-aminocaproil-CoA hidrolasa, N) 6-aminocaproil-CoA reductasa (formadora de aldehído), O) HMDA transaminasa, P) HMDA deshidrogenasa, Q) ciclación espontánea, R) amidohidrolasa.

La Figura 12 muestra vías para el 6-aminocaproato a partir de piruvato y semialdehído succínico. Las enzimas son A) HODH aldolasa, B) OHED hidratasa, C) OHED reductasa, D) 2-OHD descarboxilasa, E) adipato semialdehído aminotransferasa y/o adipato semialdehído oxidoreductasa (de aminación), F) OIIE descarboxilasa, G) 6-OIIE reductasa, H) 2-OIIE aminotransferasa y/o 2-OHD oxidoreductasa (de aminación), I) 2-AHD descarboxilasa, J) OHED aminotransferasa y/o OHED oxidoreductasa (de aminación), K) 2-AHE reductasa, L) HODH formiato-liasa y/o HODH deshidrogenasa, M) 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, N) 2,3-deshidroadiipil-CoA reductasa, O) adipil-CoA deshidrogenasa, P) OHED formiato-liasa y/o OHED deshidrogenasa, Q) 2-OHD formiato-liasa y/o 2-OHD deshidrogenasa. Las abreviaciones son: HODH = 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato, OHED = 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato, 2-OHD = 2-oxoheptano-1,7-dioato, 2-AHE = 2-aminohept-4-eno-1,7-dioato, 2-AHD = 2-aminoheptano-1,7-dioato y 6-OHE = 6-oxohex-4-enoato.

La Figura 13 muestra vías para la hexametilendiamina a partir de 6-aminocaproato. Las enzimas son A) 6-aminocaproato cinasa, B) 6-AHOP oxidoreductasa, C) semialdehído 6-aminocaproico aminotransferasa y/o semialdehído 6-aminocaproico oxidoreductasa (de aminación), D) 6-aminocaproato N-acetiltransferasa, E) 6-acetamidohexanoato cinasa, F) 6-AAHOP oxidoreductasa, G) 6-acetamidohexanal aminotransferasa y/o 6-acetamidohexanal oxidoreductasa (de aminación), H) 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa y/o 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida), I) 6-acetamidohexanoato CoA transferasa y/o 6-acetamidohexanoato CoA ligasa, J) 6-acetamidohexanoil-CoA oxidoreductasa, K) 6-AAHOP aciltransferasa, L) 6-AHOP aciltransferasa, M) 6-aminocaproato CoA transferasa y/o 6-aminocaproato CoA ligasa, N) 6-aminocaproil-CoA oxidoreductasa. Las abreviaciones son: 6-AAHOP = [(6-acetamidohexanoil)oxi]fosfonato y 6-AHOP = [(6-aminohexanoil)oxi]fosfonato.

La Figura 14 muestra: A) el ciclo de acetil-CoA de la biosíntesis de arginina. Las reacciones (1) y (2) son catalizadas por la ornitina acetiltransferasa con funcionalidad de acetilglutamato sintasa y ornitina aciltransferasa. La reacción 3 es una reacción aglomerada catalizada por la acetilglutamato cinasa, N-acetilglutamilfosfato reductasa y acetilornitina aminotransferasa; B) el ciclo de acetil-CoA de la biosíntesis de HMDA. Las reacciones (1) y (2) son catalizadas por la HMDA acetiltransferasa. La reacción (3) es una reacción aglomerada que incluye todas las vías

para la 6-acetamidohexanamina a partir de 6-acetamidohexanoato que se muestran en la Figura 13.

La Figura 15 muestra el desarrollo de *E. coli* en medios que contienen diversas concentraciones de 6-ACA. La *E. coli* se inoculó en medios y se desarrolló en condiciones aerobias (barras izquierda y derecha) o anaerobias (barras centrales). Los cultivos se mantuvieron durante 48 h para el primer ensayo y 30 h para un segundo ensayo en condiciones aerobias (barras derechas).

La Figura 16 muestra la tolerancia de la *E. coli* cuando se expone a 6-ACA. Las células de la fase logarítmica media (OD600 = 0,3, línea discontinua inferior) o estacionaria temprana (OD600 = 0,6, línea discontinua superior) se centrifugaron y se volvieron a suspender en medio M9-Glucosa recién preparado con diversas concentraciones de 6-ACA. Después de mantenerse durante la noche, se midieron los cultivos para determinar su desarrollo mediante la medición de la OD600.

La Figura 17 muestra la producción de etanol a partir de cultivos expuestos a diversas concentraciones de 6-ACA. Las células de la fase logarítmica media o estacionaria temprana se centrifugaron y se volvieron a suspender en medio M9-Glucosa recién preparado con diversas concentraciones de 6-ACA. Después de mantenerse durante la noche, se midieron los cultivos para determinar su desarrollo mediante la medición de la OD600 y se evaluó su actividad metabólica mediante la producción de etanol.

Los paneles A y B de la Figura 18 muestran el desarrollo en diversas concentraciones de 6-ACA con y sin glicina betaína. Panel A. Mediciones de OD600 del medio inoculado con cultivos de fase logarítmica de *E. coli* con diversas concentraciones de 6-ACA con (barras derechas) y sin (barras izquierdas) glicina betaína 2 mM. Panel B. Fotografía que muestra el desarrollo de los mismos cultivos en las botellas anaerobias.

La Figura 19 muestra el análisis de LC/MS de reacciones de tiolasa *in vitro*. Se añadió succinil-CoA y acetil-CoA a tiolosas purificadas con etiquetas His en una relación de 2:1 (succinil-CoA:acetil-CoA). Las reacciones se analizaron mediante LC/MS y se cuantificaron mediante la comparación con un estándar para la acetoacetil-CoA o un área de pico determinada para la 3-oxoadipil-CoA (β -cetoadipil-CoA).

La Figura 20 muestra ejemplos de vías a partir de glutamato para hexametilendiamina (HMDA) y 6-aminocaproato. Las enzimas se designan de la siguiente manera: A) glutamil-CoA transferasa y/o ligasa, B) beta-cetotiolasa, C) 3-oxo-6-aminopimeloil-CoA oxidoreductasa, D) 3-hidroxi-6-aminopimeloil-CoA deshidratasa, E) 6-amino-7-carboxihept-2-enoil-CoA reductasa, F) 6-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), G) 2-amino-7-oxoheptanoato aminotransferasa y/u oxidoreductasa de aminación, H) homolisina descarboxilasa, I) 6-aminopimeloil-CoA hidrolasa, transferasa y/o ligasa, J) 2-aminopimelato descarboxilasa. El número de la Comisión de Enzimas indicado para cada reacción se describirá más adelante en el Ejemplo XXVI.

La Figura 21 muestra ejemplos de vías a partir de glutaril-CoA para hexametilendiamina (HMDA) y 6-aminocaproato. Las enzimas se designan de la siguiente manera: A) glutaril-CoA beta-cetotiolasa, B) 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, transferasa y/o ligasa, C) 3-oxopimelato reductasa, D) 3-oxo-1-carboxiheptanal 7-aminotransferasa y/u oxidoreductasa de 7-aminación, E) 3-oxo-7-aminoheptanoato 3-aminotransferasa y/u oxidoreductasa de 3-aminación, F) 3-oxopimelato kinasa, G) 5-oxopimeloilfosfonato reductasa, H) 3-oxopimelato CoA transferasa y/o ligasa, I) 5-oxopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), J) 3-oxopimelato 3-aminotransferasa y/u oxidoreductasa de 3-aminación, K) 3-aminopimelato CoA transferasa y/o ligasa, L) 5-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), M) 3-aminopimelato cinasa, N) 5-aminopimeloilfosfonato reductasa, O) 3-aminopimelato reductasa, P) 3-amino-7-oxoheptanoato 2,3-aminomutasa, Q) 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa y/u oxidoreductasa de aminación, R) 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa, S) homolisina descarboxilasa, T) 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa, U) 2-aminopimelato cinasa, V) 2-aminopimelato CoA transferasa y/o ligasa, W) 2-aminopimelato reductasa, X) 6-aminopimeloilfosfonato reductasa, y) 6-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), Z) 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa y/u oxidoreductasa de 7-aminación, AA) 2-aminopimelato descarboxilasa y AB) 3-oxo-1-carboxiheptanal 3-aminotransferasa y/u oxidoreductasa de 3-aminación. El número de la Comisión de Enzimas indicado para cada reacción se describirá más adelante en XXVI.

La Figura 22 muestra un ejemplo de vía a partir de piruvato y 4-aminobutanal para hexametilendiamina (HMDA). Las enzimas se designan de la siguiente manera: A) 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato aldolasa, B) 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato deshidratasa, C) 2-oxo-7-aminohept-3-enoato reductasa, D) 2-oxo-7-aminoheptanoato aminotransferasa y/u oxidoreductasa de aminación, E) homolisina descarboxilasa, F) 2-oxo-7-aminoheptanoato descarboxilasa, G) 6-aminoheptanal aminotransferasa y/o 6-aminoheptanal oxidoreductasa de aminación. El número de la Comisión de Enzimas indicado para cada reacción se describirá más adelante en el Ejemplo XXVI.

La Figura 23 muestra un ejemplo de vía a partir de homolisina para 6-aminocaproato. La Etapa A se cataliza mediante homolisina 2-monooxigenasa. La Etapa B es la hidrólisis, catalizada por base o ácido en dilución.

La Figura 24 muestra ejemplos de vías a partir de 6-aminocaproato para hexametilendiamina. Esta figura ilustra vías adicionales aparte de las presentadas en la Figura 13. Las enzimas se designan de la siguiente manera: A) 6-aminocaproato cinasa, B) 6-AHOP oxidoreductasa, C) semialdehído 6-aminocaproico aminotransferasa y/o semialdehído 6-aminocaproico oxidoreductasa (de aminación), D) 6-aminocaproato N-acetiltransferasa, E) 6-acetamidohexanoato cinasa, F) 6-AAHOP oxidoreductasa, G) 6-acetamidohexanal aminotransferasa y/o 6-

acetamidohexanal oxidorreductasa (de aminación), II) 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa y/o 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida), I) 6-acetamidohexanoato CoA transferasa y/o 6-acetamidohexanoato CoA ligasa, J) 6-acetamidohexanoil-CoA oxidorreductasa, K) 6-AAHOP aciltransferasa, L) 6-AHOP aciltransferasa, M) 6-aminocaproato CoA transferasa y/o 6-aminocaproato CoA ligasa, N) 6-aminocaproil-CoA oxidorreductasa, O) 6-aminocaproato reductasa y P) 6-acetamidohexanoato reductasa. Las abreviaciones son: 6-AAHOP = [(6-acetamidohexanoil)oxil]fosfonato y 6-AHOP = [(6-aminohexanoil)oxil]fosfonato. El número de la Comisión de Enzimas indicado para cada reacción se describirá más adelante en el Ejemplo XXVI.

La Figura 25 muestra ejemplos de vías a partir de succinil-CoA y acetil-CoA para hexametilendiamina (HMDA), caprolactama o ácido levulínico. Se ilustran vías para la producción de adipato, 6-aminocaproato, caprolactama, hexametilendiamina y ácido levulínico a partir de succinil-CoA y acetil-CoA. Esta figura ilustra vías adicionales aparte de las presentadas en la Figura 10. Las enzimas se designan de la siguiente manera: A) 3-oxoadipil-CoA tiolasa, B) 3-oxoadipil-CoA reductasa, C) 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, D) 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa, E) 3-oxoadipil-CoA/acil-CoA transferasa, F) 3-oxoadipil-CoA sintasa, G) 3-oxoadipil-CoA hidrolasa, H) 3-oxoadipato reductasa, I) 3-hidroxiadipato deshidratasa, J) 5-carboxi-2-pentenoato reductasa, K) adipil-CoA/acil-CoA transferasa, L) adipil-CoA sintasa, M) adipil-CoA hidrolasa, N) adipil-CoA reductasa (formadora de aldehído), O) 6-aminocaproato transaminasa, P) 6-aminocaproato deshidrogenasa, Q) 6-aminocaproil-CoA/acil-CoA transferasa, R) 6-aminocaproil-CoA sintasa, S) amidohidrolasa, T) ciclación espontánea, U) 6-aminocaproil-CoA reductasa (formadora de aldehído), V) HMDA transaminasa, W) HMDA deshidrogenasa, X) adipato reductasa, Y) adipato cinasa, Z) adipilfosfato reductasa y AA) 3-oxoadipato descarboxilasa.

La Figura 26 muestra ejemplos de vías a partir de 2-amino-7-oxosubarato para hexametilendiamina (HMDA) y 6-aminocaproato. Las enzimas se designan de la siguiente manera: A) 2-amino-7-oxosubarato ceto-ácido descarboxilasa, B) 2-amino-7-oxoheptanoato descarboxilasa, C) 6-aminohexanal oxidorreductasa de aminación y/o 6-aminohexanal aminotransferasa, D) 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa, E) 2-aminopimelato descarboxilasa, F) 6-aminohexanal oxidorreductasa, G) 2-amino-7-oxoheptanoato descarboxilasa, H) homolisina descarboxilasa, I) 2-amino-7-oxosubarato aminoácido descarboxilasa, J) 2-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de aminación y/o 2-oxo-7-aminoheptanoato aminotransferasa, K) 2-amino-7-oxosubarato oxidorreductasa de aminación y/o 2-amino-7-oxosubarato aminotransferasa, L) 2,7-diaminosubarato descarboxilasa y M) 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación y/o 2-amino-7-oxoheptanoato aminotransferasa. El número de la Comisión de Enzimas indicado para cada reacción se describirá más adelante en el Ejemplo XXVI.

La Figura 27 muestra un ejemplo de vía a partir de glutamato-5-semialdehído para 2-amino-7-oxosubarato. Las enzimas se designan de la siguiente manera: A) 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato aldolasa, B) 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato deshidratasa, C) 2-amino-5-eno-7-oxosubarato reductasa.

La Figura 28 muestra los rendimientos de 6-ACA con respecto al desarrollo para un mutante ADII_{Er}, LDII_D.

La Figura 29 muestra los rendimientos de 6-ACA con respecto al desarrollo para un mutante ADHE_{Er}, MDH, ASPT, LDH_D.

La Figura 30 muestra los rendimientos de 6-ACA con respecto al desarrollo para un mutante ADHE_{Er}, MDH, ASPT, LDH_D, THD2.

La Figura 31 muestra los rendimientos de 6-ACA con respecto al desarrollo para un mutante ADHE_{Er}, MDH, ASPT, LDH_D, GLUD_y.

La Figura 32 muestra los rendimientos de 6-ACA con respecto al desarrollo para un mutante PGI, EDA o un mutante PGI, PGDH_y.

La Figura 33 muestra los rendimientos de 6-ACA con respecto al desarrollo para un mutante PGI, EDA, ADHE_{Er} o un mutante PGI, PGDH_y, ADHE_{Er}.

La Figura 34 muestra los rendimientos de 6-ACA con respecto al desarrollo para un mutante ADII_{Er}, PGI, IIE_{X1}

La Figura 35 muestra características de la producción de adipato acoplada al desarrollo de diseños de cepas de alta prioridad (en gris) en comparación con las de la E. coli de tipo salvaje (en negro). Se presupone una tasa de absorción de glucosa de 10 mmol/gDW/h.

La Figura 36 muestra la actividad de CAR 889 y 891 mediante el uso de adipato 20 mM. Se muestra la actividad como unidades por mg de total de proteína en el lisado bruto.

La Figura 37 muestra la actividad de CAR 720, 889, 890, 891 mediante el uso de 6-aminocaproato 50 mM. Se muestra la actividad como unidades por mg de total de proteína en el lisado bruto.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se dirige al diseño y a la producción de células y organismos con capacidad de producción biosintética para la hexametilendiamina. Los resultados que se describen en la presente memoria indican que se

pueden diseñar vías metabólicas y modificarse genéticamente de manera recombinante para lograr la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico en *Escherichia coli* y otras células u organismos. La producción biosintética de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico puede confirmarse mediante la construcción de cepas con el genotipo metabólico diseñado. Estas células o estos organismos con modificaciones genéticas metabólicas también pueden someterse a una evolución adaptativa para aumentar de manera adicional la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico, incluso en condiciones que se aproximen al desarrollo máximo teórico.

Como se describe en la presente memoria, se describe una cantidad de vías metabólicas para la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico. Se descubrió que dos vías, la vía de degradación de adipato inversa y la vía de 3-oxoadipato, fueron beneficiosas con respecto a: (i) los rendimientos de adipato (92 % de rendimiento molar en glucosa), (ii) la falta de necesidad de oxígeno para la síntesis de adipato, (iii) la energía asociada, y (iv) la capacidad teórica de producir adipato como el único producto de fermentación. También se describen vías metabólicas para la producción de adipato que pasan a través de α -cetoadipato o lisina, pero son de menor rendimiento y requieren de ventilación para alcanzar el máximo de producción. Una vía para producir 6-aminocaproato y/o caprolactama a partir de adipil-CoA, un precursor en la vía de degradación inversa, también se describe en la presente memoria.

Como se describe en la presente memoria, se describe una cantidad de ejemplos de vías para la biosíntesis de adipato. Un ejemplo de vía involucra la síntesis de adipato a través de una vía que depende de la capacidad de reversión de la degradación de adipato como se describe en organismos tales como *P. chrysogenum* (véanse los Ejemplos I y II). Un segundo ejemplo de vía implica la formación de 3-oxoadipato seguida por su reducción, deshidratación y otra reducción para formar adipato (véanse los Ejemplos III y IV). El rendimiento de adipato mediante el uso de cualquiera de estas dos vías es de 0,92 moles por mol de glucosa consumido. La absorción de oxígeno no es necesaria para alcanzar estos rendimientos máximos teóricos y la energía en condiciones anaerobias es favorable para el desarrollo y la secreción del producto. Anteriormente se describió un método para producir adipato a partir de ácido cis,cis-mucónico derivado de glucosa (Frost et ál., patente de EE. UU. n.º 5,487,987, emitida el 30 de enero de 1996) (véase el Ejemplo V). Se describen las ventajas de las realizaciones que se describen en la presente memoria con respecto a este método descrito anteriormente. Las vías 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 de ventilación para alcanzar el máximo de producción. Se describe una vía para producir 6-aminocaproato y/o caprolactama a partir de adipil-CoA, un precursor en la vía de degradación inversa (véanse los Ejemplos VIII y IX). Se describen vías adicionales para producir adipato en los Ejemplos X y XI. Se describen vías para producir uno, dos, tres o cuatro de los siguientes: 6-aminocaproato, caprolactama, hexametildiamina y ácido levulínico, a partir de succinil-CoA y acetil-CoA en los Ejemplos XII, XXVIII. Se describen varias vías para la producción de 6-aminocaproato a partir de semialdehído succínico y piruvato en el Ejemplo XIX. Se describen varias vías para la producción de hexametildiamina a partir de 6-aminocaproato en los Ejemplos XX y XXVII. Se describe una vía para producir 6-aminocaproato y/o hexametildiamina a partir de glutamato en los Ejemplos XXIV y XXV. Se describen varias vías para la producción de hexametildiamina a partir de glutaril-CoA y al menos una vía para la producción de 6-aminocaproato a partir de glutaril-CoA en los Ejemplos XXIV y XXV. Se describe una vía para producir 6-aminocaproato a partir de homolisina en el Ejemplo XXV. Se describen vías para producir hexametildiamina a partir de 2-amino-7-oxosubarato en el Ejemplo XXIV. Se describen varias vías para producir 6-aminocaproato en el Ejemplo XXV. Se describen ejemplos de genes y enzimas que se necesitan para construir microbios con estas capacidades, así como métodos para la clonación y transformación, la supervisión de la formación de productos y el uso de los microorganismos modificados genéticamente para la producción.

Como se describe en la presente memoria, se describen seis vías diferentes para la síntesis de ácido adípico mediante el uso de glucosa/sacarosa como un sustrato de carbono. Para todos los cálculos de rendimientos máximos, las reacciones faltantes en una vía determinada se añadieron a la red estequiométrica de la *E. coli* en SimPheny que es similar a la descrita anteriormente (Reed et ál., Genome Biol. 4:R54 (2003)). El adipato es una molécula cargada en condiciones fisiológicas y se presumía que necesitaba energía en forma de un sistema de simporte basado en protones para ser secretado fuera de la red. Un sistema de transporte de ese tipo es viable desde el punto de vista termodinámico si las fermentaciones se llevan a cabo con un pH neutro o casi neutro. La formación de ácido adípico con un pH bajo necesitaría un mecanismo de exportación dependiente de ATP, por ejemplo, el sistema ABC en oposición al simporte de protones. Las reacciones en las vías y los métodos de implementación de estas vías se describen en los Ejemplos I-XI.

Como se usa en la presente memoria, se pretende que la expresión «de origen no natural», cuando se usa en referencia a un microorganismo u organismo microbiano de la invención, signifique que el organismo microbiano tiene al menos una alteración genética que no se encuentra necesariamente en una cepa de origen natural de la especie mencionada, lo cual incluye las cepas de tipo salvaje de la especie mencionada. Las alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, modificaciones que introduzcan ácidos nucleicos expresables que codifiquen polipéptidos metabólicos, otras adiciones de ácidos nucleicos, eliminaciones de ácidos nucleicos y/u otra alteración funcional del material genético microbiano. Esas modificaciones incluyen, por ejemplo, regiones de codificación y fragmentos funcionales de las mismas, para polipéptidos heterólogos y/u homólogos para la especie mencionada. Las modificaciones adicionales incluyen, por ejemplo, regiones reguladoras no codificantes en las que las modificaciones

alteren la expresión de un gen u operón. Los ejemplos de polipéptidos metabólicos incluyen enzimas dentro de una vía biosintética de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico.

Una modificación metabólica hace referencia a una reacción bioquímica alterada con respecto a su estado de origen natural. Por lo tanto, los microorganismos de origen no natural pueden tener modificaciones genéticas con respecto a los ácidos nucleicos que codifiquen polipéptidos metabólicos, o fragmentos funcionales de los mismos. En la presente memoria se describen ejemplos de modificaciones metabólicas.

Como se usa en la presente memoria, se pretende que el término «aislado», cuando se usa en referencia a un organismo microbiano, haga referencia a un organismo sustancialmente libre de al menos un componente tal como el organismo microbiano de referencia se encuentra en la naturaleza. El término incluye un organismo microbiano que se remueve de parte o la totalidad de los componentes tal como se encuentra en su entorno natural. El término también incluye un organismo microbiano que se remueve de parte o la totalidad de los componentes tal como el organismo microbiano se encuentra en entornos de origen no natural. Por lo tanto, un organismo microbiano aislado se separa parcial o totalmente de otras sustancias tal como se encuentra en la naturaleza o tal como se desarrolla, almacena o conserva en entornos de origen no natural. Los ejemplos específicos de organismos microbianos aislados incluyen microbios parcialmente puros, microbios sustancialmente puros y microbios cultivados en un medio de origen no natural.

Como se usa en la presente memoria, se pretende que las expresiones «microbiano», «organismo microbiano» o «microorganismo» hagan referencia a cualquier organismo que exista como una célula microscópica incluida dentro de los dominios de arqueas, bacterias o eucariotas. Por lo tanto, se pretende que la expresión abarque organismos o células procariotas y eucariotas con un tamaño microscópico e incluye bacterias, arqueas y eubacterias de todas las especies, así como microorganismos eucariotas tales como levaduras y hongos. La expresión también incluye cultivos celulares de cualquier especie que pueden cultivarse para la producción de un bioquímico.

Como se usa en la presente memoria, se pretende que la expresión «CoA» o «coenzima A» haga referencia a un grupo prostético o cofactor orgánico (parte no proteica de una enzima) cuya presencia sea necesaria para la actividad de muchas enzimas (la apoenzima) para formar un sistema enzimático activo. La coenzima A funciona en determinadas 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 otras clases de acetilación.

Como se usa en la presente memoria, el «adipato» con 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 comprende que se puede usar adipato y ácido adípico de manera intercambiable en la presente para hacer referencia al compuesto en cualquiera de sus formas neutras o ionizadas, incluida cualquier forma de sal de las mismas. Los expertos comprenden que la forma específica dependerá del pH.

Como se usa en la presente memoria, el «6-aminocaproato» con la fórmula química $\text{-OOC-(CH}_2\text{)}_5\text{-NH}_2$ (véanse las Figuras 8 y 12) es la forma ionizada de ácido 6-aminocaproico (nombre IUPAC: ácido 6-aminohexanoico), y se comprende que se puede usar 6-aminocaproato y ácido 6-aminocaproico de manera intercambiable en la presente para hacer referencia al compuesto en cualquiera de sus formas neutras o ionizadas, incluida cualquier forma de sal de las mismas. Los expertos comprenden que la forma específica dependerá del pH.

Como se usa en la presente memoria, la «caprolactama» (nombre IUPAC: azepan-2-ona) es una lactama de ácido 6-aminohexanoico (véase la Figura 8).

Como se usa en la presente memoria, la «hexametilendiamina», a la que también se hace referencia como «1,6-diaminohexano» o «1,6-hexanodiamina», tiene la fórmula química $\text{H}_2\text{N(CH}_2\text{)}_6\text{NH}_2$ (véanse las Figuras 10, 11 y 13).

Como se usa en la presente memoria, se pretende que la expresión «sustancialmente anaerobia», cuando se usa en referencia a una condición de desarrollo o cultivo, signifique que la cantidad de oxígeno es de menos de aproximadamente 10 % de saturación para el oxígeno disuelto en medios líquidos. También se pretende que la expresión incluya cámaras selladas de medio líquido o sólido que se mantengan con una atmósfera de menos de aproximadamente 1 % de oxígeno.

Como se usa en la presente memoria, se pretende que el término «osmoprotector», cuando se usa en referencia a una condición de desarrollo o cultivo, haga referencia a un compuesto que actúa como un osmolito y ayuda a que un organismo microbiano descrito en la presente memoria sobreviva al estrés osmótico. Los osmoprotectores incluyen, por ejemplo, betainas, aminoácidos y el azúcar trehalosa. Los ejemplos no taxativos de estos incluyen glicina betaína, pralina betaína, dimetiltetina, dimetilsulfoniopropionato, 3-dimetilsulfonio-2-metilpropionato, ácido pípécólico, dimetilsulfonioacetato, colina, L-carnitina y ectoína.

Como se usa en la presente memoria, se pretende que la expresión «acoplada al desarrollo», cuando se usa en referencia a la producción de un bioquímico signifique que la biosíntesis del bioquímico mencionado se produce durante la fase de desarrollo de un microorganismo. En una realización particular, la producción acoplada al desarrollo puede ser obligatoria, lo cual significa que la biosíntesis del bioquímico mencionado es un producto obligatorio producido durante la fase de desarrollo de un microorganismo.

Como se usa en la presente memoria, se pretende que una «modificación metabólica» haga referencia a una reacción bioquímica alterada con respecto a su estado de origen natural. Las modificaciones metabólicas pueden incluir, por ejemplo, la eliminación de una actividad de reacción bioquímica mediante alteraciones funcionales de uno o más genes que codifiquen una enzima que participe en la reacción. En la presente memoria se describen conjuntos de ejemplos de modificaciones metabólicas (véase el Ejemplo XXX).

Como se usa en la presente memoria, se pretende que la expresión «alteración genética», o equivalentes gramaticales de la misma, haga referencia a una alteración genética que inactive el producto génico codificado. La alteración genética puede ser, por ejemplo, la eliminación del gen en su totalidad, la eliminación de una secuencia reguladora necesaria para la transcripción o traducción, la eliminación de una parte del gen que produzca un producto génico truncado, o mediante cualquiera de las diversas estrategias de mutación que inactivan el producto génico codificado. Un método particularmente útil de alteración genética es la eliminación del gen en su totalidad, dado que esta reduce o elimina la aparición de reversiones genéticas en los microorganismos de origen no natural de la invención.

Se pretende que «exógeno/a», como se usa en la presente memoria, signifique que la molécula mencionada o la actividad mencionada se introduce en el organismo microbiano hospedador. La molécula puede introducirse, por ejemplo, mediante la introducción de un ácido nucleico de codificación en el material genético hospedador tal como mediante la integración en un cromosoma hospedador o como material genético no cromosómico tal como un plásmido. Por lo tanto, el término, cuando se usa en referencia a la expresión de un ácido nucleico de codificación, hace referencia a la introducción del ácido nucleico de codificación en forma expresable en el organismo microbiano. Cuando se usa en referencia a una actividad biosintética, el término hace referencia a una actividad que se introduce en el organismo hospedador de referencia. La fuente puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico de codificación homólogo o heterólogo que exprese la actividad mencionada luego de la introducción en el organismo microbiano hospedador. Por lo tanto, el término «endógeno/a» hace referencia a una molécula o actividad mencionada presente en el hospedador. De manera similar, el término, cuando se usa en referencia a la expresión de un ácido nucleico de codificación, hace referencia a la expresión de un ácido nucleico de codificación contenido dentro del organismo microbiano. El término «heterólogo/a» hace referencia a una molécula o actividad derivada de una fuente que no sea la especie mencionada, mientras que «homólogo/a» hace referencia a una molécula o actividad derivada del organismo microbiano hospedador. Por consiguiente, la expresión exógena de un ácido nucleico de codificación de la invención puede utilizar un ácido nucleico de codificación heterólogo y/u homólogo.

Se comprende que, cuando se incluye más de un ácido nucleico exógeno en un organismo microbiano, esos ácidos nucleicos exógenos hacen referencia al ácido nucleico de codificación o la actividad biosintética que se mencionan, como se describió anteriormente. Se comprende además, como se describe en la presente memoria, que esos ácidos nucleicos exógenos pueden introducirse en el organismo microbiano hospedador en moléculas de ácido nucleico separadas, en moléculas de ácido nucleico de carácter policistrónico, o una combinación de las mismas, y aun así considerarse más de un ácido nucleico exógeno. Por ejemplo, como se describe en la presente memoria, un organismo microbiano puede modificarse genéticamente para que exprese dos o más ácidos nucleicos exógenos que codifiquen una proteína o enzima de la vía deseada. En caso de que dos ácidos nucleicos exógenos que codifiquen una actividad deseada se introduzcan en un organismo microbiano hospedador, se comprende que los dos ácidos nucleicos exógenos pueden introducirse como un solo ácido nucleico, por ejemplo, en un solo plásmido, en plásmidos separados, pueden integrarse en el cromosoma hospedador en un solo sitio o múltiples sitios, y aun así considerarse dos ácidos nucleicos exógenos. De manera similar, se comprende que más de dos ácidos nucleicos exógenos pueden introducirse en un organismo hospedador en cualquier combinación deseada, por ejemplo, en un solo plásmido, en plásmidos separados, pueden integrarse en el cromosoma hospedador en un solo sitio o múltiples sitios, y aun así considerarse dos o más ácidos nucleicos exógenos, por ejemplo, tres ácidos nucleicos exógenos. Por lo tanto, la cantidad de ácidos nucleicos exógenos o actividades biosintéticas que se menciona hace referencia a la cantidad de ácidos nucleicos de codificación o la cantidad de actividades biosintéticas, no a la cantidad de ácidos nucleicos separados introducidos en el organismo hospedador.

Los organismos microbianos de origen no natural de la invención pueden contener alteraciones genéticas estables, lo cual hace referencia a microorganismos que pueden cultivarse durante más de cinco generaciones sin la pérdida de la alteración. Por lo general, las alteraciones genéticas estables incluyen modificaciones que persisten más de 10 generaciones, las modificaciones particularmente estables persistirán más de 25 generaciones y, más particularmente, las modificaciones genéticas estables durarán más de 50 generaciones, incluso por un lapso indefinido.

En el caso de las alteraciones genéticas, una alteración genética estable particularmente útil es una eliminación genética. El uso de una eliminación genética para introducir una alteración genética estable es particularmente útil para reducir la probabilidad de una reversión a un fenotipo antes de la alteración genética. Por ejemplo, la producción acoplada al desarrollo estable de un bioquímico puede lograrse, por ejemplo, mediante la eliminación de un gen que codifique una enzima que catalice una o más reacciones dentro de un conjunto de modificaciones metabólicas. La estabilidad de la producción acoplada al desarrollo de un bioquímico puede mejorarse de manera adicional a través de múltiples eliminaciones, que reduzcan de manera significativa la probabilidad de que se produzcan múltiples reversiones compensadoras para cada actividad alterada.

Los expertos en la técnica comprenderán que las alteraciones genéticas, incluidas las modificaciones metabólicas ejemplificadas en la presente memoria, se describen con respecto a un organismo hospedador adecuado tal como la *E. coli* y sus reacciones metabólicas correspondientes o un organismo de origen adecuado para el material genético deseado tal como genes para una vía metabólica deseada. Sin embargo, teniendo en cuenta la secuenciación del genoma completo de una amplia variedad de organismos y el alto nivel de conocimiento en el área de la genómica, los expertos en la técnica serán capaces de aplicar fácilmente las indicaciones y los lineamientos que se proporcionan en la presente memoria esencialmente a todos los demás organismos. Por ejemplo, las alteraciones metabólicas de la *E. coli* que se ejemplifican en la presente memoria pueden aplicarse fácilmente a otras especies mediante la incorporación del mismo ácido nucleico de codificación o uno análogo de especies que no sean la especie mencionada. Esas alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, alteraciones genéticas de, en general, homólogos de especies y, en particular, desplazamientos de genes ortólogos, parálogos o no ortólogos.

Un ortólogo es uno o más genes relacionados en ascendencia vertical y que 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 hidrólisis de epóxidos. Los genes están relacionados en ascendencia vertical cuando, por ejemplo, comparten similitud de secuencia en un grado suficiente como para indicar que son homólogos, o relacionados por la evolución a partir de un ancestro común. Los genes también pueden considerarse ortólogos si comparten una estructura tridimensional pero no necesariamente una similitud de secuencia, en un grado suficiente como 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 ortólogos pueden codificar proteínas con una similitud de secuencia de aproximadamente 25 % a 100 % de identidad en la secuencia de aminoácidos. Los genes que codifican proteínas que comparten una similitud de aminoácidos de menos del 25 % también se puede considerar que han surgido mediante ascendencia vertical si su estructura tridimensional también muestra similitudes. Se considera que los miembros de la familia de enzimas de las serinas proteasas, incluido el activador de plasminógeno tisular y la elastasa, han surgido mediante ascendencia vertical a partir de un ancestro común.

Los ortólogos incluyen genes o sus productos génicos codificados que mediante, por ejemplo, evolución, han divergido en cuanto a su estructura o actividad general. Por ejemplo, cuando una especie codifica un producto génico que presenta dos funciones y cuando esas 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 bioquímico, los expertos en la técnica comprenderán que el gen ortólogo que alberga la actividad metabólica que se ha de introducir o alterar se seleccionará para la construcción del microorganismo de origen no natural. Un ejemplo de ortólogos que presentan actividades separables es cuando distintas actividades se han separado en productos génicos distintos entre dos o más especies o dentro de una sola especie. Un ejemplo específico es la separación de la proteólisis de la elastasa y la proteólisis del plasminógeno, dos tipos de actividad de serinas proteasas, en moléculas distintas tales como el activador del plasminógeno y la elastasa. Un segundo ejemplo es la separación de la actividad de micoplasma 5'-3' exonucleasa y la ADN polimerasa III de *Drosophila*. La ADN polimerasa de la primera especie puede considerarse un ortólogo de la exonucleasa y/o la polimerasa de la segunda especie y viceversa.

En cambio, los parálogos son homólogos relacionados mediante, por ejemplo, la duplicación seguida por la divergencia en la evolución y tienen funciones similares o comunes, pero no idénticas. Los parálogos pueden originarse o derivar de, por ejemplo, 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 dado que representan dos enzimas distintas, con evolución conjunta a partir de un ancestro común, que catalizan reacciones distintas y tienen funciones distintas en la misma especie. Los parálogos son proteínas de la misma especie con una similitud de secuencia significativa entre sí, lo cual sugiere que son homólogos, o que se relacionan a través de la evolución conjunta a partir de un ancestro común. Los grupos de familias de proteínas parálogas incluyen homólogos de HipA, genes de luciferasa, peptidasas, y otros.

Un desplazamiento de gen no ortólogo es un gen no ortólogo de una especie que puede sustituirse por una función genética mencionada en una especie diferente. La sustitución incluye, por ejemplo, la capacidad de realizar sustancialmente la misma función o una similar en la especie de origen en comparación con la función mencionada en la especie diferente. Aunque, en términos generales, un desplazamiento de gen no ortólogo se podrá identificar como relacionado estructuralmente con un gen conocido que codifique la función mencionada, los genes menos relacionados estructuralmente pero funcionalmente similares y sus correspondientes productos génicos también entrarán dentro del significado de la expresión como se usa en la presente memoria. La similitud funcional requiere, por ejemplo, al menos cierta similitud estructural en el sitio activo o la región de unión de un producto génico no ortólogo en comparación con un gen que codifica la función que se busca sustituir. Por lo tanto, un gen no ortólogo incluye, por ejemplo, un parálogo o un gen no relacionado.

Por lo tanto, a la hora de identificar y construir los organismos microbianos de origen no natural de la invención con capacidad de biosíntesis de 6-hexametilendiamina y opcionalmente ácido 6 aminocaproico, los expertos en la técnica comprenderán con la aplicación de las indicaciones y los lineamientos que se proporcionan en la presente memoria 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 se encuentren presentes desplazamientos de genes no

ortólogos y/o parálogos en el microorganismo mencionado que codifiquen una enzima que catalice una reacción metabólica similar o sustancialmente similar, los expertos en la técnica también pueden utilizar estos genes relacionados desde el punto de vista de la evolución. En las estrategias de alteración genética, los genes relacionados desde el punto de vista de la evolución también pueden alterarse o eliminarse en un organismo microbiano hospedador, parálogos u ortólogos, para reducir o eliminar actividades para garantizar que ninguna redundancia funcional en las actividades enzimáticas seleccionadas para la alteración provoque un cortocircuito en las modificaciones metabólicas diseñadas.

Los desplazamientos de genes ortólogos, parálogos y no ortólogos pueden determinarse mediante métodos muy conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la inspección de secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos para dos polipéptidos revelará la identidad de secuencia y similitudes entre las secuencias comparadas. En función de esas similitudes, el experto en la técnica puede determinar si la similitud es lo suficientemente alta como para indicar que las proteínas están relacionadas a través de la evolución a partir de un ancestro común. Algoritmos muy 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 importancia de los huecos en la secuencia, a los que se les puede asignar una ponderación o un puntaje. Esos algoritmos también son conocidos en la técnica y son aplicables de manera similar para determinar la similitud o identidad de secuencias de nucleótidos. Los parámetros para la similitud suficiente para determinar una relación se computan en función de métodos muy 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 también puede ser optimizada visualmente, si se desea, por los expertos en la técnica. Se puede esperar que productos génicos o proteínas relacionadas tengan una gran similitud, por ejemplo, una identidad de secuencia de 25 % a 100 %. Las proteínas no relacionadas pueden tener una identidad que sea esencialmente la misma que se esperaría de manera azarosa, si se busca en una base de datos de tamaño suficiente (aproximadamente 5 %). Las secuencias entre el 5 % y el 24 % pueden representar o no una homología suficiente como para concluir que las secuencias comparadas están relacionadas. Se puede llevar a cabo un análisis estadístico adicional para determinar la importancia de esas coincidencias dado el tamaño del conjunto de datos para determinar la relevancia de estas secuencias.

Los ejemplos de parámetros para determinar la relación de dos o más secuencias mediante el uso del algoritmo BLAST, por ejemplo, pueden ser como se indicará a continuación. En resumen, se pueden realizar alineaciones de secuencias de aminoácidos mediante el uso de BLASTP versión 2.0.8 (05-ene-1999) y los siguientes parámetros: Matriz: 0 BLOSUM62; hueco abierto: 11; extensión de hueco: 1; x_abandono: 50; expectativa: 10,0; tamaño de palabra: 3; filtro: activado. Se pueden realizar alineaciones de secuencias de ácidos nucleicos mediante el uso de BLASTN versión 2.0.6 (16-sep-1998) y los siguientes parámetros: Coincidencia: 1; falta de coincidencia: -2; hueco abierto: 5; extensión de hueco: 2; x_abandono: 50; expectativa: 10,0; tamaño de palabra: 11; filtro: desactivado. Los expertos en la técnica sabrán qué modificaciones pueden realizarse en los parámetros anteriores para aumentar o disminuir la rigurosidad de la comparación, por ejemplo, y determinar la relación entre dos o más secuencias.

En la presente memoria, se describen organismos microbianos de origen no natural capaces de producir adipato, ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico. Por ejemplo, una vía de adipato puede ser una vía de degradación de adipato inversa (véanse los Ejemplos I y II). Por ejemplo, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de adipato que incluya al menos un ácido nucleico exógeno que codifique una enzima de la vía de adipato expresada en una cantidad suficiente como para producir adipato, donde la vía de adipato incluya 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 vía de adipato puede ser a través de una vía de 3-oxoadipato (véanse los Ejemplos III y IV). Un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de adipato que incluya al menos un ácido nucleico exógeno que codifique una enzima de la vía de adipato expresada en una cantidad suficiente como para producir adipato, donde la vía de adipato incluya succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-oxoadipil-CoA transferasa, 3-oxoadipato reductasa, 3-hidroxiadipato deshidratasa y 2-enoato reductasa.

De manera adicional, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de ácido 6-aminocaproico que incluya al menos un ácido nucleico exógeno que codifique una enzima de la vía de ácido 6-aminocaproico expresada en una cantidad suficiente como para producir ácido 6-aminocaproico, donde la vía de ácido 6-aminocaproico incluya aldehído deshidrogenasa y transaminasa dependiente de CoA (véanse los Ejemplos VIII y IX). De manera alternativa, se puede usar 6-aminocaproato deshidrogenasa para convertir adipato semialdehído para formar 6-aminocaproato (véase la Figura 8). Un organismo microbiano de origen no natural también puede tener una vía de caprolactama que incluya al menos un ácido nucleico exógeno que codifique una enzima de la vía de caprolactama expresada en una cantidad suficiente como para producir caprolactama, donde la vía de caprolactama incluya aldehído deshidrogenasa, transaminasa o 6-aminocaproato deshidrogenasa y amidohidrolasa dependiente de CoA (véanse los Ejemplos VIII y IX).

Como se describe en la presente memoria, un organismo productor de ácido 6-aminocaproico o caprolactama 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 comprende que un organismo microbiano productor de ácido 6-aminocaproico o

una caprolactama puede incluir además una vía para producir adipil-CoA. Por ejemplo, una vía de adipil-CoA puede incluir las enzimas de la Figura 2 que utilicen succinil-CoA y acetil-CoA como precursores a través de la producción de adipil-CoA, es decir, que carezcan de una enzima para la etapa final de conversión de adipil-CoA en adipato. Por lo tanto, un ejemplo de vía de adipil-CoA puede incluir succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa y 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa.

Además, como se muestra en la Figura 1, una vía de degradación de adipato incluye la etapa de conversión de adipato en adipil-CoA mediante una adipato CoA ligasa. Por lo tanto, una vía de adipil-CoA puede ser una vía de adipato que incluya además una actividad enzimática que convierta adipato en adipil-CoA, lo cual incluye por ejemplo la actividad de la adipato-CoA ligasa como en la primera etapa de la Figura 1 o cualquiera de las enzimas en la etapa final de la Figura 2 llevada a cabo en la dirección inversa, por ejemplo, cualquiera de las siguientes: adipil-CoA sintetasa (a la que también se hace referencia como «adipato Co-A ligasa»), fosfotransadipilasa/adipato cinasa, adipil-CoA:acetil-CoA transferasa o adipil-CoA hidrolasa. Una enzima con actividad de conversión de adipato en adipil-CoA puede ser una actividad endógena o puede proporcionarse como un ácido nucleico exógeno que codifique la enzima, como se describe en la presente memoria. Por lo tanto, se comprende que se puede utilizar cualquier vía de adipato con una actividad enzimática de conversión de adipato en adipil-CoA para generar una vía de adipil-CoA. Una vía de ese tipo puede incluirse en un organismo microbiano productor de ácido 6-aminocaproico o caprolactama para proporcionar un precursor de adipil-CoA para la producción de ácido 6-aminocaproico y/o caprolactama.

Un ejemplo adicional de vía de adipato utiliza alfa-cetoadipato como un precursor (véase la Figura 6 y el Ejemplo VI). Por ejemplo, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de adipato que incluya al menos un ácido nucleico exógeno que codifique una enzima de la vía de adipato expresada en una cantidad suficiente como para producir adipato, donde la vía de adipato incluya homocitrato sintasa, homoaconitasa, homoisocitrato deshidrogenasa, 2-cetoadipato reductasa, alfa-hidroxiadipato deshidratasa y oxidorreductasa. Un ejemplo adicional de vía de adipato utiliza una vía de degradación de lisina (véase la Figura 7 y el Ejemplo VII). Otro organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de adipato que incluya al menos un ácido nucleico exógeno que codifique una enzima de la vía de adipato expresada en una cantidad suficiente como para producir adipato, donde la vía de adipato incluya carbonitrógeno liasa, oxidorreductasa, transaminasa y oxidorreductasa.

Incluso otro ejemplo de vía de adipato utiliza alfa-cetoadipato como un precursor (véase la Figura 9 y los Ejemplos X y XI). Por lo tanto, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de adipato que incluya al menos un ácido nucleico exógeno que codifique una enzima de la vía de adipato expresada en una cantidad suficiente como para producir adipato, donde la vía de adipato incluya 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. De manera adicional, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de adipato que incluya al menos un ácido nucleico exógeno que codifique una enzima de la vía de adipato expresada en una cantidad suficiente como para producir adipato, donde la vía de adipato incluya 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.

En la presente memoria, se describe un organismo microbiano de origen no natural, lo cual incluye un organismo microbiano con una vía de ácido 6-aminocaproico que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido 6-aminocaproico expresada en una cantidad suficiente como para producir ácido 6-aminocaproico, donde la vía de ácido 6-aminocaproico incluye 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA tiolasa; 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA reductasa; 3-hidroxi-6-aminohexanoil-CoA deshidratasa; 6-aminohex-2-enoil-CoA reductasa; y 6-aminocaproil-CoA/acil-CoA transferasa, 6-aminocaproil-CoA sintasa o 6-aminocaproil-CoA hidrolasa (véanse los Ejemplos XII y XIII; etapas A/B/C/D/K/L/M de la Figura 11). En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural, lo cual incluye un organismo microbiano con una vía de ácido 6-aminocaproico que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido 6-aminocaproico expresada en una cantidad suficiente como para producir ácido 6-aminocaproico, donde la vía de ácido 6-aminocaproico incluye 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA tiolasa; 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA/acil-CoA transferasa, 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA sintasa, o 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA hidrolasa; 3-oxo-6-aminohexanoato reductasa; 3-hidroxi-6-aminohexanoato deshidratasa; y 6-aminohex-2-enoato reductasa (véanse los Ejemplos XII y XIV; etapas A/E/F/G/H/I/J de la Figura 11).

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural, lo cual incluye un organismo microbiano con una vía de caprolactama que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de caprolactama expresada en una cantidad suficiente como para producir caprolactama, donde la vía de caprolactama incluye 6-aminocaproil-CoA/acil-CoA transferasa o 6-aminocaproil-CoA sintasa (véanse los Ejemplos XII y XV; etapas K/L de la Figura 11). Un organismo microbiano de origen no natural de ese tipo que contiene una vía de caprolactama puede comprender además una vía de ácido 6-aminocaproico (véase la Figura 11). Los ejemplos de vías de ácido 6-aminocaproico incluyen la vía de ácido 6-aminocaproico que incluye la aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA; y transaminasa o 6-aminocaproato deshidrogenasa o la vía de ácido

6-aminocaproico que incluye 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA tiolasa; 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA/acil-CoA transferasa, 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA sintasa, o 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA hidrolasa; 3-oxo-6-aminohexanoato reductasa; 3-hidroxi-6-aminohexanoato deshidratasa; y 6-aminohex-2-enoato reductasa (etapas A/E/F/G/H/I/J de la Figura 11). Se comprende que estos u otros ejemplos de vías de ácido 6-aminocaproico que se describen en la presente memoria pueden incluirse de manera adicional en un organismo microbiano que tenga una vía de caprolactama, si se desea. La invención también proporciona un organismo microbiano de origen no natural, lo cual incluye un organismo microbiano con una vía de hexametilendiamina que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de hexametilendiamina expresada en una cantidad suficiente como para producir hexametilendiamina, donde la vía de hexametilendiamina incluye 6-aminocaproil-CoA/acil-CoA transferasa o 6-aminocaproil-CoA sintasa; 6-aminocaproil-CoA reductasa (formadora de aldehído); y hexametilendiamina transaminasa o hexametilendiamina deshidrogenasa (véanse los Ejemplos XII y XVI; etapas K/L/N/O/P de la Figura 11). Un organismo microbiano de origen no natural de ese tipo que contiene una vía de hexametilendiamina puede comprender además una vía de ácido 6-aminocaproico (véase la Figura 11). Los ejemplos de vías de ácido 6-aminocaproico incluyen la vía de ácido 6-aminocaproico que incluye la aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA; y transaminasa o 6-aminocaproato deshidrogenasa o la vía de ácido 6-aminocaproico que incluye 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA tiolasa; 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA/acil-CoA transferasa, 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA sintasa, o 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA hidrolasa; 3-oxo-6-aminohexanoato reductasa; 3-hidroxi-6-aminohexanoato deshidratasa; y 6-aminohex-2-enoato reductasa (etapas A/E/F/G/H/I/J de la Figura 11). Se comprende que estos u otros ejemplos de vías de ácido 6-aminocaproico que se describen en la presente memoria pueden incluirse de manera adicional en un organismo microbiano que tenga una vía de hexametilendiamina, si se desea.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de caprolactama que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de caprolactama expresada en una cantidad suficiente como para producir caprolactama, donde la vía de caprolactama incluye 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA tiolasa; 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA reductasa; 3-hidroxi-6-aminohexanoil-CoA deshidratasa; y 6-aminohex-2-enoil-CoA reductasa (véanse los Ejemplos XII y XVII; etapas A/B/C/D de la Figura 11). También se proporciona un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de hexametilendiamina expresada en una cantidad suficiente como para producir hexametilendiamina, donde la vía de hexametilendiamina incluye 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA tiolasa; 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA reductasa; 3-hidroxi-6-aminohexanoil-CoA deshidratasa; 6-aminohex-2-enoil-CoA reductasa; 6-aminocaproil-CoA reductasa (formadora de aldehído); y hexametilendiamina transaminasa o hexametilendiamina deshidrogenasa (véanse los Ejemplos XII y XVIII; etapas A/B/C/D/N/O/P de la Figura 11).

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato (HODH) aldolasa, una 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) hidratasa, una 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) reductasa, una 2-oxoheptano-1,7-dioato (2-OHD) descarboxilasa, una adipato semialdehído aminotransferasa, una adipato semialdehído oxidorreductasa (de aminación), una 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) descarboxilasa, una 6-oxohex-4-enoato (6-OHE) reductasa, una 2-oxoheptano-1,7-dioato (2-OHD) aminotransferasa, una 2-oxoheptano-1,7-dioato (2-OHD) oxidorreductasa (de aminación), una 2-aminoheptano-1,7-dioato (2-AHD) descarboxilasa, una 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) aminotransferasa, una 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) oxidorreductasa (de aminación), una 2-aminohept-4-eno-1,7-dioato (2-AHE) reductasa, una 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato (HODH) formiato-liasa, una 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato (HODH) deshidrogenasa, una 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, una 2,3-deshidroadipil-CoA reductasa, una adipil-CoA deshidrogenasa, una 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) formiato-liasa, una 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) deshidrogenasa, una 2-oxoheptano-1,7-dioato (2-OHD) formiato-liasa, una 2-oxoheptano-1,7-dioato (2-OHD) deshidrogenasa, o una enzima de activación de piruvato formiato-liasa (véanse los Ejemplos XIX y XXI; etapas A-Q de la Figura 12). En un aspecto adicional, la vía de 6-ACA incluye una semialdehído succínico deshidrogenasa, una alfa-cetoglutarato descarboxilasa o una fosfoenolpiruvato (PEP) carboxinasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED reductasa; una 2-OHD descarboxilasa; o una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidorreductasa (de aminación) (véanse los Ejemplos XIX y XXI; etapas A/B/C/D/E de la Figura 12). En un aspecto adicional, la vía de 6-ACA incluye una semialdehído succínico deshidrogenasa, una alfa-cetoglutarato descarboxilasa o una fosfoenolpiruvato (PEP) carboxinasa. En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 6-ACA, en donde el conjunto codifica una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED reductasa; una 2-OHD descarboxilasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidorreductasa (de aminación).

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una HODH

aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED descarboxilasa; una 6-OHE reductasa; o una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidorreductasa (de aminación) (véanse los Ejemplos XIX y XXI; etapas A/B/F/G/E de la Figura 12). En un aspecto adicional, la vía de 6-ACA incluye una semialdehído succínico deshidrogenasa, una alfa-cetoglutarato descarboxilasa o una fosfoenolpiruvato (PEP) carboxicinasa. En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 6-ACA, donde el conjunto codifica una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED descarboxilasa; una 6-OHE reductasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidorreductasa (de aminación).

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED aminotransferasa o una OHED oxidorreductasa (de aminación); una 2-AHE reductasa; o una 2-AHD descarboxilasa (véanse los Ejemplos XIX y XXI; etapas A/B/J/D/I de la Figura 12). En un aspecto adicional, la vía de 6-ACA incluye una semialdehído succínico deshidrogenasa, una alfa-cetoglutarato descarboxilasa o una fosfoenolpiruvato (PEP) carboxicinasa. En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 6-ACA, donde el conjunto codifica una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED aminotransferasa o una OHED oxidorreductasa (de aminación); una 2-AHE reductasa; y una 2-AHD descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED reductasa; una 2-OHD aminotransferasa o una 2-OHD oxidorreductasa (de aminación); o una 2-AHD descarboxilasa (véanse los Ejemplos XIX y XXI; etapas A/B/C/H/I de la Figura 12). En un aspecto adicional, la vía de 6-ACA incluye una semialdehído succínico deshidrogenasa, una alfa-cetoglutarato descarboxilasa o una fosfoenolpiruvato (PEP) carboxicinasa. En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 6-ACA, donde el conjunto codifica una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED reductasa; una 2-OHD aminotransferasa o una 2-OHD oxidorreductasa (de aminación); y una 2-AHD descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una HODH formiato-liasa y una enzima de activación de piruvato formiato-liasa o una HODH deshidrogenasa; una 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa; una 2,3-deshidroadiipil-CoA reductasa; una adipil-CoA deshidrogenasa; o una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidorreductasa (de aminación) (véanse los Ejemplos XIX y XXI; etapas A/L/M/N/O/E de la Figura 12). En un aspecto adicional, la vía de 6-ACA incluye una semialdehído succínico deshidrogenasa, una alfa-cetoglutarato descarboxilasa o una fosfoenolpiruvato (PEP) carboxicinasa. En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 6-ACA, donde el conjunto codifica una HODH aldolasa; una HODH formiato-liasa y una enzima de activación de piruvato formiato-liasa o una HODH deshidrogenasa; una 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa; una 2,3-deshidroadiipil-CoA reductasa; una adipil-CoA deshidrogenasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidorreductasa (de aminación).

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED formiato-liasa y una enzima de activación de piruvato formiato-liasa u OHED deshidrogenasa; una 2,3-deshidroadiipil-CoA reductasa; una adipil-CoA deshidrogenasa; o una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidorreductasa (de aminación) (véanse los Ejemplos XIX y XXI; etapas A/B/P/N/O/E de la Figura 12). En un aspecto adicional, la vía de 6-ACA incluye una semialdehído succínico deshidrogenasa, una alfa-cetoglutarato descarboxilasa o una fosfoenolpiruvato (PEP) carboxicinasa. En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 6-ACA, donde el conjunto codifica una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED formiato-liasa y una enzima de activación de piruvato formiato-liasa u OHED deshidrogenasa; una 2,3-deshidroadiipil-CoA reductasa; una adipil-CoA deshidrogenasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidorreductasa (de aminación).

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED reductasa; una 2-OHD formiato-liasa y una enzima de activación de piruvato formiato-liasa o una 2-OHD deshidrogenasa; una adipil-CoA deshidrogenasa; o una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidorreductasa (de aminación) (véanse los Ejemplos XIX y XXI; etapas A/B/C/Q/O/E de la Figura 12). En un aspecto adicional, la vía de 6-ACA incluye una semialdehído succínico

deshidrogenasa, una alfa-cetoglutarato descarboxilasa o una fosfoenolpiruvato (PEP) carboxicinas. En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 6-ACA, donde el conjunto codifica una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED reductasa; una 2-OHD formiato-liasa y una enzima de activación de piruvato formiato-liasa o una 2-OIID deshidrogenasa; una adipil-CoA deshidrogenasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidorreductasa (de aminación). En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una glutamil-CoA transferasa, una glutamil-CoA ligasa, una beta-cetotiolasa, una 3-oxo-6-aminopimeloil-CoA oxidorreductasa, una 3-hidroxi-6-aminopimeloil-CoA deshidratasa, una 6-amino-7-carboxihept-2-enoil-CoA reductasa, una 6-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído) o una 2-aminopimelato descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXV y XXVI; etapas A/B/C/D/E/I/J de la Figura 20). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 6-ACA, donde el conjunto codifica una glutamil-CoA transferasa o glutamil-CoA ligasa; una beta-cetotiolasa; una 3-oxo-6-aminopimeloil-CoA oxidorreductasa; una 3-hidroxi-6-aminopimeloil-CoA deshidratasa; una 6-amino-7-carboxihept-2-enoil-CoA reductasa; 6-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído); y una 2-aminopimelato descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una glutaril-CoA beta-cetotiolasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa, 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa o una 2-aminopimelato descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXV y XXVI; etapas A/B/J/T/AA de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 6-ACA, donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotiolasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa; y una 2-aminopimelato descarboxilasa. En la presente memoria, se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una homolisina 2-monooxigenasa (véanse los Ejemplos XXV y XXVI; etapa A de la Figura 23). En un aspecto adicional, la vía de 6-ACA incluye la hidrólisis del producto de 6-aminohexanamida por parte de una base o un ácido en dilución para convertir 6-aminohexanamida en 6-aminocaproato (véanse los Ejemplos XXV y XXVI; etapa B de la Figura 23).

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una adipato reductasa, una adipato cinasa o una adipilfosfato reductasa (véase el Ejemplo XXVIII; etapas X/Y/Z de la Figura 25 y el Ejemplo XXXI). En un aspecto adicional, la vía de 6-ACA incluye una adipato reductasa. En otro aspecto adicional, la vía de 6-ACA incluye una adipato cinasa y una adipilfosfato reductasa. En incluso otro aspecto, el organismo microbiano con la vía de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) anterior comprende además una vía de adipato, una vía de caprolactama y/o una vía de hexametilendiamina descrita aquí (véase el Ejemplo XXVIII; etapas A-W de la Figura 25).

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una 2-amino-7-oxosubarato ceto-ácido descarboxilasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato descarboxilasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa, una 2-aminopimelato descarboxilasa, una 6-aminohexanal oxidorreductasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato descarboxilasa o una 2-amino-7-oxosubarato aminoácido descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXV y XXVI; etapas A/B/D/E/F/G/I de la Figura 26). En un aspecto adicional, el organismo microbiano tiene una vía de 2-amino-7-oxosubarato con al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 2-amino-7-oxosubarato expresada en una cantidad suficiente como para producir 2-amino-7-oxosubarato, donde la vía de 2-amino-7-oxosubarato incluye una 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato aldolasa, una 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato deshidratasa o una 2-amino-5-eno-7-oxosubarato reductasa (véanse los Ejemplos XXV y XXVI; etapas A/B/C de la Figura 27).

Según otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 6-ACA, donde el conjunto codifica una 2-amino-7-oxosubarato ceto-ácido descarboxilasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa; y una 2-aminopimelato descarboxilasa (véase el Ejemplo XXV; etapas A/D/E de la Figura 26). Según otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 6-ACA, donde el conjunto codifica una 2-amino-7-oxosubarato ceto-ácido descarboxilasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato descarboxilasa; y una 6-aminohexanal oxidorreductasa (véase el Ejemplo XXV; etapas A/B/F de la Figura 26). Según otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos

exógenos que codifican enzimas de la vía de 6-ACA, donde el conjunto codifica una 2-amino-7-oxosubarato aminoácido descarboxilasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato descarboxilasa; y una 6-aminohexanal oxidorreductasa (véase el Ejemplo XXV; etapas I/G/F de la Figura 26). En un aspecto adicional de cada uno de los aspectos anteriores, el organismo microbiano tiene una vía de 2-amino-7-oxosubarato con un segundo conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 2-amino-7-oxosubarato expresadas en una cantidad suficiente como para producir 2-amino-7-oxosubarato, donde la vía de 2-amino-7-oxosubarato incluye una 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato aldolasa, una 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato deshidratasa; y una 2-amino-5-eno-7-oxosubarato reductasa (véanse los Ejemplos XXV y XXVI; etapas A/B/C de la Figura 27).

Según otro aspecto descrito, se proporciona un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato cinasa, una [(6-aminohexanoil)oxil]fosfonato (6-AHOP) oxidorreductasa, una semialdehído 6-aminocaproico oxidorreductasa (de aminación), una 6-aminocaproato N-acetiltransferasa, una 6-acetamidohexanoato cinasa, una [(6-acetamidohexanoil)oxil]fosfonato (6-AAHOP) oxidorreductasa, una 6-acetamidohexanal aminotransferasa, una 6-acetamidohexanal oxidorreductasa (de aminación), una 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa, una 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida), una 6-acetamidohexanoato CoA transferasa, una 6-acetamidohexanoato CoA ligasa, una 6-acetamidohexanoil-CoA oxidorreductasa, una [(6-acetamidohexanoil)oxil]fosfonato (6-AAHOP) aciltransferasa, una [(6-aminohexanoil)oxil]fosfonato (6-AHOP) aciltransferasa, una 6-aminocaproato CoA transferasa y una 6-aminocaproato CoA ligasa (véanse los Ejemplos XX y XXI; etapas A-N de la Figura 13).

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato cinasa; una 6-AHOP oxidorreductasa; o una semialdehído 6-aminocaproico oxidorreductasa (de aminación) o una ácido 6-aminocaproico semialdehído aminotransferasa (véanse los Ejemplos XX y XXI; etapas A/B/C de la Figura 13). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 6-aminocaproato cinasa; una 6-AHOP oxidorreductasa; y una semialdehído 6-aminocaproico oxidorreductasa (de aminación) o una ácido 6-aminocaproico semialdehído aminotransferasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato cinasa; una 6-AHOP aciltransferasa; una 6-aminocaproil-CoA oxidorreductasa; o una semialdehído 6-aminocaproico oxidorreductasa (de aminación) o una ácido 6-aminocaproico semialdehído aminotransferasa (véanse los Ejemplos XX y XXI; etapas A/L/N/C de la Figura 13). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 6-aminocaproato cinasa; una 6-AHOP aciltransferasa; una 6-aminocaproil-CoA oxidorreductasa; y una semialdehído 6-aminocaproico oxidorreductasa (de aminación) o una ácido 6-aminocaproico semialdehído aminotransferasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato CoA transferasa o una 6-aminocaproato CoA ligasa; una 6-aminocaproil-CoA oxidorreductasa; o una semialdehído 6-aminocaproico oxidorreductasa (de aminación) o una ácido 6-aminocaproico semialdehído aminotransferasa (véanse los Ejemplos XX y XXI; etapas M/N/C de la Figura 13). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 6-aminocaproato CoA transferasa o una 6-aminocaproato CoA ligasa; una 6-aminocaproil-CoA oxidorreductasa; y una semialdehído 6-aminocaproico oxidorreductasa (de aminación) o una ácido 6-aminocaproico semialdehído aminotransferasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato N-acetiltransferasa; una 6-acetamidohexanoato cinasa; una 6-AAHOP oxidorreductasa; una 6-acetamidohexanal aminotransferasa o una 6-acetamidohexanal oxidorreductasa (de aminación); o una 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa o una 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida) (véanse los Ejemplos XX y XXI; etapas D/E/F/G/H de la Figura 13). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 6-aminocaproato N-acetiltransferasa; una 6-acetamidohexanoato cinasa; una 6-AAHOP oxidorreductasa; una 6-acetamidohexanal aminotransferasa o una 6-acetamidohexanal oxidorreductasa (de aminación); y una 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa o una 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida).

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de

hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato N-acetiltransferasa; una 6-acetamidohexanoato CoA transferasa o una 6-acetamidohexanoato CoA ligasa; una 6-acetamidohexanoil-CoA oxidorreductasa; una 6-acetamidohexanal aminotransferasa o una 6-acetamidohexanal oxidorreductasa (de aminación); o una 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa o una 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida) (véanse los Ejemplos XX y XXI; etapas D/II/J/G/H de la Figura 13). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 6-aminocaproato N-acetiltransferasa; una 6-acetamidohexanoato CoA transferasa o una 6-acetamidohexanoato CoA ligasa; una 6-acetamidohexanoil-CoA oxidorreductasa; una 6-acetamidohexanal aminotransferasa o una 6-acetamidohexanal oxidorreductasa (de aminación); y una 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa o una 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida). En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato N-acetiltransferasa; una 6-acetamidohexanoato cinasa; una 6-AAHOP oxidorreductasa; una 6-acetamidohexanal aminotransferasa o una 6-acetamidohexanal oxidorreductasa (de aminación); o una 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa o una 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida) (véanse los Ejemplos XX y XXI; etapas D/E/K/J/G de la Figura 13). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 6-aminocaproato N-acetiltransferasa; una 6-acetamidohexanoato cinasa; una 6-AAHOP oxidorreductasa; una 6-acetamidohexanal aminotransferasa o una 6-acetamidohexanal oxidorreductasa (de aminación); y una 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa o una 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida). En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutamil-CoA transferasa, una glutamil-CoA ligasa, una beta-cetotilasa, una 3-oxo-6-aminopimeloil-CoA oxidorreductasa, una 3-hidroxi-6-aminopimeloil-CoA deshidratasa, una 6-amino-7-carboxihept-2-enoil-CoA reductasa, una 6-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 2-amino-7-oxoheptanoato aminotransferasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación, o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A-II de la Figura 20). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutamil-CoA transferasa o ligasa; una beta-cetotilasa; una 3-oxo-6-aminopimeloil-CoA oxidorreductasa; una 3-hidroxi-6-aminopimeloil-CoA deshidratasa; una 6-amino-7-carboxihept-2-enoil-CoA reductasa; una 6-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído); una 2-amino-7-oxoheptanoato aminotransferasa u oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato reductasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal aminotransferasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de aminación, una 3-oxo-7-aminoheptanoato 3-aminotransferasa, una 3-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de 3-aminación, una 3-oxopimelato cinasa, una 5-oxopimeloilfosfonato reductasa, una 3-oxopimelato CoA transferasa, una 3-oxopimelato ligasa, una 5-oxopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 3-oxopimelato aminotransferasa, una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato CoA transferasa, una 3-aminopimelato ligasa, una 5-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 3-aminopimelato cinasa, una 5-aminopimeloilfosfonato reductasa, una 3-aminopimelato reductasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato 2,3-aminomutasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa, una homolisina descarboxilasa, una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa, una 2-aminopimelato cinasa, una 2-aminopimelato CoA transferasa, una 2-aminopimelato CoA ligasa, una 2-aminopimelato reductasa, una 6-aminopimeloilfosfonato reductasa, una 6-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; Figura 21).

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato reductasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal 7-aminotransferasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 7-aminación, una 3-oxo-7-aminoheptanoato 3-aminotransferasa, una 3-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de 3-aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/C/D/E/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato reductasa; una 3-oxo-1-carboxiheptanal 7-aminotransferasa o una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 7-aminación; una 3-oxo-7-

aminoheptanoato 3-aminotransferasa o una 3-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de 3-aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotiolasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato cinasa, una 5-oxopimeloilfosfonato reductasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal 7-aminotransferasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 7-aminación, una 3-oxo-7-aminoheptanoato 3-aminotransferasa, una 3-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de 3-aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/F/G/D/E/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotiolasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato cinasa; una 5-oxopimeloilfosfonato reductasa; una 3-oxo-1-carboxiheptanal 7-aminotransferasa o una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 7-aminación; una 3-oxo-7-aminoheptanoato 3-aminotransferasa o una 3-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de 3-aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotiolasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato CoA transferasa, una 3-oxopimelato CoA ligasa, una 5-oxopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 3-oxo-1-carboxiheptanal 7-aminotransferasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 7-aminación, una 3-oxo-7-aminoheptanoato 3-aminotransferasa, una 3-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de 3-aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/H/I/E/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotiolasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato CoA transferasa o 3-oxopimelato CoA ligasa; una 5-oxopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído); una 3-oxo-1-carboxiheptanal 7-aminotransferasa o 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 7-aminación; una 3-oxo-7-aminoheptanoato 3-aminotransferasa o una 3-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de 3-aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotiolasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato reductasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal 3-aminotransferasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 3-aminación, una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de 7-aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/C/AB/Z/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotiolasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimelato reductasa; una 3-oxo-1-carboxiheptanal 3-aminotransferasa o una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 3-aminación; una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de 7-aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotiolasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato cinasa, una 5-oxopimeloilfosfonato reductasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal 3-aminotransferasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 3-aminación, una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de 7-aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/H/I/AB/Z/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotiolasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato cinasa; una 5-oxopimeloilfosfonato reductasa; una 3-oxo-1-carboxiheptanal 3-aminotransferasa o una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 3-aminación; una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de 7-aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato CoA transferasa o una 3-oxopimelato CoA ligasa, una 5-oxopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 3-oxo-1-carboxiheptanal 3-aminotransferasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 3-aminación, una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de 7-aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/F/G/AB/Z/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato CoA transferasa o una 3-oxopimelato CoA ligasa; una 5-oxopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído); una 3-oxo-1-carboxiheptanal 3-aminotransferasa o una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 3-aminación; una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de 7-aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato reductasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato 2,3-aminomutasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B//J/O/P/Q/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato reductasa; una 3-amino-7-oxoheptanoato 2,3-aminomutasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato cinasa, una 5-aminopimeloilfosfonato reductasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato 2,3-aminomutasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/J/M/N/P/Q/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato cinasa; una 5-aminopimeloilfosfonato reductasa; una 3-amino-7-oxoheptanoato 2,3-aminomutasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa, una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato CoA transferasa, una 3-aminopimelato CoA ligasa, una 5-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 3-amino-7-oxoheptanoato 2,3-aminomutasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/J/K/L/P/Q/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato CoA transferasa o una 3-aminopimelato CoA ligasa; una 5-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído); una 3-amino-7-oxoheptanoato 2,3-aminomutasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-

CoA beta-cetotiolasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa, 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato reductasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de 7-aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/J/O/Z/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotiolasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimelato aminotransferasa o 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato reductasa; una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de 7-aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotiolasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa, una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato CoA transferasa, una 3-aminopimelato CoA ligasa, una 5-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/J/K/UZ/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotiolasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato CoA transferasa o una 3-aminopimelato CoA ligasa; una 5-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído); una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotiolasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa, una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato cinasa, una 5-aminopimeloilfosfonato reductasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/J/M/N/Z/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotiolasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato cinasa, una 5-aminopimeloilfosfonato reductasa; una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotiolasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa, 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa, una 2-aminopimelato reductasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/J/T/W/Q/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotiolasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa; una 2-aminopimelato reductasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotiolasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa, una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa, una 2-aminopimelato cinasa, una 6-aminopimeloilfosfonato reductasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/J/T/U/X/Q/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que

codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotiolasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa; una 2-aminopimelato cinasa; una 6-aminopimeloilfosfonato reductasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotiolasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa, una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa, una 2-aminopimelato CoA transferasa, 2-aminopimelato CoA ligasa, una 6-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/J/T/V/Y/Q/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotiolasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa; una 2-aminopimelato CoA transferasa o una 2-aminopimelato CoA ligasa; una 6-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído); una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato aldolasa, una 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato deshidratasa, una 2-oxo-7-aminohept-3-enoato reductasa, una 2-oxo-7-aminoheptanoato aminotransferasa, una 2-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de aminación, una homolisina descarboxilasa, una 2-oxo-7-aminoheptanoato descarboxilasa, una 6-aminohexanal aminotransferasa o una 6-aminohexanal oxidorreductasa de aminación (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A-G de la Figura 22). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato aldolasa; una 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato deshidratasa; una 2-oxo-7-aminohept-3-enoato reductasa; una 2-oxo-7-aminoheptanoato aminotransferasa o una 2-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa. En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato aldolasa; una 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato deshidratasa; una 2-oxo-7-aminohept-3-enoato reductasa; una 2-oxo-7-aminoheptanoato descarboxilasa; y una 6-aminohexanal aminotransferasa o una 6-aminohexanal oxidorreductasa de aminación.

La invención proporciona de manera adicional un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato reductasa, una semialdehído 6-aminocaproico aminotransferasa o una semialdehído 6-aminocaproico oxidorreductasa (de aminación) (véase el Ejemplo XXVII; etapas O/C de la Figura 24 y el Ejemplo XXXI). En otro aspecto de la invención, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 6-aminocaproato reductasa; y una semialdehído 6-aminocaproico aminotransferasa o una semialdehído 6-aminocaproico oxidorreductasa (de aminación). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica 6-aminocaproato N-acetiltransferasa; 6-acetamidohexanoato reductasa; 6-acetamidohexanal aminotransferasa o 6-acetamidohexanal oxidorreductasa (de aminación); y 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa o 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida). En la presente memoria, también se describe un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una 2-amino-7-oxosubarato ceto-ácido descarboxilasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato descarboxilasa, una 6-aminohexanal oxidorreductasa de aminación, una 6-aminohexanal aminotransferasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato descarboxilasa, una homolisina descarboxilasa, una 2-amino-7-oxosubarato aminoácido descarboxilasa, una 2-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de aminación, una 2-oxo-7-aminoheptanoato aminotransferasa, una 2-amino-7-oxosubarato oxidorreductasa de aminación, una 2-amino-7-oxosubarato aminotransferasa, una 2,7-diaminosubarato descarboxilasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato aminotransferasa o una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; Etapas A/B/C/G/H/I/J/K/L/M de la Figura 26). En un aspecto adicional, el organismo microbiano tiene una vía de 2-amino-7-oxosubarato con al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 2-amino-7-oxosubarato expresada en una cantidad suficiente como para producir 2-amino-7-oxosubarato, donde la vía de 2-amino-7-oxosubarato incluye una 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato aldolasa, una 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato deshidratasa o una 2-amino-5-eno-7-oxosubarato reductasa (véanse los Ejemplos XXV y XXVI; etapas A/B/C de la

Figura 27).

En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 2-amino-7-oxosubarato oxidorreductasa de aminación o 2-amino-7-oxosubarato aminotransferasa; una 2,7-diaminosubarato descarboxilasa; y una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas K/L/H de la Figura 26). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 2-amino-7-oxosubarato aminoácido descarboxilasa; una 2-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una 2-oxo-7-aminopimelato aminotransferasa; y una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas I/J/H de la Figura 26). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 2-amino-7-oxosubarato aminoácido descarboxilasa; y una 6-aminoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una 6-aminoheptanoato aminotransferasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas I/G/C de la Figura 26). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 2-amino-7-oxosubarato cetó-ácido descarboxilasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato descarboxilasa; y una 6-aminoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una 6-aminoheptanoato aminotransferasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/C de la Figura 26). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 2-amino-7-oxosubarato cetó-ácido descarboxilasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una 2-amino-7-oxoheptanoato aminotransferasa; y una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/M/H de la Figura 26). En un aspecto adicional de cada uno de los aspectos anteriores, el organismo microbiano tiene una vía de 2-amino-7-oxosubarato con un segundo conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 2-amino-7-oxosubarato expresadas en una cantidad suficiente como para producir 2-amino-7-oxosubarato, donde la vía de 2-amino-7-oxosubarato incluye una 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato aldolasa, una 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato deshidratasa; y una 2-amino-5-eno-7-oxosubarato reductasa (véanse los Ejemplos XXV y XXVI; etapas A/B/C de la Figura 27). En la presente memoria, se describe un organismo microbiano de origen no natural que tiene una vía de ácido levulínico (LA, por sus siglas en inglés) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de LA expresada en una cantidad suficiente como para producir LA, donde la vía de LA incluye una 3-oxoadipil-CoA tiolasa, una 3-oxoadipil-CoA/acil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintasa, una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa o una 3-oxoadipato descarboxilasa (véase el Ejemplo XXIX; etapas A/E/F/G/AA de la Figura 25). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de LA, en donde el conjunto codifica una 3-oxoadipil-CoA tiolasa; una 3-oxoadipil-CoA/acil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; y una 3-oxoadipato descarboxilasa.

Un organismo microbiano de origen no natural que se describe en la presente memoria tiene una vía de hexametilendiamina, en donde el organismo microbiano de origen no natural incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido que convierte un sustrato en un producto, como se describe en la presente memoria. Por lo tanto, un organismo microbiano de origen no natural puede contener al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido, donde el polipéptido sea una enzima o proteína que convierta los sustratos y productos de una vía de hexametilendiamina, como se muestra en las Figuras 10, 11 y 24.

Por ejemplo, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de adipato, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre 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). De manera adicional, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de adipato, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre 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 (al que también se hace referencia en la presente memoria como «5-carboxi-2-pentenoato»); hexa-2-enodioato en adipato (véase la Figura 3). Asimismo, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de ácido 6-aminocaproico, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre adipil-CoA en adipato semialdehído; y adipato semialdehído en 6-aminocaproato (Figura 8). Además, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de caprolactama, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre adipil-CoA en adipato semialdehído; adipato semialdehído en 6-aminocaproato; y 6-aminocaproato en caprolactama. De manera adicional, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de adipato, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre alfa-ceto adipato en alfa-ceto adipil-CoA; alfa-ceto adipil-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). Asimismo, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de adipato, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un

polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre 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).

De manera adicional, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de 6-aminocaproil-CoA, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre 4-aminobutiril-CoA y acetil-CoA en 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA; 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA en 3-hidroxi-6-aminohexanoil-CoA; 3-hidroxi-6-aminohexanoil-CoA en 6-aminohex-2-enoil-CoA; 6-aminohex-2-enoil-CoA en 6-aminocaproil-CoA (Figura 11). Otros sustratos y productos de una vía de ese tipo pueden incluir 6-aminocaproil-CoA en 6-aminocaproato; 6-aminocaproil-CoA en caprolactama; o 6-aminocaproil-CoA en 6-aminocaproato semialdehído y 6-aminocaproato semialdehído en hexametilendiamina (Figura 11). Un organismo microbiano de origen no natural también puede tener una vía de ácido 6-aminocaproico, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre 4-aminobutiril-CoA y acetil-CoA en 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA; 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA en 3-oxo-6-aminohexanoato; 3-oxo-6-aminohexanoato en 3-hidroxi-6-aminohexanoato; 3-hidroxi-6-aminohexanoato en 6-aminohex-2-enoato; y 6-aminohex-2-enoato en 6-aminocaproato (Figura 11). Otros sustratos y productos de una vía de ese tipo pueden incluir 6-aminocaproato en caprolactama o 6-aminocaproato en 6-aminocaproil-CoA, 6-aminocaproil-CoA en 6-aminocaproato semialdehído y 6-aminocaproato semialdehído en hexametilendiamina (Figura 11).

De manera adicional, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de ácido 6-aminocaproico, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre piruvato y semialdehído succínico en 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato; 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato (HODH) en 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED); 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) en 2-oxoheptano-1,7-dioato (2-OHD); 2-oxoheptano-1,7-dioato (2-OHD) en adipato semialdehído; y adipato semialdehído en 6-aminocaproato (Figura 12). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de ácido 6-aminocaproico, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre piruvato y semialdehído succínico en 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato; 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato (HODH) en 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED); 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) en 6-oxohex-4-enoato (6-OHE); 6-oxohex-4-enoato (6-OHE) en adipato semialdehído; y adipato semialdehído en 6-aminocaproato (Figura 12). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de ácido 6-aminocaproico, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre piruvato y semialdehído succínico en 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato; 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato (HODH) en 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED); 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) en 2-aminohept-4-eno-1,7-dioato (2-AHE); 2-aminohept-4-eno-1,7-dioato (2-AHE) en 2-aminoheptano-1,7-dioato (2-AHD); y 2-aminoheptano-1,7-dioato (2-AHD) en 6-aminocaproato (Figura 12). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de ácido 6-aminocaproico, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre piruvato y semialdehído succínico en 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato; 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato (HODH) en 3-hidroxiadipil-CoA; 3-hidroxiadipil-CoA en 2,3-deshidroadipil-CoA; 2,3-deshidroadipil-CoA en adipil-CoA; adipil-CoA en adipato semialdehído; y adipato semialdehído en 6-aminocaproato (Figura 12). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de ácido 6-aminocaproico, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre piruvato y semialdehído succínico en 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato; 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato (HODH) en 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED); 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) en 2,3-deshidroadipil-CoA; 2,3-deshidroadipil-CoA en adipil-CoA; adipil-CoA en adipato semialdehído; y adipato semialdehído en 6-aminocaproato (Figura 12). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de ácido 6-aminocaproico, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre piruvato y semialdehído succínico en 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato; 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato (HODH) en 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED); 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) en 2-oxoheptano-1,7-dioato (2-OHD); 2-oxoheptano-1,7-dioato (2-OHD) en adipil-CoA; adipil-CoA en adipato semialdehído; y adipato semialdehído en 6-aminocaproato (Figura 12).

De manera adicional, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de ácido 6-aminocaproico, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre glutamato en glutamil-CoA; glutamil-CoA en 3-oxo-6-amino-pimeloil-CoA; 3-oxo-6-amino-pimeloil-CoA en 3-hidroxi-6-amino-pimeloil-CoA; 3-hidroxi-6-amino-pimeloil-

- CoA en 6-amino-7-carboxi-hept-2-enoil-CoA; 6-amino-7-carboxi-hept-2-enoil-CoA en 6-aminopimeloil-CoA; 6-aminopimeloil-CoA en 2-aminopimelato; y 2-aminopimelato en 6-aminocaproato (Figura 20). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de ácido 6-aminocaproico, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre glutaril-CoA en 3-oxopimeloil-CoA; 3-oxopimeloil-CoA en 3-oxopimelato; 3-oxopimelato en 3-aminopimelato; 3-aminopimelato en 2-aminopimelato; y 2-aminopimelato en 6-aminocaproato (Figura 21). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de ácido 6-aminocaproico, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre homolisina en 6-aminohexanamida; y 6-aminohexanamida en 6-aminocaproato (Figura 23). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de ácido 6-aminocaproico, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre adipato en adipato semialdehído; adipato en adipilfosfato; y adipilfosfato en adipato semialdehído (Figura 25).
- De manera adicional, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de ácido 6-aminocaproico, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre 2-amino-7-oxosubarato en 2-amino-7-oxoheptanoato; 2-amino-7-oxoheptanoato en 6-aminohexanal; 6-aminohexanal en 6-aminocaproato; 2-amino-7-oxosubarato en 2-amino-7-oxoheptanoato; 2-amino-7-oxoheptanoato en 6-aminohexanal; 2-amino-7-oxoheptanoato en 2-aminopimelato; y 2-aminopimelato en 6-aminocaproato (Figura 26). Un organismo microbiano de origen no natural puede tener además una vía de 2-amino-7-oxosubarato, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre glutamato-5-semialdehído en 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato; 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato en 2-amino-5-eno-7-oxosubarato; y 2-amino-5-eno-7-oxosubarato en 2-amino-7-oxosubarato (Figura 27). De manera adicional, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de hexametildiamina (HMDA), en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre 6-aminocaproato en [(6-aminohexanoil)oxi]fosfonato (6-AHOP); [(6-aminohexanoil)oxi]fosfonato (6-AHOP) en semialdehído 6-aminocaproico; y semialdehído 6-aminocaproico en hexametildiamina (Figura 13). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de HMDA, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre 6-aminocaproato en [(6-aminohexanoil)oxi]fosfonato (6-AHOP); [(6-aminohexanoil)oxi]fosfonato (6-AHOP) en 6-aminocaproil-CoA; 6-aminocaproil-CoA en semialdehído 6-aminocaproico; y semialdehído 6-aminocaproico en hexametildiamina (Figura 13). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de HMDA, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre 6-aminocaproato en 6-aminocaproil-CoA; 6-aminocaproil-CoA en semialdehído 6-aminocaproico; y semialdehído 6-aminocaproico en hexametildiamina (Figura 13). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de HMDA, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre 6-aminocaproato en 6-acetamidohexanoato; 6-acetamidohexanoato en [(6-acetamidohexanoil)oxi]fosfonato (6-AAHOP); [(6-acetamidohexanoil)oxi]fosfonato (6-AAHOP) en 6-acetamidohexanal; 6-acetamidohexanal en 6-acetamidohexanamina; y 6-acetamidohexanamina en hexametildiamina (Figura 13). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de HMDA, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre 6-aminocaproato en 6-acetamidohexanoato; 6-acetamidohexanoato en 6-acetamidohexanoil-CoA; 6-acetamidohexanoil-CoA en 6-acetamidohexanal; 6-acetamidohexanal en 6-acetamidohexanamina; y 6-acetamidohexanamina en hexametildiamina (Figura 13). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de HMDA, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre 6-aminocaproato en 6-acetamidohexanoato; 6-acetamidohexanoato en [(6-acetamidohexanoil)oxi]fosfonato (6-AAHOP); [(6-acetamidohexanoil)oxi]fosfonato (6-AAHOP) en 6-acetamidohexanoil-CoA; 6-acetamidohexanoil-CoA en 6-acetamidohexanal; 6-acetamidohexanal en 6-acetamidohexanamina; y 6-acetamidohexanamina en hexametildiamina (Figura 13).
- De manera adicional, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de hexametildiamina (HMDA), en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre glutamato en glutamyl-CoA; glutamyl-CoA en 3-oxo-6-amino-pimeloil-CoA; 3-oxo-6-amino-pimeloil-CoA en 3-hidroxi-6-amino-pimeloil-CoA; 3-hidroxi-6-amino-pimeloil-CoA en 6-amino-7-carboxi-hept-2-enoil-CoA; 6-amino-7-carboxi-hept-2-enoil-CoA en 6-aminopimeloil-CoA; 6-aminopimeloil-CoA en 2-aminopimelato; -amino-7-oxoheptanoato en homolisina; y homolisina en HMDA (Figura 20). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de HMDA, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre glutaril-CoA en 3-oxopimeloil-CoA; 3-oxopimeloil-CoA en 3-oxopimelato; 3-oxopimelato en 3-oxo-1-carboxi heptanal; 3-oxo-1-carboxi heptanal en 3-oxo-

[illegible]

donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre glutaril-CoA en 3-oxopimeloil-CoA; 3-oxopimeloil-CoA en 3-oxopimelato; 3-oxopimelato en 3-aminopimelato; 3-aminopimelato en 2-aminopimelato; 2-aminopimelato en 6-aminopimeloilfosfonato; 6-aminopimeloilfosfonato en 2-amino-7-oxoheptanoato; 2-amino-7-oxoheptanoato en homolisina; y homolisina en HMDA (Figura 21). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de HMDA, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre glutaril-CoA en 3-oxopimeloil-CoA; 3-oxopimeloil-CoA en 3-oxopimelato; 3-oxopimelato en 3-aminopimelato; 3-aminopimelato en 2-aminopimelato; 2-aminopimelato en 6-aminopimeloil-CoA; 6-aminopimeloil-CoA en 2-amino-7-oxoheptanoato; 2-amino-7-oxoheptanoato en homolisina; y homolisina en HMDA (Figura 21). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de HMDA, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre piruvato y 4-aminobutanol en 2-oxo-4-hidroxi 7-aminoheptanoato; 2-oxo-4-hidroxi 7-aminoheptanoato en 2-oxo-7-amino hept-3-enoato; 2-oxo-7-amino hept-3-enoato en 2-oxo-7-amino heptanoato; 2-oxo-7-amino heptanoato en homolisina; y homolisina en HMDA (Figura 22). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de HMDA, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre piruvato y 4-aminobutanol en 2-oxo-4-hidroxi 7-aminoheptanoato; 2-oxo-4-hidroxi 7-aminoheptanoato en 2-oxo-7-amino hept-3-enoato; 2-oxo-7-amino hept-3-enoato en 2-oxo-7-amino heptanoato; 2-oxo-7-amino heptanoato en 6-aminohexanal; y 6-aminohexanal en HMDA (Figura 22). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de HMDA, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre 6-aminocaproato en semialdehído 6-aminocaproico; y semialdehído 6-aminocaproico en HMDA (Figura 24). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de HMDA, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre 6-aminocaproato en 6-acetamidohexanoato; 6-acetamidohexanoato en 6-acetamidohexanal; 6-acetamidohexanal en 6-acetamidohexanamina; 6-acetamidohexanamina en HMDA (Figura 24). De manera alternativa, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de HMDA, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre 2-amino-7-oxosubarato en 2-amino-7-oxoheptanoato; 2-amino-7-oxoheptanoato en 6-aminohexanal; 6-aminohexanal en HMDA; 2-amino-7-oxosubarato en 2-oxo-7-aminoheptanoato; 2-amino-7-oxoheptanoato en homolisina; homolisina en HMDA; 2-oxo-7-aminoheptanoato en homolisina; 2-oxo-7-aminoheptanoato en 6-aminohexanal; 2-amino-7-oxosubarato en 2,7-diaminosubarato; y 2,7-diaminosubarato en homolisina (Figura 26). Un organismo microbiano de origen no natural puede tener además una vía de 2-amino-7-oxosubarato, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre glutamato-5-semialdehído en 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato; 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato en 2-amino-5-eno-7-oxosubarato; y 2-amino-5-eno-7-oxosubarato en 2-amino-7-oxosubarato (Figura 27).

De manera adicional, un organismo microbiano de origen no natural puede tener una vía de ácido levulínico, en donde el organismo microbiano contenga al menos un ácido nucleico exógeno que codifique un polipéptido que convierta un sustrato en un producto que se seleccione de entre succinil-CoA y acetil-CoA en 3-oxoadipil-CoA; 3-oxoadipil-CoA en 3-oxoadipato; y 3-oxoadipato en ácido levulínico. Se comprende que cualquiera de las vías que se describen en la presente memoria que produzca un producto intermedio de una vía puede usarse para producir el producto intermedio para otra vía, si se desea. Por ejemplo, como se describe en la presente memoria, la vía de alfa-cetoadipato a adipato que se muestra en la Figura 9 produce el producto intermedio adipil-CoA, que también es un producto intermedio en la vía que se ilustra en la Figura 10. Por lo tanto, se comprende que una vía alternativa incluye alfa-cetoadipato en adipil-CoA, que puede convertirse en adipato, 6-aminocaproato, caprolactama o hexametilendiamina, como se ilustra en la Figura 10. Se comprende que cualquiera de las vías que se describen en la presente memoria que produzca un producto intermedio puede usarse en combinación con cualquier otra vía que se describa en la presente memoria siempre y cuando se produzca un producto deseado. Por ejemplo, un organismo microbiano de origen no natural que se describe en la presente memoria puede tener al menos un ácido nucleico que codifique una enzima de la vía de ácido 6-aminocaproico y al menos un ácido nucleico que codifique una enzima de la vía de hexametilendiamina, tal como 2-AHD descarboxilasa (Etapa I de la Figura 12) y 6-acetamidohexanoato cinasa (Etapa E de la Figura 13) o, de manera alternativa, 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) descarboxilasa (Etapa F de la Figura 12), adipato semialdehído aminotransferasa (Etapa E de la Figura 12) y 6-acetamidohexanoil-CoA oxidorreductasa (Etapa J de la Figura 13) o, de manera alternativa, 5-carboxi-2-pentenil-CoA reductasa (Etapa D de la Figura 10), adipil-CoA deshidrogenasa (Etapa O de la Figura 12) y 6-aminocaproil-CoA oxidorreductasa (Etapa N de la Figura 13) o, de manera alternativa, 2-amino-7-oxoheptanoato aminotransferasa (Etapa G de la Figura 20) y 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa (Etapa R de la Figura 21) o, de manera alternativa, 6-aminocaproato reductasa (Etapa O de la Figura 24) y 6-aminohex-2-enoato reductasa (Etapa J de la Figura 11) o, de manera alternativa, adipato reductasa (Etapa X de la Figura 25) y 6-acetamidohexanoato reductasa (Etapa P de la Figura 24).

En una realización adicional, la invención proporciona un organismo microbiano de origen no natural con una vía de

hexametilendiamina y opcionalmente una vía de ácido 6-aminocaproico, en donde el organismo microbiano de origen no natural comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima o proteína que convierte un sustrato en un producto que se selecciona de entre cualquiera de los sustratos o productos que se describen en la presente memoria o que se muestran en cualquiera de las Figuras 10, 11 y 24. El experto en la técnica comprenderá que puede determinar fácilmente cualquiera de los pares sustrato-producto que se describe en la presente adecuado para producir un producto deseado y para el cual se encuentra disponible actividad adecuada para la conversión del sustrato en el producto en función de las indicaciones de la presente memoria. Por lo tanto, la invención proporciona un organismo microbiano de origen no natural que contiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima o proteína, donde la enzima o proteína convierte los sustratos y productos de una vía de hexametilendiamina y opcionalmente una vía de ácido 6-aminocaproico, tal como cualquiera de los que se muestran en las Figuras 10, 11 y 24.

Si bien en la presente memoria se describe en términos generales como un organismo microbiano que contiene una vía de hexametilendiamina y opcionalmente una vía de ácido 6-aminocaproico, se comprende que la invención proporciona de manera adicional un organismo microbiano de origen no natural que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina expresada en una cantidad suficiente como para producir un producto intermedio de una vía de ácido 6-aminocaproico y hexametilendiamina. Por ejemplo, como se describe en la presente memoria, se ejemplifican vías de ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina en las Figuras 10, 11 y 24. Por lo tanto, además de un organismo microbiano que contiene una vía de hexametilendiamina que produce hexametilendiamina y opcionalmente una vía de ácido 6-aminocaproico, la invención proporciona de manera adicional un organismo microbiano de origen no natural que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina, donde el organismo microbiano produce un producto intermedio de la vía de ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina, por ejemplo, cualquiera de los productos intermedios que se muestran en las Figuras 10, 11 y 24.

Se comprende que cualquiera de las vías que se describen en la presente memoria, incluidas aquellas que se describen en los Ejemplos y se ejemplifican en las Figuras, incluidas las vías de las Figuras 1-14 y 20-27, puede utilizarse para generar un organismo microbiano de origen no natural que produzca cualquier producto intermedio o producto de la vía, según se desee. Como se describe en la presente memoria, un organismo microbiano de ese tipo que produce un producto intermedio puede usarse en combinación con otro organismo microbiano que exprese enzimas de vías posteriores para producir un producto deseado. Sin embargo, se comprende que un organismo microbiano de origen no natural que produzca un producto intermedio de la vía de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico puede utilizarse para producir el producto intermedio como un producto deseado.

La invención se describe en la presente memoria con referencia general a la reacción metabólica, su reactante o producto, o con referencia específica a uno o más ácidos nucleicos o genes que codifican una enzima asociada a, o que cataliza, la reacción metabólica, el reactante o el producto mencionados. A menos que se indique expresamente de otro modo en la presente memoria, los expertos en la técnica comprenderán que la referencia a una reacción constituye también una referencia a los reactantes y productos de la reacción. De manera similar, a menos que se indique expresamente de otro modo en la presente memoria, la referencia a un reactante o producto también hace referencia a la reacción, y la referencia a cualquiera de estos constituyentes metabólicos también hace referencia al gen o a los genes que codifican las enzimas que catalizan la reacción, el reactante o el producto mencionados. Asimismo, teniendo en cuenta los campos muy conocidos de la bioquímica metabólica, la enzimología y la genómica, la referencia en la presente memoria a un gen o ácido nucleico de codificación también constituye una referencia a la enzima codificada correspondiente y la reacción que cataliza, así como los reactantes y productos de la reacción.

Los organismos microbianos de origen no natural de la invención pueden producirse mediante la introducción de ácidos nucleicos expresables que codifiquen una o más de las enzimas que participan en una o más de las vías biosintéticas de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico. Dependiendo del organismo microbiano hospedador que se seleccione para la biosíntesis, se pueden expresar ácidos nucleicos para algunas de las vías biosintéticas particulares de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico o todas estas. Por ejemplo, si un hospedador seleccionado presenta una deficiencia de una o más enzimas para una vía biosintética deseada, se introducen ácidos nucleicos expresables para la o las enzimas deficientes en el hospedador para la expresión exógena posterior. De manera alternativa, si el hospedador seleccionado presenta expresión endógena para algunos genes de la vía, pero presenta una deficiencia en cuanto a otros, se necesita un ácido nucleico de codificación para la o las enzimas deficientes para lograr la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico. Por lo tanto, un organismo microbiano de origen no natural de la invención puede producirse mediante la introducción de actividades enzimáticas exógenas para obtener una vía biosintética deseada, o se puede obtener una vía biosintética deseada mediante la introducción de una o más actividades enzimáticas exógenas que, junto con una o más enzimas endógenas, produzcan un producto deseado tal como ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico. Dependiendo de los constituyentes de la vía biosintética de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico de un organismo microbiano hospedador seleccionado, los organismos microbianos de origen no natural de la invención incluirán al menos un ácido nucleico de codificación de la vía de

ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina de expresión exógena e incluso todos los ácidos nucleicos de codificación para una o más vías biosintéticas de ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina. Por ejemplo, se puede establecer la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico en un hospedador con una deficiencia de una enzima de la vía a través de la expresión exógena del ácido nucleico de codificación correspondiente. En un hospedador con una deficiencia de todas las enzimas de una vía de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico, se puede incluir la expresión exógena de todas las enzimas en la vía, si bien se comprende que todas las enzimas de una vía pueden expresarse incluso si el hospedador contiene al menos una de las enzimas de la vía.

Por ejemplo, se puede incluir la expresión exógena de todas las enzimas en una vía para la producción de adipato en un organismo hospedador, tal como 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. En particular, un organismo hospedador puede contener las enzimas de la vía 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. De manera alternativa, un organismo hospedador puede contener las enzimas de la vía 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 hospedador puede contener las enzimas de la vía 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 hospedador puede contener las enzimas de la vía 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 hidrolasa.

En el caso de un organismo microbiano productor de ácido 6-aminocaproico, se puede incluir la expresión exógena de todas las enzimas en una vía para la producción de ácido 6-aminocaproico en un organismo hospedador, tal como aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA y transaminasa o aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA y 6-aminocaproato deshidrogenasa. Para un organismo microbiano productor de caprolactama, se puede incluir la expresión exógena de todas las enzimas en una vía para la producción de caprolactama en un organismo hospedador, tal como aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA, transaminasa o 6-aminocaproato deshidrogenasa, y amidohidrolasa. En otro ejemplo, se puede incluir la expresión exógena de todas las enzimas en una vía para la producción de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) en un organismo hospedador, tal como una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED reductasa; una 2-OHD descarboxilasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidoreductasa (de aminación), o de manera alternativa una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED descarboxilasa; una 6-OHE reductasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidoreductasa (de aminación), o de manera alternativa una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED aminotransferasa o una OHED oxidoreductasa (de aminación); una 2-AHE reductasa; y una 2-AHD descarboxilasa, o de manera alternativa una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED reductasa; una 2-OHD aminotransferasa o una 2-OHD oxidoreductasa (de aminación); y una 2-AHD descarboxilasa, o de manera alternativa una HODH aldolasa; una HODH formiato-liasa y una enzima de activación de piruvato formiato-liasa o una HODH deshidrogenasa; una 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa; una 2,3-deshidroadipil-CoA reductasa; una adipil-CoA deshidrogenasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidoreductasa (de aminación), o de manera alternativa una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED formiato-liasa y una enzima de activación de piruvato formiato-liasa u OHED deshidrogenasa; una 2,3-deshidroadipil-CoA reductasa; una adipil-CoA deshidrogenasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidoreductasa (de aminación), o de manera alternativa una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED reductasa; una 2-OHD formiato-liasa y una enzima de activación de piruvato formiato-liasa o una 2-OHD deshidrogenasa; una adipil-CoA deshidrogenasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidoreductasa (de aminación). En un aspecto adicional, todas las vías de 6-ACA descritas anteriormente pueden incluir una semialdehído succínico deshidrogenasa, una alfa-cetoglutarato descarboxilasa o una fosfoenolpiruvato (PEP) carboxicinasa. En otro ejemplo, se puede incluir la expresión exógena de todas las enzimas en una vía para la producción de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) en un organismo hospedador, tal como una glutamil-CoA transferasa o glutamil-CoA ligasa; una beta-cetotilasa; una 3-oxo-6-aminopimeloil-CoA oxidoreductasa; una 3-hidroxi-6-aminopimeloil-CoA deshidratasa; una 6-amino-7-carboxihept-2-enoil-CoA reductasa; una 6-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído); y una 2-aminopimelato descarboxilasa, o de manera alternativa una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o 3-oxopimelato oxidoreductasa de aminación; una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa; y una 2-aminopimelato descarboxilasa.

En otro ejemplo, se puede incluir la expresión exógena de todas las enzimas en una vía para la producción de hexametilendiamina en un organismo hospedador, tal como una 6-aminocaproato cinasa; una 6-AHOP oxidoreductasa; y una semialdehído 6-aminocaproico oxidoreductasa (de aminación) o una ácido 6-aminocaproico semialdehído aminotransferasa, o de manera alternativa una 6-aminocaproato cinasa; una 6-AHOP aciltransferasa; una 6-aminocaproil-CoA oxidoreductasa; y una semialdehído 6-aminocaproico oxidoreductasa (de aminación) o una ácido 6-aminocaproico semialdehído aminotransferasa, o de manera alternativa una 6-aminocaproato CoA

[illegible]

- oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato CoA transferasa o una 3-aminopimelato CoA ligasa; una 5-aminopimelatoil-CoA reductasa (formadora de aldehído); una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa, o de manera alternativa una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimelatoil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimelatoil-CoA transferasa o una 3-oxopimelatoil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato cinasa; una 5-aminopimelatoilfosfonato reductasa; una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa, o de manera alternativa una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimelatoil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimelatoil-CoA transferasa o una 3-oxopimelatoil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa; una 2-aminopimelato reductasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa, o de manera alternativa una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimelatoil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimelatoil-CoA transferasa o una 3-oxopimelatoil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa; una 2-aminopimelato CoA transferasa o 2-aminopimelato CoA ligasa; una 6-aminopimelatoil-CoA reductasa (formadora de aldehído); una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa, o de manera alternativa una 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato aldolasa; una 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato deshidratasa; una 2-oxo-7-aminohept-3-enoato reductasa; una 2-oxo-7-aminoheptanoato aminotransferasa o una 2-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa, o de manera alternativa una 6-aminocaproato reductasa; y una semialdehído 6-aminocaproico aminotransferasa o una semialdehído 6-aminocaproico oxidorreductasa (de aminación), o de manera alternativa una 6-aminocaproato N-acetiltransferasa; una 6-acetamidohexanoato reductasa; una 6-acetamidohexanal aminotransferasa o 6-acetamidohexanal oxidorreductasa (de aminación); y una 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa o 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida).
- Dependiendo de los constituyentes de la vía biosintética de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico de un organismo microbiano hospedador seleccionado, los organismos microbianos de origen no natural de la invención incluirán al menos un ácido nucleico de codificación de la vía de ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina de expresión exógena e incluso todos los ácidos nucleicos de codificación para una o más vías biosintéticas de ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina. Por ejemplo, se puede establecer la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico en un hospedador con una deficiencia de una enzima o proteína de la vía a través de la expresión exógena del ácido nucleico de codificación correspondiente. En un hospedador con una deficiencia de todas las enzimas o proteínas de una vía de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico, se puede incluir la expresión exógena de todas las enzimas o proteínas en la vía, si bien se comprende que todas las enzimas o proteínas de una vía pueden expresarse incluso si el hospedador contiene al menos una de las enzimas o proteínas de la vía. Por ejemplo, se puede incluir la expresión exógena de todas las enzimas o proteínas en una vía para la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico, como se describe en la presente memoria.
- Teniendo en cuenta las indicaciones y los lineamientos que se proporcionan en la presente memoria, los expertos en la técnica comprenderán que la cantidad de ácidos nucleicos de codificación que se haya de introducir en forma expresable se equiparará, al menos, con las deficiencias en la vía de adipato, ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico del organismo microbiano hospedador seleccionado. Por lo tanto, un organismo microbiano de origen no natural de la invención puede tener al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce, incluso todos los ácidos nucleicos que codifiquen las enzimas anteriores que constituyan una vía biosintética de ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina. En algunas realizaciones, los organismos microbianos de origen no natural también pueden incluir otras modificaciones genéticas que faciliten u optimicen la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico o que confieran otras funciones útiles al organismo microbiano hospedador. Una de esas otras funcionalidades puede incluir, por ejemplo, el aumento de la síntesis de uno o más de los precursores de las vías de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico tales como succinil-CoA y/o acetil-CoA en el caso de la síntesis de adipato, o adipil-CoA o adipato en el caso de la síntesis de ácido 6-aminocaproico o caprolactama, incluidas las enzimas de la vía de adipato que se describen en la presente memoria, o piruvato y semialdehído succínico, glutamato, glutaril-CoA, homolisina o 2-amino-7-oxosubarato en el caso de la síntesis de 6-aminocaproato, o 6-aminocaproato, glutamato, glutaril-CoA, piruvato y 4-aminobutanal, o 2-amino-7-oxosubarato en el caso de la síntesis de hexametilendiamina.

Por lo general, se selecciona un organismo microbiano hospedador de forma tal que produzca el precursor de una vía de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico, como una molécula producida de manera natural o como un producido modificado genéticamente que proporcione la producción de novo de un

precursor deseado o un aumento en la producción de un precursor producido de manera natural por el organismo microbiano hospedador. Un organismo hospedador puede modificarse genéticamente para aumentar la producción de un precursor, como se describe en la presente memoria. Además, se puede usar un organismo microbiano que se haya modificado genéticamente para producir un precursor deseado como un organismo hospedador y modificarse genéticamente de manera adicional para que exprese enzimas o proteínas de una vía de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico.

En algunas realizaciones, un organismo microbiano de origen no natural de la invención se genera a partir de un hospedador que contiene la capacidad enzimática de sintetizar ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico. En esta realización específica, puede ser útil aumentar la síntesis o acumulación de un producto de la vía de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico para, por ejemplo, impulsar reacciones de la vía de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico hacia la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico. El aumento de la síntesis o acumulación puede alcanzarse, por ejemplo, mediante la sobreexpresión de ácidos nucleicos que codifiquen una o más de las enzimas de la vía de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico descritas anteriormente. La sobreexpresión de la enzima o las enzimas de la vía de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico puede producirse, por ejemplo, a través de la expresión exógena del gen o los genes endógenos, o a través de la expresión exógena del gen o de los genes heterólogos. Por lo tanto, se pueden generar fácilmente organismos de origen natural para que sean organismos microbianos de origen no natural de la invención que produzcan hexametilendiamina y opcionalmente ácido 6-aminocaproico, a través de la sobreexpresión de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, es decir, incluso todos los ácidos nucleicos que codifiquen enzimas de la vía biosintética de ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina. Además, se puede generar un organismo de origen no natural mediante la mutagénesis de un gen endógeno que produzca un aumento en la actividad de una enzima en la vía biosintética de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico.

En realizaciones particularmente útiles, se emplea la expresión exógena de los ácidos nucleicos de codificación. La expresión exógena confiere la capacidad de adaptar los elementos de regulación y/o expresión al hospedador y la aplicación para lograr un nivel de expresión deseado controlado por el usuario. Sin embargo, la expresión exógena también puede utilizarse en otras realizaciones tal como mediante la remoción de un efector regulador negativo o la inducción del promotor del gen cuando se enlaza a un promotor inducible u otro elemento regulador. Por lo tanto, un gen endógeno con un promotor inducible de origen natural puede regularse positivamente mediante el suministro del agente de inducción adecuado, o la región reguladora de un gen endógeno puede modificarse genéticamente para incorporar un elemento regulador inducible, lo cual permite la regulación del aumento de la expresión de un gen endógeno en un momento deseado. De manera similar, un promotor inducible puede incluirse como un elemento regulador para un gen exógeno introducido en un organismo microbiano de origen no natural.

La invención proporciona de manera adicional un organismo microbiano de origen no natural que incluye una o más alteraciones genéticas, tales como las alteraciones genéticas descritas en el Ejemplo XXX y las Tablas 14-16, donde el organismo produce HMDA y opcionalmente 6-ACA. Las alteraciones se producen en genes que codifican una enzima que acopla la producción de 6-ACA y/o HMDA al desarrollo del organismo cuando la alteración genética reduce la actividad de la enzima, de forma tal que las alteraciones genéticas confieran un aumento de la producción de 6-ACA y/o HMDA al organismo de origen no natural. Por lo tanto, la invención proporciona un organismo microbiano de origen no natural, que comprende una o más alteraciones genéticas, donde la o las alteraciones genéticas se producen en genes que codifican proteínas o enzimas en donde la o las alteraciones genéticas confieran un aumento de la producción de 6-ACA y/o HMDA en el organismo. Como se describe en la presente memoria, un organismo de ese tipo contiene una vía para la producción de adipato, 6-ACA y/o HMDA, además de las alteraciones genéticas, tales como las que se ejemplifican en el Ejemplo XXX y las Tablas 14-16.

Se comprende que, en métodos de la invención, cualquiera del o de los ácidos nucleicos exógenos puede introducirse en un organismo microbiano para producir un organismo microbiano de origen no natural de la invención. Los ácidos nucleicos pueden introducirse de manera de conferir una vía biosintética de ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina al organismo microbiano. De manera alternativa, se pueden introducir ácidos nucleicos de codificación para producir un organismo microbiano intermedio que tenga la capacidad biosintética de catalizar algunas de las reacciones requeridas para conferir la capacidad de biosíntesis de ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina. Por ejemplo, un organismo microbiano de origen no natural con una vía biosintética de ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina puede comprender al menos dos ácidos nucleicos exógenos que codifiquen enzimas deseadas. En el caso de la producción de adipato, 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, al menos dos ácidos nucleicos exógenos 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. En el caso de la producción de ácido 6-aminocaproico, al menos dos ácidos nucleicos exógenos pueden codificar las enzimas tales como la combinación de una 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato (HODH) aldolasa y una 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) hidratasa, o una

2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) hidratasa y una 2-aminoheptano-1,7-dioato (2-AHD) descarboxilasa, una 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa y una adipil-CoA deshidrogenasa, una glutamil-CoA transferasa y una 6-aminopimeloil-CoA hidrolasa, o una glutaril-CoA beta-cetotilasa y una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa. En el caso de la producción de hexametildiamina, al menos dos ácidos nucleicos exógenos pueden codificar las enzimas tales como la combinación de 6-aminocaproato cinasa y [(6-aminohexanoil)oxil]fosfonato (6-AHOP) oxidorreductasa, o una 6-acetamidohexanoato cinasa y una [(6-acetamidohexanoil)oxil]fosfonato (6-AAHOP) oxidorreductasa, 6-aminocaproato N-acetiltransferasa y 6-acetamidohexanoil-CoA oxidorreductasa, una 3-hidroxi-6-aminopimeloil-CoA deshidratasa y una 2-amino-7-oxoheptanoato aminotransferasa, o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa y una homolisina descarboxilasa. Por lo tanto, se comprende que cualquier combinación de dos o más enzimas de una vía biosintética puede incluirse en un organismo microbiano de origen no natural de la invención.

De manera similar, se comprende que cualquier combinación de tres o más enzimas de una vía biosintética puede incluirse en un organismo microbiano de origen no natural, 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-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 y cuando la combinación de enzimas de la vía biosintética deseada tenga como resultado la producción del producto deseado correspondiente. En el caso de la producción de ácido 6-aminocaproico, los tres o más ácidos nucleicos exógenos pueden codificar las enzimas tales como la combinación de una 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato (HODH) aldolasa, una 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) hidratasa y una 2-oxoheptano-1,7-dioato (2-OHD) descarboxilasa, o una 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) hidratasa, una 2-aminohept-4-eno-1,7-dioato (2-AHE) reductasa y una 2-aminoheptano-1,7-dioato (2-AHD) descarboxilasa, o una 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, 2,3-deshidroadipil-CoA reductasa y una adipil-CoA deshidrogenasa, o una 6-amino-7-carboxiheptil-2-enoil-CoA reductasa, una 6-aminopimeloil-CoA hidrolasa y una 2-aminopimelato descarboxilasa, o una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una oxidorreductasa de 3-aminación y una 2-aminopimelato descarboxilasa, o una 3-oxoadipil-CoA tiolasa, una 5-carboxi-2-pentenoato reductasa y una adipato reductasa. En el caso de la producción de hexametildiamina, al menos tres ácidos nucleicos exógenos pueden codificar las enzimas tales como la combinación de 6-aminocaproato cinasa, [(6-aminohexanoil)oxil]fosfonato (6-AHOP) oxidorreductasa y semialdehído 6-aminocaproico aminotransferasa, o una 6-aminocaproato N-acetiltransferasa, una 6-acetamidohexanoato cinasa y una [(6-acetamidohexanoil)oxil]fosfonato (6-AAHOP) oxidorreductasa, o 6-aminocaproato N-acetiltransferasa, una [(6-acetamidohexanoil)oxil]fosfonato (6-AAHOP) aciltransferasa y 6-acetamidohexanoil-CoA oxidorreductasa, o una 3-oxo-6-aminopimeloil-CoA oxidorreductasa, una 3-hidroxi-6-aminopimeloil-CoA deshidratasa y una homolisina descarboxilasa, o una 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato aldolasa, una 2-oxo-7-aminohept-3-enoato reductasa y una homolisina descarboxilasa, o una 6-acetamidohexanoato reductasa, una 6-acetamidohexanal aminotransferasa y una 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa. De manera similar, cualquier combinación de cuatro o más enzimas de una vía biosintética descrita en la presente memoria puede incluirse en un organismo microbiano de origen no natural de la invención, según se desee, siempre y cuando la combinación de enzimas de la vía biosintética deseada tenga como resultado la producción del producto deseado correspondiente.

Además de la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico descrita en la presente memoria, el organismo microbiano de origen no natural y los métodos también pueden utilizarse en diversas combinaciones entre sí y con otros organismos microbianos y métodos muy conocidos en la técnica para lograr la biosíntesis de productos mediante otras vías. Por ejemplo, una alternativa para producir ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico que no implica el uso de los productores de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico es a través de la adición de otro organismo microbiano capaz de convertir un producto intermedio de la vía de adipato, ácido 6-aminocaproico o caprolactama en ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico. Un procedimiento de ese tipo incluye, por ejemplo, la fermentación de un organismo microbiano que produce un producto intermedio de la vía de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico. El producto intermedio de la vía de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico puede usarse entonces como un sustrato para un segundo organismo microbiano que convierta el producto intermedio de la vía de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico en ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico. El producto intermedio de la vía de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico puede añadirse directamente a otro cultivo del segundo organismo o el cultivo original de productores de productos intermedios de la vía de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico puede quedar desprovisto de estos organismos microbianos mediante, por ejemplo, separación celular, y luego se puede usar la adición posterior del segundo organismo al caldo de fermentación para producir el producto final sin etapas de purificación de productos intermedios.

En otras realizaciones, los organismos microbianos de origen no natural y métodos de la invención pueden ensamblarse en una amplia variedad de subvías para lograr la biosíntesis de hexametildiamina y opcionalmente ácido 6-aminocaproico. En estas realizaciones, se pueden segregar vías biosintéticas para un producto deseado de la invención en diferentes organismos microbianos y los diferentes organismos microbianos pueden cultivarse conjuntamente para producir el producto final. En un esquema biosintético de ese tipo, el producto de un organismo microbiano es el sustrato para un segundo organismo microbiano hasta que se sintetice el producto final. Por

ejemplo, la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina puede alcanzarse mediante la construcción de un organismo microbiano que contenga vías biosintéticas para la conversión de un producto intermedio de la vía en otro producto intermedio o el producto de la vía. De manera alternativa, también se puede producir ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina por biosíntesis a partir de organismos microbianos a través del cultivo conjunto o la fermentación conjunta mediante el uso de dos organismos en el mismo recipiente, donde el primer organismo microbiano produzca un ácido 6-aminocaproico y el segundo organismo microbiano convierta el producto intermedio en hexametilendiamina.

Teniendo en cuenta las indicaciones y los lineamientos que se proporcionan en la presente memoria, los expertos en la técnica comprenderán que existe una amplia variedad de combinaciones y permutaciones para los organismos microbianos de origen no natural y métodos de la invención junto con otros organismos microbianos, con el cultivo conjunto de otros organismos microbianos de origen no natural que tienen subvías y con combinaciones de otros procedimientos químicos y/o bioquímicos muy conocidos en la técnica para producir ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico.

De manera similar, los expertos en la técnica comprenden que un organismo hospedador puede seleccionarse en función de características deseadas para la introducción de una o más alteraciones genéticas para aumentar la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico. Por lo tanto, se comprende que, si se ha de introducir una modificación genética en un organismo hospedador para alterar un gen, cualquier homólogo, ortólogo o parólogo que catalice reacciones metabólicas similares pero no idénticas puede alterarse de manera similar para garantizar que una reacción metabólica deseada se altere en un grado suficiente. Dado que existen determinadas diferencias en las redes metabólicas entre diferentes organismos, los expertos en la técnica comprenderán que los genes efectivamente alterados en un organismo determinado pueden diferir de un organismo a otro. Sin embargo, teniendo en cuenta las indicaciones y los lineamientos que se proporcionan en la presente memoria, los expertos en la técnica también comprenderán que los métodos de la invención pueden aplicarse a cualquier microorganismo hospedador adecuado para identificar las alteraciones metabólicas cognadas necesarias para construir un organismo en una especie de interés que aumente la biosíntesis de hexametilendiamina y opcionalmente ácido 6-aminocaproico. En una realización particular, el aumento de la producción acopla la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina al desarrollo del organismo y puede acoplar obligatoriamente la producción de ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina al desarrollo del organismo si se desea y como se describe en la presente memoria.

Las fuentes de ácidos nucleicos de codificación para una enzima de la vía de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico pueden incluir, por ejemplo, cualquier especie donde el producto génico codificado sea capaz de catalizar la reacción mencionada. Esas especies incluyen organismos procariotas y eucariotas que incluyen, pero no se limitan a, bacterias, que incluyen arqueas y eubacterias, y eucariotas, que incluyen levaduras, plantas, insectos, animales y mamíferos, incluido el ser humano. Los ejemplos de especies para esas fuentes incluyen, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* cepa K12, *Escherichia coli* C, *Escherichia coli* W, *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas knackmussii*, *Pseudomonas* sp. cepa B13, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Vibrio cholera*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia proteamaculans*, *Streptomyces* sp. 2065, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Ralstonia eutropha*, *Ralstonia eutropha* H16, *Clostridium acetobutylicum*, *Euglena gracilis*, *Treponema denticola*, *Clostridium kluyveri*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Acinetobacter* sp. ADP1, *Acinetobacter* sp. cepa M-1, *Streptomyces coelicolor*, *Eubacterium barkeri*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium botulinum* cepa A3, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium thermoaceticum* (*Moorella thermoaceticum*), *Moorella thermoacetica*, *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*, *Bos taurus*, *Zoogloea ramigera*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Clostridium beijerinckii*, *Metallosphaera sedula*, la especie *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacter brockii*, *Acinetobacter baylyi*, *Porphyromonas gingivalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Sulfolobus tokodaii*, *Sulfolobus tokodaii* 7, *Sulfolobus solfataricus*, *Sulfolobus solfataricus*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Thermotoga maritima*, *Halobacterium salinarum*, *Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *Alkaliphilus metalliredigens*, *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Saccharomyces kluyveri*, *Helicobacter pylori*, *Corynebacterium glutamicum*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Streptomyces clavuligerus*, *Campylobacter jejuni*, *Thermus thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Bacteroides capillosus*, *Anaerotruncus colihominis*, *Natranerobius thermophilus*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304, *Haloarcula marismortui*, *Pyrobaculum aerophilum*, *Pyrobaculum aerophilum* cepa IM2, *Nicotiana tabacum*, *Mentha piperita*, *Pinus taeda*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*, *Rhodococcus opacus*, *Cupriavidus necator*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, *Ascaris suum*, la bacteria productora de butirato L2-50, *Bacillus megaterium*, *Methanococcus maripaludis*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina mazei*, *Methanocarcina barkeri*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Caenorhabditis elegans*, *Leishmania major*, *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z, *Chromohalobacter salexigens*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *trichomonas vaginalis* G3,

- Trypanosoma brucei*, *Mycoplana ramosa*, *Micrococcus luteus*, *Acetobacter pasteurians*, *Kluyveromyces lactis*, *Mesorhizobium loti*, *Lactococcus lactis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Candida boidinii*, *Candida albicans* SC5314, *Burkholderia ambifaria* AMMD, *Ascaris suum*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Burkholderia phymatum*, *Candida albicans*, *Clostridium subterminale*, *Cupriavidus taiwanensis*, *Flavobacterium lutescens*, *Lachancea kluyveri*, *Lactobacillus* sp. 30a, *Leptospira interrogans*, *Moorella thermoacetica*, *Myxococcus xanthus*, *Nicotiana glutinosa*, *Nocardia iowensis* (sp. NRRL 5646), *Pseudomonas reinekei* MT1, *Ralstonia eutropha* JMP134, *Ralstonia metallidurans*, *Rhodococcus jostii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Selenomonas ruminantium*, *Streptomyces clavuligenus*, *Syntrophus aciditrophicus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, así como otros ejemplos de especies que se describen en la presente memoria o se encuentran disponibles como organismos de origen para los genes correspondientes (véanse los Ejemplos). Sin embargo, con la secuencia genómica completa disponible ahora para más de 550 especies (con más de la mitad de estas disponibles en bases de datos públicas tales como la del NCBI), incluidos 395 genomas de microorganismos y una variedad de genomas de levaduras, hongos, plantas y mamíferos, la identificación de los genes que codifican la actividad biosintética de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico requerida para uno o más genes en especies relacionadas o distantes, lo cual incluye, por ejemplo, desplazamientos de genes homólogos, ortólogos, parálogos y no ortólogos de genes conocidos, y el intercambio de alteraciones genéticas entre organismos es de rutina y muy conocido en la técnica. Por consiguiente, las alteraciones metabólicas que permiten la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico que se describen en la presente memoria con respecto a un organismo particular tal como la *E. coli* pueden aplicarse fácilmente a otros microorganismos, lo cual incluye organismos procariotas y eucariotas por igual. Teniendo en cuenta las indicaciones y los lineamientos que se proporcionan en la presente memoria, los expertos en la técnica sabrán que una alteración metabólica ejemplificada en un organismo puede aplicarse de igual manera a otros organismos.
- En algunos casos, tal como cuando existe una vía biosintética de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico en una especie no relacionada, se puede conferir la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico a la especie del hospedador, por ejemplo, mediante la expresión exógena de uno o más parálogos de la especie no relacionada que catalicen una reacción metabólica similar pero no idéntica para remplazar la reacción mencionada. Dado que existen determinadas diferencias en las redes metabólicas entre diferentes organismos, los expertos en la técnica comprenderán que el uso efectivo de los genes puede diferir de un organismo a otro. Sin embargo, teniendo en cuenta las indicaciones y los lineamientos que se proporcionan en la presente memoria, los expertos en la técnica también comprenderán que las indicaciones y los métodos de la invención pueden aplicarse a todos los organismos microbianos mediante el uso de las alteraciones metabólicas cognadas que se ejemplifican en la presente memoria para construir un organismo microbiano en una especie de interés que sintetice hexametildiamina y opcionalmente ácido 6-aminocaproico.
- Los organismos microbianos hospedadores pueden seleccionarse de entre, y los organismos microbianos de origen no natural pueden generarse en, por ejemplo, bacterias, levaduras, hongos, o cualquiera de una variedad de otros microorganismos aplicables a procesos de fermentación. Los ejemplos de bacterias incluyen especies que se seleccionan de entre *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 que se seleccionan de entre *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, y similares. Por ejemplo, la *E. coli* es un organismo hospedador particularmente útil dado que es un organismo microbiano bien caracterizado adecuado para la modificación genética. Otros organismos hospedadores particularmente útiles incluyen levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*. Se comprende que se puede usar cualquier organismo hospedador microbiano adecuado para introducir modificaciones metabólicas y/o genéticas para producir un producto deseado.
- Los métodos para construir y evaluar los niveles de expresión de un hospedador productor de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico de origen no natural pueden realizarse, por ejemplo, mediante métodos recombinantes y de detección muy conocidos en la técnica. Esos métodos pueden encontrarse descritos, por ejemplo, en Sambrook et ál., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001); y Ausubel et ál., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999).
- Las secuencias de ácidos nucleicos exógenos involucradas en una vía para la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico pueden introducirse de manera estable o transitoria en una célula hospedadora mediante el uso de técnicas muy conocidas en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, la conjugación, electroporación, transformación química, transducción, transfección y transformación por ultrasonido. Para la expresión exógena en *E. coli* u otras células procariotas, algunas secuencias de ácidos nucleicos en los genes o ADNc de ácidos nucleicos eucariotas pueden codificar señales de direccionamiento tales como una señal mitocondrial de extremo N u otra señal de direccionamiento, que pueden removerse antes de la transformación en células hospedadoras procariotas, si se desea. Por ejemplo, la remoción de una secuencia líder mitocondrial condujo a un aumento de la expresión en *E. coli* (Hoffmeister et ál., *J. Biol. Chem.* 280:4329-4338 (2005). Para la

expresión exógena en levadura u otras células eucariotas, los genes pueden expresarse en el citosol sin la adición de una secuencia líder, o pueden dirigirse a la mitocondria u otros organelos, o dirigirse para la secreción, mediante la adición de una secuencia de direccionamiento adecuada tal como una señal de secreción o direccionamiento mitocondrial adecuada para las células hospedadoras. Por lo tanto, se comprende que las modificaciones adecuadas en una secuencia de ácidos nucleicos para remover o incluir una secuencia de direccionamiento pueden incorporarse en una secuencia de ácidos nucleicos exógena para proporcionar propiedades convenientes. Además, los genes pueden someterse a una optimización de codones con técnicas muy conocidas en la técnica para lograr la expresión optimizada de las proteínas.

Uno o más vectores de expresión pueden construirse para incluir una o más vías biosintéticas de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico que codifiquen ácidos nucleicos como se ejemplifica en la presente memoria enlazados de manera operativa a secuencias de control de expresión funcionales en el organismo hospedador. Los vectores de expresión aplicables para el uso en los organismos hospedadores microbianos de la invención incluyen, por ejemplo, plásmidos, vectores de fagos, vectores virales, episomas y cromosomas artificiales, lo cual incluye marcadores o secuencias de selección y vectores que se puedan usar para la integración estable en un cromosoma hospedador. De manera adicional, los vectores de expresión pueden incluir uno o más genes marcadores seleccionables y secuencias de control de expresión adecuadas. También se pueden incluir genes marcadores seleccionables que, por ejemplo, proporcionen resistencia a antibióticos o toxinas, complementen deficiencias auxotróficas o suministren nutrientes fundamentales que no se encuentren en el medio de cultivo. Las secuencias de control de 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 han de expresar conjuntamente dos o más ácidos nucleicos de codificación exógenos, ambos ácidos nucleicos pueden insertarse, por ejemplo, en un solo vector de expresión o en vectores de expresión separados. Para la expresión en un solo vector, los ácidos nucleicos de codificación pueden enlazarse de manera operativa a una secuencia de control de expresión común o enlazarse a secuencias de control de expresión diferentes, tales como un promotor inducible y un promotor constitutivo. La transformación de secuencias de ácidos nucleicos exógenas involucradas en una vía metabólica o sintética puede confirmarse mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica. Esos métodos incluyen, por ejemplo, el análisis de ácidos nucleicos tales como las transferencias Northern o la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de un ARNm, o la inmunotransferencia para la expresión de productos génicos, u otros métodos analíticos adecuados para evaluar la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos introducida o su producto génico correspondiente. Los expertos en la técnica comprenden que el ácido nucleico exógeno se expresa en una cantidad suficiente para producir el producto deseado, y se comprende además que los niveles de expresión pueden optimizarse para obtener una expresión suficiente mediante métodos muy conocidos en la técnica y como se describe en la presente memoria.

La evolución dirigida es una estrategia que implica la introducción de mutaciones dirigidas a un gen específico con el fin de mejorar y/o alterar las propiedades de una enzima. Las enzimas mejoradas y/o alteradas pueden identificarse a través de la implementación de ensayos de examinación que permitan la identificación de variantes útiles. Los métodos de examinación particularmente útiles incluyen ensayos de alto rendimiento sensibles que permiten la examinación automatizada de muchas variantes de enzimas (p. ej., $>10^4$). Normalmente se realizan rondas iterativas de mutagénesis y examinación para identificar una enzima con propiedades optimizadas. Cuanto mayor es la cantidad de variantes examinadas, mayor es la probabilidad de identificar una variante idealmente adecuada. También se han desarrollado algoritmos informáticos que pueden ayudar a identificar áreas del gen para la mutagénesis y estos pueden reducir de manera significativa la cantidad de variantes de enzimas que se necesita generar y examinar.

Se han desarrollado numerosas tecnologías de evolución dirigida (para acceder a reseñas, véase Hibbert et ál., *Biomol. Eng* 22:11-19 (2005); Huisman y Lalonde, en *Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries* págs. 717-742 (2007), Patel (ed.), CRC Press; Otten y Quax. *Biomol. Eng* 22:1-9 (2005); y Sen et ál., *Appl Biochem. Biotechnol* 143:212-223 (2007)) para la creación eficaz de diversas bibliotecas de variantes y estos métodos se han aplicado con éxito a la mejora de una amplia variedad de propiedades en muchas clases de enzimas.

Las características enzimáticas que se han mejorado y/o alterado mediante tecnologías de evolución dirigida incluyen, por ejemplo, la selectividad/especificidad —para la conversión de sustratos no naturales—; la estabilidad de temperatura —para el procesamiento potente a altas temperaturas—; la estabilidad de pH —para el bioprocesamiento en condiciones de pH más bajo o más alto—; la tolerancia al sustrato o producto —para que se puedan lograr titulaciones altas del producto; la unión (K_m) —ampliación de la unión del sustrato para incluir sustratos no naturales—; la inhibición (K_i) —para remover la inhibición por parte de productos, sustratos o productos intermedios esenciales—; la actividad (kcat) —aumento de las tasas de reacción enzimática para lograr el flujo deseado; los niveles de expresión —aumento de los rendimientos de proteínas y el flujo general de la vía; la estabilidad con respecto al oxígeno —para el funcionamiento de enzimas sensibles al aire en condiciones aerobias; y la actividad anaerobia —para el funcionamiento de una enzima aerobia en ausencia de oxígeno—.

Los ejemplos de métodos que siguen se han desarrollado para la mutagénesis y diversificación de genes para dirigirse a propiedades deseadas de enzimas específicas. Se puede usar cualquiera de estos para alterar/optimizar la actividad de una enzima descarboxilasa.

La EpPCR (Pritchard et ál., J Theor. Biol 234:497-509 (2005)) introduce mutaciones puntuales aleatorias mediante la reducción de la fidelidad de la ADN polimerasa en reacciones PCR mediante la adición de iones Mn^{2+} , mediante la desviación de las concentraciones de dNTP, o mediante otras variaciones en las condiciones. El proceso de clonación en cinco etapas para confinar la mutagénesis al gen de interés objetivo implica: 1) la amplificación por PCR propensa a errores del gen de interés; 2) la digestión de enzimas de restricción; 3) la purificación con gel del fragmento de ADN deseado; 4) la ligación en un vector; 5) la transformación de las variantes génicas en un hospedador adecuado y la examinación de la biblioteca en busca de una mejora en el rendimiento. Este método puede generar múltiples mutaciones en un solo gen de manera simultánea, lo cual puede ser útil. Se puede generar una cantidad alta de mutaciones mediante EpPCR, por lo que un método de selección o un ensayo de examinación de alto rendimiento (especialmente mediante el uso de robótica) es útil para identificar aquellas con características convenientes.

La amplificación por círculo rodante propensa a errores (epRCA, por sus siglas en inglés) (Fujii et ál., Nucleic Acids Res 32:e145 (2004); y Fujii et ál., Nat. Protoc. 1:2493-2497 (2006)) tiene muchos de los mismos elementos que la epPCR con la excepción de que se usa un plásmido circular completo como la plantilla y se usan 6-meros aleatorios con enlaces tiofosfato resistentes a la exonucleasa en los últimos 2 nucleótidos para amplificar el plásmido, tras lo cual sigue la transformación en las células en donde el plásmido se vuelve a circularizar en repeticiones en tándem. El ajuste de la concentración de Mn^{2+} puede variar en cierta medida la tasa de mutación. Esta técnica usa un método simple etapa con propensión a errores para crear una copia completa del plásmido con 3-4 mutaciones/kbp. No se necesita una digestión enzimática ni cebadores específicos. De manera adicional, este método se encuentra disponible normalmente como un kit.

La trasposición de ADN o familiar (Stemmer, Proc Natl Acad Sci EUA 91:10747-10751 (1994); y Stemmer, Nature 370:389-391 (1994)) implica normalmente la digestión de dos o más variantes de genes con nucleasas tales como la Dnasa I o EndoV para generar un grupo de fragmentos aleatorios reensamblados mediante ciclos de hibridación y extensión en presencia de la ADN polimerasa para crear una biblioteca de genes quiméricos. Los fragmentos se ceban entre sí y se produce la recombinación cuando una copia ceba a otra copia (intercambio de plantillas). Este método puede usarse con secuencias de ADN de >1 kbp. Además de recombinaciones de mutación creadas mediante el reensamblaje de fragmentos, este método introduce mutaciones puntuales en las etapas de extensión en una tasa similar a la PCR propensa a errores. El método puede usarse para remover mutaciones perjudiciales, aleatorias y neutras que puedan conferir antigenicidad.

La extensión escalonada (StEP) (Zhao et ál., Nat. Biotechnol 16:258-261 (1998)) implica el cebado de plantillas seguido por ciclos repetidos de PCR en 2 etapas con desnaturalización y una duración muy corta de hibridación/extensión (con hasta una duración mínima de 5 seg). Los fragmentos en desarrollo se hibridan en diferentes plantillas y se extienden de manera adicional, lo cual se repite hasta que se generan secuencias de longitud completa. El intercambio de plantillas significa que la mayoría de los fragmentos resultantes tienen múltiples progenitores. Las combinaciones de polimerasas de baja fidelidad (Taq y Mutazyme) reducen desviaciones propensas a errores debido a espectros de mutación opuestos.

En la recombinación de cebado aleatoria (RPR, por sus siglas en inglés), se usan cebadores de secuencia aleatorias para generar muchos fragmentos de ADN cortos complementarios con respecto a diferentes segmentos de la plantilla. (Shao et ál., Nucleic Acids Res 26:681-683 (1998)) Los errores en la incorporación de bases y errores en el cebado a través de la epPCR proporcionan mutaciones puntuales. Los fragmentos de ADN cortos se ceban entre sí en función de la homología y se recombinan y reensamblan en longitud completa mediante el termociclado repetido. La remoción de plantillas antes de esta etapa garantiza recombinaciones originales bajas. Este método, al igual que muchos otros, puede realizarse en múltiples iteraciones para desarrollar distintas propiedades. Esta tecnología evita desviaciones en las secuencias, es independiente de la longitud de los genes y requiere muy poco ADN original para la aplicación.

En la recombinación heteroduplexada, se usa ADN plasmídico linealizado para formar heterodúplex reparados mediante la reparación de errores de emparejamiento. (Volkov et ál., Nucleic Acids Res 27:e18 (1999); y Volkov et ál., Methods Enzymol. 328:456-463 (2000)) La etapa de reparación de errores de emparejamiento es al menos en parte mutagénica. Los heterodúplex se transforman con mayor eficiencia que los homodúplex lineales. Este método es adecuado para genes grandes y operones completos.

La quimeragénesis aleatoria en plantillas transitorias (RACHITT) (Coco et ál., Nat. Biotechnol 19:354-359 (2001)) emplea la fragmentación de Dnasa I y el fraccionamiento por tamaño del ADN monocatenario. Los fragmentos homólogos se hibridan en la ausencia de polimerasa en un almacén de ADN monocatenario complementario. Cualquier extremo de fragmento no hibridado en superposición se recorta mediante una exonucleasa. Los huecos entre los fragmentos se llenan y luego se ligan para proporcionar un grupo de diversas cadenas de longitud completa hibridadas en el almacén (que contiene U para impedir la amplificación). Luego, el almacén se destruye y se reemplaza por una nueva cadena complementaria con respecto a la cadena diversa mediante la amplificación de PCR. El método involucra una cadena (almacén) proveniente de un solo progenitor mientras que los fragmentos de cebado derivan de otros genes; se evita la selección del almacén original. Por lo tanto, no se produce ninguna rehibridación con fragmentos originales. Los fragmentos en superposición se recortan con una exonucleasa. Por lo demás, esto es conceptualmente similar a la trasposición de ADN y StEP. Por lo tanto, no debería haber ningún

hermanamiento, pocos elementos inactivos y ningún elemento original sin trasposición. Esta técnica tiene ventajas en cuanto a que se crean pocos o ningún gen original y se pueden producir muchos más cruzamientos en relación con la trasposición de ADN estándar.

La extensión recombinada en plantillas truncadas (RETT, por sus siglas en inglés) implica el intercambio de plantillas de cadenas en desarrollo unidireccional a partir de cebadores en presencia de fragmentos de ADN monocatenario unidireccional que se usan como un grupo de plantillas. (Lee et ál., *J.Molec.Catalysis* 26:119-129 (2003)) No se usan endonucleasas de ADN. Se genera ADN monocatenario unidireccional mediante ADN polimerasa con cebadores aleatorios o eliminación en serie con exonucleasa. Los ADN monocatenarios unidireccionales son solamente plantillas y no cebadores. El cebado aleatorio y las exonucleasas no introducen desviaciones de secuencias como sucede con la escisión enzimática de la trasposición de ADN/RACHITT. La RETT puede ser más fácil de optimizar que la StEP dado que usa condiciones de PCR normales en lugar de extensiones muy cortas. La recombinación se produce como un componente de las etapas de PCR —sin trasposición directa—. Este método también puede ser más aleatorio que la StEP debido a la ausencia de interrupciones.

En la trasposición génica de oligonucleótidos con degeneración (DOGS, por sus siglas en inglés), se usan cebadores degenerados para controlar la recombinación entre moléculas; (Bergquist y Gibbs, *Methods Mol. Biol* 352:191-204 (2007); Bergquist et ál., *Biomol. Eng* 22:63-72 (2005); Gibbs et ál., *Gene* 271:13-20 (2001)) esto puede usarse para controlar la tendencia de otros métodos tales como la trasposición de ADN a regenerar genes originales. Este método puede combinarse con la mutagénesis aleatoria (epPCR) de segmentos génicos seleccionados. Este puede ser un buen método para bloquear la reforma de secuencias originales. No se necesitan endonucleasas. Mediante el ajuste de las concentraciones de segmentos elaborados que se introducen, se puede tender a una estructura principal deseada. Este método permite la trasposición de ADN a partir de progenitores no relacionados sin digestión de enzimas de restricción y permite una selección de métodos de mutagénesis aleatoria.

El truncamiento en incremento para la creación de enzimas híbridas (ITCHY, por sus siglas en inglés) crea una biblioteca de combinaciones con eliminaciones de 1 par de bases de un gen o fragmento génico de interés. (Ostermeier et ál., *Proc Natl Acad Sci EUA* 96:3562-3567 (1999); y Ostermeier et ál., *Nat. Biotechnol* 17:1205-1209 (1999)) Se introducen truncamientos en dirección opuesta en partes de 2 genes diferentes. Estos se ligan entre sí y las fusiones se clonan. Esta técnica no requiere homología entre los 2 genes originales. Cuando el ITCHY se combina con la trasposición de ADN, el sistema se denomina «SCRATCHY» (véase más adelante). Una ventaja fundamental de ambos es que no se necesita homología entre los genes originales; por ejemplo, se crearon fusiones funcionales entre una *E. coli* y un gen humano a través de ITCHY. Cuando se elaboran bibliotecas de ITCHY, se capturan todos los posibles cruzamientos.

El truncamiento en incrementos de Thio para la creación de enzimas híbridas (THIO-ITCHY) es similar al ITCHY con la excepción de que se usan dNTP de fosfotioato para generar truncamientos. (Lutz et al., *Nucleic Acids Res* 29:E16 (2001)) En relación con el ITCHY, el THIO-ITCHY puede ser más fácil de optimizar, proporcionar más capacidad de reproducción y capacidad de ajuste.

El SCRATCHY combina dos métodos para recombinar genes, el ITCHY y la trasposición de ADN. (Lutz et ál., *Proc Natl Acad Sci EUA* 98:11248-11253 (2001)) El SCRATCHY combina las mejores características del ITCHY y la trasposición de ADN. En primer lugar, se usa el ITCHY para crear un conjunto integral de fusiones entre fragmentos de genes con independencia de la homología del ADN. Esta familia artificial se somete luego a la etapa de trasposición de ADN para aumentar la cantidad de cruzamientos. Se pueden usar predicciones informáticas en la optimización. El SCRATCHY es más eficaz que la trasposición de ADN cuando la identidad de secuencia es de menos del 80 %.

En la mutagénesis de derivación aleatoria (RNDM), se generan mutaciones a través de epPCR seguidas por la examinación/selección de aquellas que conservan actividad utilizable. (Bergquist et ál., *Biomol. Eng* 22:63-72 (2005)) Luego, estas se usan en la DOGS para generar recombinaciones con fusiones entre múltiples mutaciones activas o entre mutaciones activas y algún otro progenitor conveniente. Diseñada para promover el aislamiento de mutaciones neutras, su propósito es examinar en busca de actividad catalítica conservada, ya sea que esta actividad sea mayor o menor que en el gen original. La RNDM puede utilizarse en ensayos de alto rendimiento cuando la examinación es capaz de detectar la actividad por encima de los niveles de fondo. La RNDM se ha usado como una interfaz para la DOFS en la generación de diversidad. La técnica impone una necesidad de actividad anterior a la trasposición u otras etapas posteriores; se indica que las bibliotecas de derivación neutras producen mejoras más altas/más rápidas en la actividad con respecto a bibliotecas más pequeñas. Aunque publicada con el uso de epPCR, esto podría aplicarse a otros métodos de mutagénesis a gran escala.

La mutagénesis de saturación de secuencias (SeSaM) es un método de mutagénesis aleatoria que: 1) genera un grupo de fragmentos de longitud aleatoria mediante la incorporación aleatoria de un nucleótido de fosfotioato y escisión; este grupo se usa como una plantilla para 2) la extensión en presencia de bases «universales» tales como inosina; 3) la replicación de un complemento que contiene inosina proporciona la incorporación de bases aleatorias y, en consecuencia, la mutagénesis. (Wong et ál., *Biotechnol J* 3:74-82 (2008); Wong et ál., *Nucleic Acids Res* 32:e26 (2004); y Wong et ál., *Anal.Biochem.* 341:187-189 (2005)) Mediante el uso de esta técnica, puede ser posible generar una gran biblioteca de mutaciones en un lapso de 2-3 días mediante el uso de métodos simples. Esta

técnica no es dirigida en comparación con la desviación de mutación de las ADN polimerasas. Las diferencias en esta estrategia hacen que esta técnica sea complementaria (o alternativa) a la epPCR.

En la trasposición sintética, se diseñan oligonucleótidos en superposición para codificar «toda la diversidad genética en las dianas» y permitir una diversidad muy alta para la progenie sometida a trasposición. (Ness et ál., Nat. Biotechnol 20:1251-1255 (2002)) En esta técnica, se pueden diseñar los fragmentos que se hayan de trasponer. Esto ayuda a aumentar la diversidad resultante de la progenie. Se puede diseñar desviaciones de secuencias/codones para hacer que las secuencias con una relación distante se recombinen en tasas que se aproximen a aquellas observadas en secuencias con una relación más estrecha. De manera adicional, la técnica no requiere poseer físicamente los genes de plantilla.

La tecnología de intercambio y escisión de nucleótidos Next hace uso de una combinación de la incorporación de dUTP seguida por el tratamiento con uracilo ADN glicosilasa y luego piperidina para realizar la fragmentación de ADN en los puntos finales. (Muller et ál., Nucleic Acids Res 33:e117 (2005)) El gen se reensambla mediante el uso de la extensión del cebador de PCR interna con polimerasa correctiva. Los tamaños para la trasposición pueden controlarse directamente mediante el uso de diversas relaciones dUPT::dTTP. Esta es una reacción en los puntos finales mediante el uso de métodos simples para la incorporación de uracilo y escisión. Se pueden usar otros análogos de nucleótidos, tales como la 8-oxo-guanina, con este método. De manera adicional, la técnica funciona bien con fragmentos muy cortos (86 pb) y tiene una tasa de error baja. La escisión química de ADN usada en esta técnica produce muy pocos clones sin trasposición.

En la recombinación de proteínas con independencia de la homología de secuencia (SHIPREC), se usa un enlazador para facilitar la fusión entre dos genes distantes/no relacionados. Se usa el tratamiento con nucleasas para generar una variedad de quimeras entre los dos genes. Estas fusiones producen bibliotecas de híbridos de cruzamiento único. (Sieber et ál., Nat. Biotechnol 19:456-460 (2001)) Esto produce un tipo limitado de trasposición y se necesita un proceso separado para la mutagénesis. Además, dado que no se necesita homología, esta técnica puede crear una biblioteca de quimeras con fracciones variables de cada uno de los dos genes originales no relacionados. La SHIPREC se evaluó con un dominio de unión a hemo de una CP450 bacteriana fusionada a regiones de extremo N de una CP450 de mamífero; esto produjo actividad mamífera en una enzima más soluble.

En la Gene Site Saturation Mutagenesis™ (GSSM™), los materiales iniciales son un plásmido de ADN bicatenario superenrollado que contiene un inserto y dos cebadores que se degeneran en el sitio deseado de mutaciones. (Kretz et ál., Methods Enzymol. 388:3-11 (2004)) Los cebadores que contienen la mutación de interés se hibridan con la misma secuencia en cadenas opuestas del ADN. Normalmente la mutación es en el centro del cebador y está flanqueada de cada lado por -20 nucleótidos de la secuencia correcta. La secuencia en el cebador es NNN o NNK (de codificación) y MNN (sin codificación) (N = los 4, K = G, T, M = A, C). Después de la extensión, se usa DpnI para digerir ADN con metilación dam para eliminar la plantilla de tipo salvaje. Esta técnica explora todas las posibles sustituciones de aminoácidos en un locus determinado (es decir, un codón). La técnica facilita la generación de todos los remplazos posibles en un solo sitio sin codones sin sentido y produce una representación igual o casi igual de la mayoría de los alelos posibles. Esta técnica no requiere un conocimiento previo de la estructura, el mecanismo o los dominios de la enzima objetivo. Si es sucedida por la trasposición o el reensamblaje génico, esta tecnología crea una biblioteca diversa de recombinantes que contiene todas las combinaciones posibles de mutaciones aceleradoras en un solo sitio. Se ha demostrado la utilidad de esta combinación de tecnologías para la evolución exitosa de más de 50 enzimas diferentes y también para más de una propiedad en una enzima determinada.

La mutagénesis de casete de combinación (CCM, por sus siglas en inglés) implica el uso de casetes de oligonucleótidos cortos para remplazar regiones limitadas con una gran cantidad de posibles alteraciones en las secuencias de aminoácidos. (Reidhaar-Olson et ál. Methods Enzymol. 208:564-586 (1991); y Reidhaar-Olson et ál. Science 241:53-57 (1988)) Las sustituciones simultáneas en dos o tres sitios son posibles mediante el uso de esta técnica. De manera adicional, el método evalúa una gran multiplicidad de cambios posibles en las secuencias en una variedad limitada de sitios. Esta técnica se ha usado para explorar el contenido de información del dominio de unión a ADN represor lambda.

La mutagénesis de casete múltiple de combinación (CMCM, por sus siglas en inglés) es esencialmente similar a la CCM con la excepción de que se emplea como parte de un programa más grande: 1) El uso de epPCR con una tasa de mutación alta para 2) identificar puntos clave y regiones clave y luego 3) la extensión mediante CMCM para abarcar una región definida de espacio de secuencia de proteína (Reetz, M. T., S. Wilensek, D. Zha y K. E. Jaeger, 2001, Directed Evolution of an Enantioselective Enzyme through Combinatorial Multiple-Cassette Mutagenesis. Angew. Chem. Ed. internacional, Intl. 40:3589-3591.) Al igual que la CCM, este método puede evaluar virtualmente todas las posibles alteraciones en una región objetivo. Si se usa junto con métodos para crear mutaciones aleatorias y genes sometidos a trasposición, proporciona un medio excelente para generar diversas proteínas sometidas a trasposición. Esta estrategia fue exitosa en el aumento, en 51 veces, de la enantioselectividad de una enzima.

En la técnica de cepas de mutación, los plásmidos de mutación *ts* condicionales permiten aumentos de 20 a 4000 veces en la frecuencia de mutación aleatoria y natural durante la selección y la acumulación en bloques de mutaciones perjudiciales cuando no se necesita selección. (Selifonova et ál., Appl Environ Microbiol 67:3645-3649 (2001)) Esta tecnología se basa en un gen *mutD5* derivado de un plásmido, que codifica una subunidad mutante de

la ADN polimerasa III. Esta subunidad se une a la ADN polimerasa III endógena y pone en riesgo la capacidad correctiva de la polimerasa III en cualquier cepa que albergue el plásmido. Se produce un amplio espectro de sustituciones de bases y mutaciones de cambio de marco. Con el fin de un uso eficaz, el plásmido de mutación debería removerse una vez logrado el fenotipo deseado; esto se alcanza a través de un origen de replicación sensible a la temperatura, lo cual permite el curado del plásmido a 41 °C. Cabe destacar que se han explorado cepas de mutación durante bastante tiempo (p. ej., véase Low et ál., J. Mol. Biol. 260:359-3680 (1996)). En esta técnica, se observan tasas de mutación espontánea muy altas. La propiedad condicional minimiza mutaciones de fondo no deseadas. Esta tecnología podría combinarse con la evolución adaptativa para mejorar las tasas de mutagénesis y lograr con mayor rapidez los fenotipos deseados.

«La mutagénesis de revisión (LTM) es un método de mutagénesis multidimensional que evalúa y optimiza mutaciones de combinación de aminoácidos seleccionados». (Rajpal et ál., Proc Natl Acad Sci EUA 102:8466-8471 (2005)) En lugar de saturar cada sitio con todos los cambios de aminoácidos posibles, se escoge un conjunto de nueve para abarcar el rango de estructura químicas de grupos R de los aminoácidos. Una menor cantidad de cambios por sitio permite que múltiples sitios se sometan a este tipo de mutagénesis. A través de este método, se ha logrado un aumento de >800 veces en la afinidad de unión para un anticuerpo de escala nanomolar baja a picomolar. Este método es una estrategia racional para minimizar la cantidad de combinaciones aleatorias y puede aumentar la capacidad de encontrar rasgos mejorados mediante la disminución en gran medida de las cantidades de clones a examinar. Esto se ha aplicado a la modificación genética de anticuerpos, específicamente para aumentar la afinidad de unión y/o reducir la disociación. La técnica puede combinarse con exámenes o selecciones.

El reensamblaje génico es un método de trasposición de ADN que puede aplicarse a múltiples genes a la vez o a la creación de una gran biblioteca de quimeras (múltiples mutaciones) de un solo gen (la tecnología Tunable GeneReassembly™ (TGR™) suministrada por Verenum Corporation). Normalmente, esta tecnología se usa en combinación con una examinación de rendimiento ultraalto para buscar el espacio de secuencia representado en pos de mejoras deseadas. Esta técnica permite múltiples recombinaciones génicas con independencia de la homología. La cantidad y posición exacta de sucesos de cruzamiento puede determinarse mediante el uso de fragmentos diseñados a través de análisis bioinformáticos. Esta tecnología conduce a un nivel muy alto de diversidad prácticamente sin reforma de genes originales y un bajo nivel de genes inactivos. En combinación con GSSM™, se puede evaluar una gran variedad de mutaciones en busca de mejoras en la actividad. El método permite la «combinación» y el «ajuste preciso» de la trasposición de ADN, p. ej., se puede optimizar el uso de codones.

La automatización del diseño de proteínas (PDA, por sus siglas en inglés) *in silico* (PDA) es un algoritmo de optimización que ancla la estructura principal de la proteína definida estructuralmente que posee un plegamiento particular y busca espacios de secuencias para sustituciones de aminoácidos que puedan estabilizar el plegamiento y la energía general de la proteína. (Hayes et ál., Proc Natl Acad Sci EUA 99:15926-15931 (2002)) Esta tecnología usa predicciones de entropía con base en la estructura *in silico* con el fin de buscar una tolerancia estructural hacia variaciones de aminoácidos de proteínas. Se aplica la mecánica estadística para calcular interacciones de acoplamiento en cada posición. La tolerancia estructural hacia la sustitución de aminoácidos es una medida del acoplamiento. En última instancia, esta tecnología está diseñada para proporcionar modificaciones deseadas de propiedades de las proteínas y al mismo tiempo mantener la integridad de las características estructurales. El método realiza una evaluación informática y permite la filtración de una cantidad muy grande de posibles variantes de secuencias (10^{50}). La selección de variantes de secuencias a evaluar se relaciona con predicciones basadas en la termodinámica más favorable. Ostensiblemente, solo la estabilidad o propiedades asociadas a la estabilidad pueden abordarse de manera eficaz con esta tecnología. El método se ha usado con éxito en algunas proteínas terapéuticas, especialmente en la modificación genética de inmunoglobulinas. Las predicciones *in silico* evitan la evaluación de cantidades extraordinariamente grandes de posibles variantes. Las predicciones basadas en estructuras tridimensionales existentes tienen mayor probabilidad de éxito que las predicciones basadas en estructuras hipotéticas. Esta tecnología puede predecir y permitir fácilmente la examinación dirigida de múltiples mutaciones simultáneas, algo que no es posible con tecnologías puramente experimentales debido a los aumentos exponenciales en las cantidades.

La mutagénesis de saturación iterativa (ISM, por sus siglas en inglés) implica: 1) usar el conocimiento de la estructura/función para escoger un sitio probable para la mejora de las enzimas; 2) la mutagénesis de saturación en el sitio seleccionado mediante el uso de Stratagene QuikChange (u otros medios adecuados); 3) examinar/seleccionar propiedades deseadas; y 4) con uno o más clones mejorados, comenzar de nuevo en otro sitio y seguir repitiendo. (Reetz et ál., Nat. Protoc. 2:891-903 (2007); y Reetz et ál., Angew. Chem. Edición internacional. Engl. 45:7745-7751 (2006)) Esta es una metodología probada, que garantiza que se realicen todos los remplazos posibles en una posición determinada para la examinación/selección.

Cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para la mutagénesis puede usarse de manera individual o en cualquier combinación. De manera adicional, cualquiera de los métodos de evolución dirigida o sus combinaciones pueden usarse junto con técnicas de evolución adaptativa.

La invención proporciona de manera adicional métodos para producir un producto intermedio o producto deseado tal como ácido 6-aminocaproico o hexametilendiamina. Por ejemplo, un método para producir adipato puede implicar el

cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de adipato, donde la vía incluya al menos un ácido nucleico exógeno que codifique una enzima de la vía de adipato expresada en una cantidad suficiente como para producir adipato, en condiciones y durante un período de tiempo suficiente como para producir adipato, donde la vía de adipato incluya 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. De manera adicional, un método para producir adipato puede implicar el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de adipato, donde la vía incluya al menos un ácido nucleico exógeno que codifique una enzima de la vía de adipato expresada en una cantidad suficiente como para producir adipato, en condiciones y durante un período de tiempo suficiente como para producir adipato, donde la vía de adipato incluya succinil-CoA:acetil-CoA acil transferasa, 3-oxoadipil-CoA transferasa, 3-oxoadipato reductasa, 3-hidroxiadipato deshidratasa y 2-enoato reductasa.

Además, un método para producir ácido 6-aminocaproico puede implicar cultivar un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico, donde la vía incluya al menos un ácido nucleico exógeno que codifique una enzima de la vía de ácido 6-aminocaproico expresada en una cantidad suficiente como para producir ácido 6-aminocaproico, en condiciones y durante un período de tiempo suficiente como para producir ácido 6-aminocaproico, donde la vía de ácido 6-aminocaproico incluya aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA y transaminasa o 6-aminocaproato deshidrogenasa. De manera adicional, un método para producir caprolactama puede implicar el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de caprolactama, donde la vía incluya al menos un ácido nucleico exógeno que codifique una enzima de la vía de caprolactama expresada en una cantidad suficiente como para producir caprolactama, en condiciones y durante un período de tiempo suficiente como para producir caprolactama, donde la vía de caprolactama incluya aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA, transaminasa o 6-aminocaproato deshidrogenasa y amidohidrolasa.

En la presente memoria, también se describen métodos para producir ácido 6-aminocaproico (6-ACA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de 6-ACA descrita en la presente memoria en condiciones y durante un período de tiempo suficiente como para producir 6-ACA. En un aspecto, la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED reductasa; una 2-OHD descarboxilasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidoreductasa (de aminación). En otro aspecto, la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED descarboxilasa; una 6-OHE reductasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidoreductasa (de aminación). En incluso otro aspecto, la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED aminotransferasa o una OHED oxidoreductasa (de aminación); una 2-AHE reductasa; y una 2-AHD descarboxilasa. En incluso otro aspecto adicional, la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED reductasa; una 2-OHD aminotransferasa o una 2-OHD oxidoreductasa (de aminación); y una 2-AHD descarboxilasa. En incluso otro aspecto adicional, la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una HODH formiato-liasa y una enzima de activación de piruvato formiato-liasa o una HODH deshidrogenasa; una 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa; una 2,3-deshidroadiipil-CoA reductasa; una adipil-CoA deshidrogenasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidoreductasa (de aminación). En incluso otro aspecto adicional, la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED reductasa; una 2-OHD formiato-liasa y una enzima de activación de piruvato formiato-liasa o una 2-OHD deshidrogenasa; una adipil-CoA deshidrogenasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidoreductasa (de aminación). En un aspecto adicional, las vías de 6-ACA descritas anteriormente pueden incluir una semialdehído succínico deshidrogenasa, una alfa-cetoglutarato descarboxilasa o una fosfoenolpiruvato (PEP) carboxicinas.

La invención proporciona de manera adicional la producción de hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA descrita en la presente memoria en condiciones y durante un período de tiempo suficiente como para producir HMDA. En un aspecto descrito, la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato cinasa; una 6-AHOP oxidoreductasa; y una 6-aminocaproico semialdehído oxidoreductasa (de aminación) o una ácido 6-aminocaproico semialdehído aminotransferasa. En otro aspecto descrito, la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato cinasa; una 6-AHOP aciltransferasa; una 6-aminocaproil-CoA oxidoreductasa; y una semialdehído 6-aminocaproico oxidoreductasa (de aminación) o una ácido 6-aminocaproico semialdehído aminotransferasa. En incluso otro aspecto descrito, la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato CoA transferasa o una 6-aminocaproato CoA ligasa; una 6-aminocaproil-CoA oxidoreductasa; y una semialdehído 6-aminocaproico oxidoreductasa (de aminación) o una ácido 6-aminocaproico semialdehído aminotransferasa. En incluso otro aspecto descrito adicional, la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato N-acetiltransferasa; una 6-acetamidohexanoato cinasa; una 6-AAHOP oxidoreductasa; una 6-acetamidohexanal aminotransferasa o una 6-acetamidohexanal oxidoreductasa (de aminación); y una 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa o una 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida). En incluso otro aspecto descrito adicional, la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato N-acetiltransferasa; una 6-acetamidohexanoato CoA transferasa o una 6-acetamidohexanoato CoA ligasa; una 6-acetamidohexanoil-CoA oxidoreductasa; una 6-acetamidohexanal aminotransferasa o una 6-acetamidohexanal oxidoreductasa (de aminación); y una 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa o una 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida). En incluso otro aspecto descrito adicional, la vía de HMDA incluye una 6-

aminocaproato N-acetiltransferasa; una 6-acetamidohexanoato cinasa; una 6-AAHOP oxidorreductasa; una 6-acetamidohexanal aminotransferasa o una 6-acetamidohexanal oxidorreductasa (de aminación); y una 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa o una 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida).

Asimismo, un método para producir adipato puede implicar el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de adipato, donde la vía incluya al menos un ácido nucleico exógeno que codifique una enzima de la vía de adipato expresada en una cantidad suficiente como para producir adipato, en condiciones y durante un período de tiempo suficiente como para producir adipato, donde la vía de adipato incluya alfa-ceto adipil-CoA sintetasa, fosfotransceto adipilasa/alfa-ceto adipato cinasa o alfa-ceto adipil-CoA:acetil-CoA transferasa; 2-hidroxi adipil-CoA deshidrogenasa; 2-hidroxi adipil-CoA deshidratasa; 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa; y adipil-CoA sintetasa, fosfotransadipilasa/adipato cinasa, adipil-CoA:acetil-CoA transferasa o adipil-CoA hidrolasa. Además, un método para producir adipato puede implicar el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de adipato, donde la vía incluya al menos un ácido nucleico exógeno que codifique una enzima de la vía de adipato expresada en una cantidad suficiente como para producir adipato, en condiciones y durante un período de tiempo suficiente como para producir adipato, donde la vía de adipato incluya 2-hidroxi adipato deshidrogenasa; 2-hidroxi adipil-CoA sintetasa, fosfotranshidroxi adipilasa/2-hidroxi adipato cinasa o 2-hidroxi adipil-CoA:acetil-CoA transferasa; 2-hidroxi adipil-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 la presente memoria, también se describe un método para producir ácido 6-aminocaproico mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido 6-aminocaproico expresada en una cantidad suficiente como para producir ácido 6-aminocaproico, donde la vía de ácido 6-aminocaproico incluye 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA tiolasa; 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA reductasa; 3-hidroxi-6-aminohexanoil-CoA deshidratasa; 6-aminohex-2-enoil-CoA reductasa; y 6-aminocaproil-CoA/acil-CoA transferasa, 6-aminocaproil-CoA sintasa o 6-aminocaproil-CoA hidrolasa (véanse los Ejemplos XII y XIII; etapas A/B/C/D/K/L/M de la Figura 11). En la presente memoria, también se describe un método para producir ácido 6-aminocaproico mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de ácido 6-aminocaproico expresada en una cantidad suficiente como para producir ácido 6-aminocaproico, donde la vía de ácido 6-aminocaproico incluye 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA tiolasa; 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA/acil-CoA transferasa, 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA sintasa, o 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA hidrolasa; 3-oxo-6-aminohexanoato reductasa; 3-hidroxi-6-aminohexanoato deshidratasa; y 6-aminohex-2-enoato reductasa (véanse los Ejemplos XII y XIV; etapas A/E/F/G/H/I/J de la Figura 11).

En la presente memoria, también se describe un método para producir caprolactama mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de caprolactama que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de caprolactama expresada en una cantidad suficiente como para producir caprolactama, donde la vía de caprolactama incluye 6-aminocaproil-CoA/acil-CoA transferasa o 6-aminocaproil-CoA sintasa (véanse los Ejemplos XII y XV; etapas K/L de la Figura 11). En un método de ese tipo, la caprolactama puede producirse mediante la ciclación espontánea de 6-aminocaproil-CoA a caprolactama (véase el Ejemplo XII; etapa Q de la Figura 11). La invención también proporciona un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de hexametilendiamina expresada en una cantidad suficiente como para producir hexametilendiamina, donde la vía de hexametilendiamina incluye 6-aminocaproil-CoA/acil-CoA transferasa o 6-aminocaproil-CoA sintasa; 6-aminocaproil-CoA reductasa (formadora de aldehído); y hexametilendiamina transaminasa o hexametilendiamina deshidrogenasa (véanse los Ejemplos XII y XVI; etapas K/L/N/O/P de la Figura 11).

En la presente memoria, también se describe un método para producir caprolactama mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de caprolactama que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de caprolactama expresada en una cantidad suficiente como para producir caprolactama, donde la vía de caprolactama incluye 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA tiolasa; 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA reductasa; 3-hidroxi-6-aminohexanoil-CoA deshidratasa; y 6-aminohex-2-enoil-CoA reductasa (véanse los Ejemplos XII y XVII; etapas A/B/C/D de la Figura 11). En un método de ese tipo, la caprolactama puede producirse mediante la ciclación espontánea de 6-aminocaproil-CoA a caprolactama (véase el Ejemplo XII; etapa Q de la Figura 11). También se proporciona un método para producir hexametilendiamina mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de hexametilendiamina expresada en una cantidad suficiente como para producir hexametilendiamina, donde la vía de hexametilendiamina incluye 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA tiolasa; 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA reductasa; 3-hidroxi-6-aminohexanoil-CoA deshidratasa; 6-aminohex-2-enoil-CoA reductasa; 6-aminocaproil-CoA reductasa (formadora de aldehído); y hexametilendiamina transaminasa o hexametilendiamina deshidrogenasa (véanse los Ejemplos XII y XVIII; etapas A/B/C/D/N/O/P de la Figura 11).

En la presente memoria, también se describe un método para producir ácido 6-aminocaproico (6-ACA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de 6-ACA, donde el organismo microbiano incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una semialdehído succínico deshidrogenasa, una alfa-cetoglutarato descarboxilasa, una fosfoenolpiruvato (PEP) carboxicinas, una 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-

dioato (HODH) aldolasa, una 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) hidratasa, una 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) reductasa, una 2-oxoheptano-1,7-dioato (2-OHD) descarboxilasa, una adipato semialdehído aminotransferasa, una adipato semialdehído oxidorreductasa (de aminación), una 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) descarboxilasa, una 6-oxohex-4-enoato (6-OHE) reductasa, una 2-oxoheptano-1,7-dioato (2-OHD) aminotransferasa, una 2-oxoheptano-1,7-dioato (2-OHD) oxidorreductasa (de aminación), una 2-aminoheptano-1,7-dioato (2-AHD) descarboxilasa, una 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) aminotransferasa, una 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) oxidorreductasa (de aminación), una 2-aminohept-4-eno-1,7-dioato (2-AHE) reductasa, una 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato (HODH) formiato-liasa, una 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato (HODH) deshidrogenasa, una 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, una 2,3-deshidroadipil-CoA reductasa, una adipil-CoA deshidrogenasa, una 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) formiato-liasa, una 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) deshidrogenasa, una 2-oxoheptano-1,7-dioato (2-OHD) formiato-liasa, una 2-oxoheptano-1,7-dioato (2-OHD) deshidrogenasa, o una enzima de activación de piruvato formiato-liasa (véanse los Ejemplos XIX y XXI; etapas A-Q de la Figura 12).

En la presente memoria, también se describe un método para producir ácido 6-aminocaproico (6-ACA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de 6-ACA, donde el organismo microbiano incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA. En un aspecto, la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED reductasa; una 2-OHD descarboxilasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidorreductasa (de aminación) (véanse los Ejemplos XIX y XXI; etapas A/B/C/D/E de la Figura 12). En otro aspecto descrito, la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED descarboxilasa; una 6-OHE reductasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidorreductasa (de aminación) (véanse los Ejemplos XIX y XXI; etapas A/B/F/G/E de la Figura 12). En otro aspecto descrito, la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED aminotransferasa o una OHED oxidorreductasa (de aminación); una 2-AHE reductasa; y una 2-AHD descarboxilasa (véanse los Ejemplos XIX y XXI; etapas A/B/J/D/I de la Figura 12). En otro aspecto descrito, la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED reductasa; una 2-OHD aminotransferasa o una 2-OHD oxidorreductasa (de aminación); y una 2-AHD descarboxilasa (véanse los Ejemplos XIX y XXI; etapas A/B/C/H/I de la Figura 12). En otro aspecto descrito, la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una OHED formiato-liasa y una enzima de activación de piruvato formiato-liasa o una HODH deshidrogenasa; una 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa; una 2,3-deshidroadipil-CoA reductasa; una adipil-CoA deshidrogenasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidorreductasa (de aminación) (véanse los Ejemplos XIX y XXI; etapas A/L/M/N/O/E de la Figura 12). La vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED formiato-liasa y una enzima de activación de piruvato formiato-liasa u OHED deshidrogenasa; una 2,3-deshidroadipil-CoA reductasa; una adipil-CoA deshidrogenasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidorreductasa (de aminación) (véanse los Ejemplos XIX y XXI; etapas A/B/P/N/O/E de la Figura 12). En otro aspecto descrito, la vía de 6-ACA incluye una HODH aldolasa; una OHED hidratasa; una OHED reductasa; una 2-OHD formiato-liasa y una enzima de activación de piruvato formiato-liasa o una 2-OHD deshidrogenasa; una adipil-CoA deshidrogenasa; y una adipato semialdehído aminotransferasa o una adipato semialdehído oxidorreductasa (de aminación) (véanse los Ejemplos XIX y XXI; etapas A/B/C/Q/O/E de la Figura 12). En un aspecto adicional, las vías de 6-ACA descritas anteriormente pueden incluir una semialdehído succínico deshidrogenasa, una alfa-cetoglutarato descarboxilasa o una fosfoenolpiruvato (PEP) carboxinasa.

En la presente memoria, también se describe un método para producir ácido 6-aminocaproico (6-ACA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de 6-ACA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una glutamil-CoA transferasa, una glutamil-CoA ligasa, una beta-cetotilasa, una 3-oxo-6-aminopimeloil-CoA oxidorreductasa, una 3-hidroxi-6-aminopimeloil-CoA deshidratasa, una 6-amino-7-carboxihept-2-enoil-CoA reductasa, una 6-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído) o una 2-aminopimelato descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXV y XXVI; etapas A/B/C/D/E/I/J de la Figura 20). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 6-ACA, donde el conjunto codifica una glutamil-CoA transferasa o glutamil-CoA ligasa; una beta-cetotilasa; una 3-oxo-6-aminopimeloil-CoA oxidorreductasa; una 3-hidroxi-6-aminopimeloil-CoA deshidratasa; una 6-amino-7-carboxihept-2-enoil-CoA reductasa; una 6-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído); y una 2-aminopimelato descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un método para producir ácido 6-aminocaproico (6-ACA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de 6-ACA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa, 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa o una 2-aminopimelato descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXV y XXVI; etapas A/B/J/T/AA de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 6-ACA, donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa; y una 2-aminopimelato

descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un método para producir ácido 6-aminocaproico (6-ACA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de 6-ACA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una homolisina 2-monooxigenasa (véanse los Ejemplos XXV y XXVI; etapa A de la Figura 23). En un aspecto adicional, la vía de 6-ACA incluye la hidrólisis del producto de 6-aminohexanamida por parte de una base o un ácido en dilución para convertir 6-aminohexanamida en 6-aminocaproato (véase el Ejemplo XXV; etapa B de la Figura 23).

En la presente memoria, también se describe un método para producir ácido 6-aminocaproico (6-ACA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de 6-ACA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una adipato reductasa, una adipato cinasa o una adipilfosfato reductasa (véase el Ejemplo XXVIII; etapas X/Y/Z de la Figura 25). En un aspecto adicional, la vía de 6-ACA incluye una adipato reductasa. En otro aspecto adicional, la vía de 6-ACA incluye una adipato cinasa y una adipilfosfato reductasa. En incluso otro aspecto, el organismo microbiano con la vía de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) anterior comprende además una vía de adipato, una vía de caprolactama y/o una vía de hexametilendiamina descrita aquí (véase el Ejemplo XXVIII; etapas A-W de la Figura 25).

En la presente memoria, también se describe un método para producir ácido 6-aminocaproico (6-ACA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico (6-ACA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 6-ACA expresada en una cantidad suficiente como para producir 6-ACA, donde la vía de 6-ACA incluye una 2-amino-7-oxosubarato ceto-ácido descarboxilasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato descarboxilasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa, una 2-aminopimelato descarboxilasa, una 6-aminohexanal oxidorreductasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato descarboxilasa o una 2-amino-7-oxosubarato aminoácido descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXV y XXVI; etapas A/B/D/E/F/G/I de la Figura 26). En un aspecto adicional, el organismo microbiano tiene una vía de 2-amino-7-oxosubarato con al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 2-amino-7-oxosubarato expresada en una cantidad suficiente como para producir 2-amino-7-oxosubarato, donde la vía de 2-amino-7-oxosubarato incluye una 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato aldolasa, una 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato deshidratasa o una 2-amino-5-eno-7-oxosubarato reductasa (véanse los Ejemplos XXV y XXVI; etapas A/B/C de la Figura 27).

En la presente memoria, también se describe un método para producir ácido 6-aminocaproico (6-ACA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de ácido 6-aminocaproico (6-ACA), donde la vía incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 6-ACA, donde el conjunto codifica una 2-amino-7-oxosubarato ceto-ácido descarboxilasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa; y una 2-aminopimelato descarboxilasa (véase el Ejemplo XXV; etapas A/D/E de la Figura 26). En incluso otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 6-ACA, donde el conjunto codifica una 2-amino-7-oxosubarato ceto-ácido descarboxilasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato descarboxilasa; y una 6-aminohexanal oxidorreductasa (véase el Ejemplo XXV; etapas A/B/F de la Figura 26). En incluso otro aspecto descrito adicional, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 6-ACA, donde el conjunto codifica una 2-amino-7-oxosubarato aminoácido descarboxilasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato descarboxilasa; y una 6-aminohexanal oxidorreductasa (véase el Ejemplo XXV; etapas I/G/F de la Figura 26). En un aspecto adicional de cada uno de los aspectos anteriores, el organismo microbiano tiene una vía de 2-amino-7-oxosubarato con un segundo conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 2-amino-7-oxosubarato expresadas en una cantidad suficiente como para producir 2-amino-7-oxosubarato, donde la vía de 2-amino-7-oxosubarato incluye una 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato aldolasa, una 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato deshidratasa; y una 2-amino-5-eno-7-oxosubarato reductasa (véanse los Ejemplos XXV y XXVI; etapas A/B/C de la Figura 27).

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA, donde el organismo microbiano incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato cinasa, una [(6-aminohexanoil)oxil]fosfonato (6-AHOP) oxidorreductasa, una semialdehído 6-aminocaproico aminotransferasa, una semialdehído 6-aminocaproico oxidorreductasa (de aminación), una 6-aminocaproato N-acetiltransferasa, una 6-acetamidohexanoato cinasa, una [(6-acetamidohexanoil)oxil]fosfonato (6-AAHOP) oxidorreductasa, una 6-acetamidohexanal aminotransferasa, una 6-acetamidohexanal oxidorreductasa (de aminación), una 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa, una 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida), una 6-acetamidohexanoato CoA transferasa, una 6-acetamidohexanoato CoA ligasa, una 6-acetamidohexanoil-CoA oxidorreductasa, una [(6-acetamidohexanoil)oxil]fosfonato (6-AAHOP) aciltransferasa, una [(6-aminohexanoil)oxil]fosfonato (6-AHOP) aciltransferasa, una 6-aminocaproato CoA transferasa y una 6-aminocaproato CoA ligasa (véanse los Ejemplos XX y XXI; etapas A-N de la Figura 13).

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA, donde el organismo microbiano incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA. En un aspecto, la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato cinasa; una 6-AHOP oxidorreductasa; y una 6-aminocaproico semialdehído oxidorreductasa (de aminación) o una ácido 6-aminocaproico semialdehído aminotransferasa (véanse los Ejemplos XX y XXI; etapas A/B/C de la Figura 13). En otro aspecto descrito, la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato cinasa; una 6-AHOP aciltransferasa; una 6-aminocaproil-CoA oxidorreductasa; y una semialdehído 6-aminocaproico oxidorreductasa (de aminación) o una ácido 6-aminocaproico semialdehído aminotransferasa (véanse los Ejemplos XX y XXI; etapas A/L/N/C de la Figura 13). En otro aspecto descrito, la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato CoA transferasa o una 6-aminocaproato CoA ligasa; una 6-aminocaproil-CoA oxidorreductasa; y una semialdehído 6-aminocaproico oxidorreductasa (de aminación) o una ácido 6-aminocaproico semialdehído aminotransferasa (véanse los Ejemplos XX y XXI; etapas M/N/C de la Figura 13). En otro aspecto descrito, la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato N-acetiltransferasa; una 6-acetamidohexanoato cinasa; una 6-AAHOP oxidorreductasa; una 6-acetamidohexanal aminotransferasa o una 6-acetiltransferasa; una 6-acetamidohexanal oxidorreductasa (de aminación); y una 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa o una 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida) (véanse los Ejemplos XX y XXI; etapas D/E/F/G/H de la Figura 13). En otro aspecto descrito, la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato N-acetiltransferasa; una 6-acetamidohexanoato CoA transferasa o una 6-acetamidohexanoato CoA ligasa; una 6-acetamidohexanoil-CoA oxidorreductasa; una 6-acetamidohexanal aminotransferasa o una 6-acetamidohexanal oxidorreductasa (de aminación); y una 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa o una 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida) (véanse los Ejemplos XX y XXI; etapas D/I/J/G/H de la Figura 13). En otro aspecto descrito, la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato N-acetiltransferasa; una 6-acetamidohexanoato cinasa; una 6-AAHOP oxidorreductasa; una 6-acetamidohexanal aminotransferasa o una 6-acetiltransferasa; una 6-acetamidohexanal oxidorreductasa (de aminación); y una 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa o una 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida) (véanse los Ejemplos XX y XXI; etapas D/E/K/J/G de la Figura 13).

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutamil-CoA transferasa, una glutamil-CoA ligasa, una beta-cetotilasa, una 3-oxo-6-aminopimeloil-CoA oxidorreductasa, una 3-hidroxi-6-aminopimeloil-CoA deshidratasa, una 6-amino-7-carboxihept-2-enoil-CoA reductasa, una 6-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 2-amino-7-oxoheptanoato aminotransferasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación, o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A-H de la Figura 20). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutamil-CoA transferasa o ligasa; una beta-cetotilasa; una 3-oxo-6-aminopimeloil-CoA oxidorreductasa; una 3-hidroxi-6-aminopimeloil-CoA deshidratasa; una 6-amino-7-carboxihept-2-enoil-CoA reductasa; una 6-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído); una 2-amino-7-oxoheptanoato aminotransferasa u oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato reductasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal aminotransferasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de aminación, una 3-oxo-7-aminoheptanoato 3-aminotransferasa, una 3-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de 3-aminación, una 3-oxopimelato cinasa, una 5-oxopimeloilfosfonato reductasa, una 3-oxopimelato CoA transferasa, una 3-oxopimelato ligasa, una 5-oxopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 3-oxopimelato aminotransferasa, una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato CoA transferasa, una 3-aminopimelato ligasa, una 5-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 3-aminopimelato cinasa, una 5-aminopimeloilfosfonato reductasa, una 3-aminopimelato reductasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato 2,3-aminomutasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa, una homolisina descarboxilasa, una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa, una 2-aminopimelato cinasa, una 2-aminopimelato CoA transferasa, una 2-aminopimelato CoA ligasa, una 2-aminopimelato reductasa, una 6-aminopimeloilfosfonato reductasa, una 6-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; Figura 21).

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato reductasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal 7-aminotransferasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 7-aminación, una 3-oxo-7-aminoheptanoato 3-aminotransferasa, una 3-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de 3-aminación, una 3,7-

di aminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/C/D/E/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato reductasa; una 3-oxo-1-carboxiheptanal 7-aminotransferasa o una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 7-aminación; una 3-oxo-7-aminoheptanoato 3-aminotransferasa o una 3-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de 3-aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato cinasa, una 5-oxopimeloilfosfonato reductasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal 7-aminotransferasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 7-aminación, una 3-oxo-7-aminoheptanoato 3-aminotransferasa, una 3-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de 3-aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/F/G/D/E/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato cinasa; una 5-oxopimeloilfosfonato reductasa; una 3-oxo-1-carboxiheptanal 7-aminotransferasa o una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 7-aminación; una 3-oxo-7-aminoheptanoato 3-aminotransferasa o una 3-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de 3-aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato CoA transferasa, una 3-oxopimelato CoA ligasa, una 5-oxopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 3-oxo-1-carboxiheptanal 7-aminotransferasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 7-aminación, una 3-oxo-7-aminoheptanoato 3-aminotransferasa, una 3-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de 3-aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/H/I/E/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato CoA transferasa o 3-oxopimelato CoA ligasa; una 5-oxopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído); una 3-oxo-1-carboxiheptanal 7-aminotransferasa o 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 7-aminación; una 3-oxo-7-aminoheptanoato 3-aminotransferasa o una 3-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de 3-aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato reductasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal 3-aminotransferasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 3-aminación, una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de 7-aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/C/AB/Z/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato reductasa; una 3-oxo-1-carboxiheptanal 3-aminotransferasa o una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 3-aminación; una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de 7-aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato cinasa, una 5-oxopimeloilfosfonato reductasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal 3-aminotransferasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 3-aminación, una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de 7-aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/H/I/AB/Z/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo

microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato cinasa; una 5-oxopimeloilfosfonato reductasa; una 3-oxo-1-carboxiheptanal 3-aminotransferasa o una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 3-aminación; una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de 7-aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato CoA transferasa o una 3-oxopimelato CoA ligasa, una 5-oxopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 3-oxo-1-carboxiheptanal 3-aminotransferasa, una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 3-aminación, una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de 7-aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/F/G/AB/Z/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato CoA transferasa o una 3-oxopimelato CoA ligasa; una 5-oxopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído); una 3-oxo-1-carboxiheptanal 3-aminotransferasa o una 3-oxo-1-carboxiheptanal oxidorreductasa de 3-aminación; una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de 7-aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato reductasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato 2,3-aminomutasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/J/O/P/Q/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato reductasa; una 3-amino-7-oxoheptanoato 2,3-aminomutasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato cinasa, una 5-aminopimeloilfosfonato reductasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato 2,3-aminomutasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/J/M/N/P/Q/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato cinasa; una 5-aminopimeloilfosfonato reductasa; una 3-amino-7-oxoheptanoato 2,3-aminomutasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa, una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato CoA transferasa, una 3-aminopimelato CoA ligasa, una 5-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 3-amino-7-oxoheptanoato 2,3-aminomutasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/J/K/L/P/Q/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato

aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato CoA transferasa o una 3-aminopimelato CoA ligasa; una 5-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído); una 3-amino-7-oxoheptanoato 2,3-aminomutasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa.

5 En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa, 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato reductasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de 7-aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/J/O/Z/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato reductasa; una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de 7-aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

20 En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa, una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato CoA transferasa, una 3-aminopimelato CoA ligasa, una 5-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/J/K/L/Z/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato CoA transferasa o una 3-aminopimelato CoA ligasa; una 5-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído); una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

35 En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa, una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato cinasa, una 5-aminopimeloilfosfonato reductasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación, una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/J/M/N/Z/R/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato cinasa, una 5-aminopimeloilfosfonato reductasa; una 3-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 3-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; una 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa; y una homolisina descarboxilasa.

50 En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa, 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa, una 2-aminopimelato reductasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/J/T/W/Q/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa; una 2-aminopimelato reductasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa, una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa, una 2-aminopimelato cinasa, una 6-aminopimeloilfosfonato reductasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/J/T/U/X/Q/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa; una 2-aminopimelato cinasa; una 6-aminopimeloilfosfonato reductasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de HMDA que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una glutaril-CoA beta-cetotilasa, una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa, una 3-oxopimeloil-CoA ligasa, una 3-oxopimelato aminotransferasa, una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación, una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa, una 2-aminopimelato CoA transferasa, 2-aminopimelato CoA ligasa, una 6-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído), una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa, 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/J/T/V/Y/Q/S de la Figura 21). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una glutaril-CoA beta-cetotilasa; una 3-oxopimeloil-CoA hidrolasa, una 3-oxopimeloil-CoA transferasa o una 3-oxopimeloil-CoA ligasa; una 3-oxopimelato aminotransferasa o una 3-oxopimelato oxidorreductasa de aminación; una 3-aminopimelato 2,3-aminomutasa; una 2-aminopimelato CoA transferasa o una 2-aminopimelato CoA ligasa; una 6-aminopimeloil-CoA reductasa (formadora de aldehído); una 2-amino-7-oxoheptanoato 7-aminotransferasa o 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato aldolasa, una 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato deshidratasa, una 2-oxo-7-aminohept-3-enoato reductasa, una 2-oxo-7-aminoheptanoato aminotransferasa, una 2-oxo-7-aminoheptanoato aminotransferasa oxidorreductasa de aminación, una homolisina descarboxilasa, una 2-oxo-7-aminoheptanoato descarboxilasa, una 6-aminoheptanal aminotransferasa o 6-aminoheptanal oxidorreductasa de aminación (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A-G de la Figura 22). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato aldolasa; una 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato deshidratasa; una 2-oxo-7-aminohept-3-enoato reductasa; una 2-oxo-7-aminoheptanoato aminotransferasa o una 2-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa. En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato aldolasa; una 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato deshidratasa; una 2-oxo-7-aminohept-3-enoato reductasa; una 2-oxo-7-aminoheptanoato aminotransferasa o una 2-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de aminación; y una homolisina descarboxilasa.

La invención proporciona de manera adicional un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una 6-aminocaproato reductasa, una semialdehído 6-aminocaproico aminotransferasa, una semialdehído 6-aminocaproico oxidorreductasa (de aminación) (véase el Ejemplo XXVII; etapas O/C de la Figura 24). En otro aspecto de la invención, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 6-aminocaproato reductasa; y una semialdehído 6-aminocaproico aminotransferasa o una semialdehído 6-aminocaproico oxidorreductasa (de aminación). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica 6-aminocaproato N-acetiltransferasa; 6-acetamidohexanoato reductasa; 6-acetamidohexanal aminotransferasa o 6-acetamidohexanal oxidorreductasa (de aminación); y 6-acetamidohexanamina N-acetiltransferasa o 6-acetamidohexanamina hidrolasa (amida).

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye al

menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de HMDA expresada en una cantidad suficiente como para producir HMDA, donde la vía de HMDA incluye una 2-amino-7-oxosubarato ceto-ácido descarboxilasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato descarboxilasa, una 6-aminohexanal oxidorreductasa de aminación, una 6-aminohexanal aminotransferasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato aminotransferasa, una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación, una 2-oxo-7-aminoheptanoato descarboxilasa, una homolisina descarboxilasa, una 2-amino-7-oxosubarato aminoácido descarboxilasa, una 2-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de aminación, una 2-oxo-7-aminoheptanoato aminotransferasa, una 2-amino-7-oxosubarato oxidorreductasa de aminación, una 2-amino-7-oxosubarato aminotransferasa o una 2,7-diaminosubarato descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; Etapas A/B/C/G/H/I/J/K/L/M de la Figura 26). En un aspecto adicional, el organismo microbiano tiene una vía de 2-amino-7-oxosubarato con al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de 2-amino-7-oxosubarato expresada en una cantidad suficiente como para producir 2-amino-7-oxosubarato, donde la vía de 2-amino-7-oxosubarato incluye una 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato aldolasa, una 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato deshidratasa o una 2-amino-5-eno-7-oxosubarato reductasa (véanse los Ejemplos XXV y XXVI; etapas A/B/C de la Figura 27).

En la presente memoria, también se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina (HMDA) que incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 2-amino-7-oxosubarato oxidorreductasa de aminación o 2-amino-7-oxosubarato aminotransferasa; una 2,7-diaminosubarato descarboxilasa; y una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas K/L/H de la Figura 26). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 2-amino-7-oxosubarato aminoácido descarboxilasa; una 2-oxo-7-aminoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una 2-oxo-7-aminopimelato aminotransferasa; y una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas I/J/H de la Figura 26). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 2-amino-7-oxosubarato aminoácido descarboxilasa; una 2-oxo-7-aminoheptanoato descarboxilasa; y una 6-aminohexanal oxidorreductasa de aminación o una 6-aminohexanal aminotransferasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas I/G/C de la Figura 26). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 2-amino-7-oxosubarato ceto-ácido descarboxilasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato descarboxilasa; y una 6-aminohexanal oxidorreductasa de aminación o una 6-aminohexanal aminotransferasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/B/C de la Figura 26). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de HMDA, en donde el conjunto codifica una 2-amino-7-oxosubarato ceto-ácido descarboxilasa; una 2-amino-7-oxoheptanoato oxidorreductasa de aminación o una 2-amino-7-oxoheptanoato aminotransferasa; y una homolisina descarboxilasa (véanse los Ejemplos XXIV y XXVI; etapas A/M/H de la Figura 26). En un aspecto adicional de cada uno de los aspectos anteriores, el organismo microbiano tiene una vía de 2-amino-7-oxosubarato con un segundo conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de 2-amino-7-oxosubarato expresadas en una cantidad suficiente como para producir 2-amino-7-oxosubarato, donde la vía de 2-amino-7-oxosubarato incluye una 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato aldolasa, una 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato deshidratasa; y una 2-amino-5-eno-7-oxosubarato reductasa (véanse los Ejemplos XXV y XXVI; etapas A/B/C de la Figura 27).

En la presente memoria, se describe un método para producir hexametilendiamina (HMDA) mediante el cultivo de un organismo microbiano de origen no natural que tiene una vía de ácido levulínico (LA) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de LA expresada en una cantidad suficiente como para producir LA, donde la vía de LA incluye una 3-oxoadipil-CoA tiolasa, una 3-oxoadipil-CoA/acil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintasa, una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa o una 3-oxoadipato descarboxilasa (véase el Ejemplo XXIX; etapas A/E/F/G/AA de la Figura 25). En otro aspecto descrito, el organismo microbiano de origen no natural incluye un conjunto de ácidos nucleicos exógenos que codifican enzimas de la vía de LA, en donde el conjunto codifica una 3-oxoadipil-CoA tiolasa; una 3-oxoadipil-CoA/acil-CoA transferasa, una 3-oxoadipil-CoA sintasa o una 3-oxoadipil-CoA hidrolasa; y una 3-oxoadipato descarboxilasa.

En la presente memoria, también se describen métodos de producción organismos microbianos no naturales con un aumento en la producción de adipato, 6-ACA y/o HMDA mediante la alteración de uno o más genes para conferir un aumento en la producción de adipato, 6-ACA y/o HMDA. Esas alteraciones genéticas incluyen aquellas que se ejemplifican en la presente memoria en el Ejemplo XXX y las Tablas 14-16.

En la presente memoria, también se describe un método para producir adipato, 6-ACA y/o HMDA que incluye cultivar un organismo microbiano de origen no natural que incluya una o más alteraciones genéticas que confieran un aumento en la producción de adipato, 6-ACA y/o HMDA. Las alteraciones pueden producirse en genes que codifican una enzima obligatoria para el acoplamiento de la producción de adipato, 6-ACA y/o HMDA al desarrollo del organismo cuando la alteración genética reduce la actividad de la enzima, de forma tal que las alteraciones genéticas confieran al organismo microbiano de origen no natural una producción estable de 6-ACA y/o HMDA acoplada al desarrollo.

En algunas realizaciones, la alteración genética puede incluir una eliminación de un gen en su totalidad. Los

métodos para la alteración genética son muy conocidos por los expertos en la técnica y se describen en la presente memoria (véase el Ejemplo XXX). En algunas realizaciones, otros métodos para alterar un gen incluyen, por ejemplo, un cambio de marco mediante la omisión o incorporación de oligonucleótidos o mediante mutaciones que vuelvan inutilizable al gen. Sin embargo, el experto en la técnica reconocerá las ventajas de las eliminaciones de genes, debido a la estabilidad que pueden conferir al organismo de origen no natural a partir de la reversión a un fenotipo que exprese el gen previamente alterado. En particular, las alteraciones genéticas se seleccionan de entre los conjuntos de genes que se describen en las Tablas 14-16.

Se puede realizar una purificación adecuada y/o ensayos para evaluar la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico mediante el uso de métodos muy conocidos. Se pueden desarrollar replicaciones adecuadas tales como cultivos triplicados para cada cepa modificada genéticamente que se haya de evaluar. Por ejemplo, se puede supervisar la formación de productos y subproductos en el hospedador de producción modificado genéticamente. El producto final y los productos intermedios, y otros compuestos orgánicos, pueden analizarse mediante métodos tales como HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento), GC-MS (cromatografía de gases-espectroscopía de masas) y LC-MS (cromatografía líquida-espectroscopía de masas) u otros métodos analíticos adecuados mediante el uso de procedimientos de rutina muy conocidos en la técnica. La liberación de producto en el caldo de fermentación también puede evaluarse con el sobrenadante del cultivo. Los subproductos y la glucosa residual pueden cuantificarse mediante HPLC mediante el uso, por ejemplo, de un detector del índice de refracción para la glucosa y los alcoholes, y un detector UV para los ácidos orgánicos (Lin et ál., *Biotechnol. Bioeng.* 90:775-779 (2005)), u otros métodos de ensayo y detección adecuados muy conocidos en la técnica. Las actividades enzimáticas individuales de las secuencias de ADN exógeno también pueden someterse a ensayos mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica.

El ácido 6-aminocaproico, la caprolactama, la hexametildiamina o el ácido levulínico pueden separarse de otros componentes en el cultivo mediante el uso de una variedad de métodos muy conocidos en la técnica. Esos métodos de separación incluyen, por ejemplo, procedimientos de extracción así como métodos que incluyen la 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 absorción y ultrafiltración. Todos los métodos anteriores son muy conocidos en la técnica.

Cualquiera de los organismos microbianos de origen no natural que se describen en la presente memoria puede cultivarse para producir y/o secretar los productos biosintéticos de la invención. Por ejemplo, los productores de hexametildiamina pueden cultivarse para la producción biosintética de hexametildiamina.

Para la producción de hexametildiamina, las cepas recombinantes se cultivan en un medio con fuentes de carbono y otros nutrientes esenciales. En ocasiones es conveniente y puede ser altamente conveniente mantener condiciones anaerobias en el fermentador para reducir el costo del proceso a nivel general. Esas condiciones pueden obtenerse, por ejemplo, al rociar en primer lugar el medio con nitrógeno y luego sellar los matraces con un tabique y una tapa con sello. Para las cepas en las que no se observa desarrollo en condiciones anaerobias, se pueden aplicar condiciones microaerobias o sustancialmente anaerobias mediante la perforación de un pequeño orificio en el tabique para una ventilación limitada. Anteriormente se han descrito ejemplos de condiciones anaerobias que son muy conocidos en la técnica. Se describen ejemplos de condiciones aerobias y anaerobias, por ejemplo, en la publicación de EE. UU. 2009/0047719 (n.º de serie 11/891,602), presentada el 10 de agosto de 2007. Se pueden realizar fermentaciones por lotes, por lotes alimentados o de manera continua, como se describe en la presente memoria.

Si se desea, el pH del medio puede mantenerse en un pH deseado, en particular, un pH neutro, tal como un pH de alrededor de 7 mediante la adición de una base, tal como NaOH u otras bases, o ácido, según se necesite para mantener el medio de cultivo en un pH conveniente. La tasa de desarrollo puede determinarse mediante la medición de la densidad óptica mediante el uso de un espectrofotómetro (600 nm) y la tasa de absorción de glucosa mediante la supervisión de la eliminación de fuentes de carbono con el transcurso del tiempo.

El medio de cultivo puede incluir, por ejemplo, cualquier fuente de carbohidrato que pueda suministrar una fuente de carbono al microorganismo de origen no natural. Esas fuentes incluyen, por ejemplo, azúcares tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fructosa, sacarosa y almidón. Otras fuentes de carbohidrato incluyen, por ejemplo, materias primas renovables y biomasa. Los ejemplos de tipos de biomásas que pueden usarse como materias primas en los métodos de la invención incluyen la biomasa celulósica, la biomasa hemicelulósica y las materias primas o partes de materias primas de lignina. Esas materias primas de biomasa contienen, por ejemplo, sustratos de carbohidrato útiles como fuentes de carbono tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fructosa y almidón. Teniendo en cuenta las indicaciones y los lineamientos que se proporcionan en la presente memoria, los expertos en la técnica comprenderán que también se pueden usar materias primas renovables y biomásas que no sean las que se ejemplificaron anteriormente para el cultivo de los organismos microbianos de la invención para la producción de hexametildiamina.

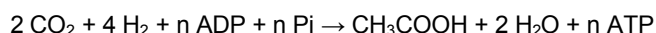
Además de materias primas renovables tales como las que se ejemplificaron anteriormente, los organismos microbianos de hexametildiamina de la invención también pueden modificarse para el desarrollo en sintegas como

su fuente de carbono. En esta realización específica, una o más proteínas o enzimas se expresan en los organismos productores de hexametilendiamina para proporcionar una vía metabólica para la utilización de sintegas u otra fuente de carbono gaseoso.

El gas de síntesis, también conocido como «sintegas» o «gas productor», es el producido principal de la gasificación del carbón y de materiales carbonáceos tales como materiales de biomasa, lo cual incluye cultivos agrícolas y residuos. El sintegas es una mezcla fundamentalmente de H_2 y CO y puede obtenerse a partir de la gasificación de cualquier materia prima orgánica, lo cual incluye, pero no se limita al, carbón, aceite de carbón, gas natural, biomasa y materia orgánica residual. Por lo general, la gasificación se lleva a cabo con una relación alta de combustible con respecto a oxígeno.

Aunque el sintegas incluye en gran medida H_2 y CO , el sintegas también puede incluir CO_2 y otros gases en cantidades más pequeñas. Por lo tanto, el gas de síntesis proporciona una fuente rentable de carbono gaseoso tal como CO y, de manera adicional, CO_2 .

La vía de Wood-Ljungdahl cataliza la conversión de CO y H_2 en acetil-CoA y otros productos tales como acetato. Los organismos capaces de utilizar CO y sintegas también tienen por lo general la capacidad de utilizar mezclas de CO_2 y CO_2/H_2 a través del mismo conjunto básico de enzimas y transformaciones abarcadas por la vía de Wood-Ljungdahl. La conversión dependiente de H_2 del CO_2 en acetato por parte de los microorganismos se reconoció mucho antes de que se revelara que los mismos organismos también podrían usar CO y que estaban involucradas las mismas vías. Se ha demostrado que muchos acetógenos se desarrollan en presencia de CO_2 y producen compuestos tales como acetato, siempre y cuando haya presencia de hidrógeno para suministrar los equivalentes reductores necesarios (véase, por ejemplo, Drake, Acetogenesis, pp. 3-60 Chapman y Hall, Nueva York (1994)). Esto puede resumirse mediante la siguiente ecuación:



Por ende, los microorganismos de origen no natural que poseen la vía de Wood-Ljungdahl también pueden utilizar mezclas de CO_2 y H_2 para la producción de acetil-CoA y otros productos deseados.

La vía de Wood-Ljungdahl es muy conocida en la técnica y consiste en 12 reacciones que pueden separarse en dos ramas: (1) la rama de metilo y (2) la rama de carbonilo. La rama de metilo convierte sintegas en metil-tetrahidrofolato (metilo-THF), mientras que la rama de carbonilo convierte metil-THF en acetil-CoA. Las reacciones en la rama de metilo son catalizadas en orden por las siguientes enzimas: ferredoxina oxidoreductasa, formiato deshidrogenasa, formiltetrahidrofolato sintetasa, metil-tetrahidrofolato ciclodeshidratasa, metil-tetrahidrofolato deshidrogenasa y metil-tetrahidrofolato reductasa. Las reacciones en la rama de carbonilo son catalizadas en orden por las siguientes enzimas o proteínas: proteína de cobalamida corrinóide/hierro-azufre, metiltransferasa, monóxido de carbono deshidrogenasa, acetil-CoA sintasa, acetil-CoA sintasa disulfuro reductasa e hidrogenasa, y también se puede hacer referencia a estas enzimas como proteína de metil-tetrahidrofolato:corrinóide metiltransferasa (por ejemplo, AcsE), proteína de hierro-azufre corrinóide, proteína de ensamblaje de níquel-proteína (por ejemplo, AcsF), ferredoxina, acetil-CoA sintasa, monóxido de carbono deshidrogenasa y proteína de ensamblaje de níquel-proteína (por ejemplo, CooC). Siguiendo las indicaciones y los lineamientos que se proporcionan en la presente memoria para introducir una cantidad suficiente de ácidos nucleicos de codificación como para generar una vía de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico, los expertos en la técnica comprenderán que también se puede realizar el mismo diseño de modificación genética con respecto a la introducción de al menos los ácidos nucleicos que codifiquen las enzimas o proteínas de Wood-Ljungdahl ausentes en el organismo hospedador. Por lo tanto, la introducción de uno o más ácidos nucleicos de codificación en los organismos microbianos de la invención de forma tal que el organismo modificado contenga la vía de Wood-Ljungdahl completa conferirá la capacidad de utilización de sintegas.

De manera adicional, el ciclo de ácido tricarbóxico reductor (de reversión) acoplado a las actividades de la monóxido de carbono deshidrogenasa y/o hidrogenasa también puede usarse para la conversión de CO , CO_2 y/o H_2 en acetil-CoA y otros productos tales como acetato. Los organismos capaces de fijar carbono a través de la vía de TCA de reducción pueden utilizar una o más de las siguientes enzimas: ATP citrato-liasa, citrato liasa, aconitasa, isocitrato deshidrogenasa, alfa-cetoglutarato:ferredoxina oxidoreductasa, succinil-CoA sintetasa, succinil-CoA transferasa, fumarato reductasa, fumarasa, malato deshidrogenasa, NAD(P)H:ferredoxina oxidoreductasa, monóxido de carbono deshidrogenasa e hidrogenasa. Específicamente, los equivalentes reductores extraídos a partir de CO y/o H_2 mediante monóxido de carbono deshidrogenasa e hidrogenasa se utilizan para fijar el CO_2 a través del ciclo de TCA de reducción en acetil-CoA o acetato. Se puede convertir acetato en acetil-CoA mediante enzimas tales como acetil-CoA transferasa, acetato cinasa/fosfotransacetilasa y acetil-CoA sintetasa. Se puede convertir acetil-CoA en precursores de p-tolueno, terfenalato o (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, gliceraldehído-3-fosfato, fosfoenolpiruvato y piruvato, mediante piruvato:ferredoxina oxidoreductasa y las enzimas de gluconeogénesis. Siguiendo las indicaciones y los lineamientos que se proporcionan en la presente memoria para introducir una cantidad suficiente de ácidos nucleicos de codificación como para generar una vía de p-tolueno, tereftalato o (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi)fosfonato, los expertos en la técnica comprenderán que también se puede realizar el mismo diseño de modificación genética con respecto a la introducción de al menos los ácidos nucleicos que codifiquen las enzimas o proteínas de la vía de TCA de reducción ausentes en el organismo hospedador. Por lo

tanto, la introducción de uno o más ácidos nucleicos de codificación en los organismos microbianos de la invención de forma tal que el organismo modificado contenga la vía de TCA de reducción completa conferirá la capacidad de utilización de sintegas.

Teniendo en cuenta las indicaciones y los lineamientos que se proporcionan en la presente memoria, los expertos en la técnica comprenderán que se puede producir un organismo microbiano de origen no natural que secreta los compuestos biosintetizados de la invención cuando se desarrolle en una fuente de carbono tal como un carbohidrato. Esos compuestos incluyen hexametildiamina y cualquiera de los metabolitos intermedios en la hexametildiamina. Todo lo que se necesita es modificar genéticamente una o más de las actividades enzimáticas necesarias para lograr la biosíntesis del compuesto o producto intermedio deseado, lo cual incluye, por ejemplo, la inclusión de parte o la totalidad de las vías biosintéticas de 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico. Por consiguiente, la invención proporciona un organismo microbiano de origen no natural que produce y/o secreta hexametildiamina cuando se desarrolla en un carbohidrato y produce y/o secreta cualquiera de los metabolitos intermedios que se muestran en la vía de 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico cuando se desarrolla en un carbohidrato. Por ejemplo, un organismo microbiano productor de adipato puede iniciar la síntesis a partir de un producto intermedio, por ejemplo, 3-oxoadipil-CoA, 3-hidroxiadipil-CoA, 5-carboxi-2-pentenoil-CoA o adipil-CoA (véase la Figura 2), según se desee. Además, un organismo microbiano productor de adipato puede iniciar la síntesis a partir de un producto intermedio, por ejemplo, 3-oxoadipil-CoA, 3-oxoadipato, 3-hidroxiadipato o hexa-2-enodioato (véase la Figura 3). El organismo microbiano productor de ácido 6-aminocaproico puede iniciar la síntesis a partir de un producto intermedio, por ejemplo, adipato semialdehído (véase la Figura 8). El organismo microbiano productor de caprolactama puede iniciar la síntesis a partir de un producto intermedio, por ejemplo, adipato semialdehído o ácido 6-aminocaproico (véase la Figura 8), según se desee.

Los organismos microbianos de origen no natural de la invención se construyen mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica ejemplificados en la presente memoria para expresar de manera exógena al menos un ácido nucleico que codifique una enzima de la vía de hexametildiamina en cantidades suficientes como para producir ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico. Se comprende que los organismos microbianos de la invención se cultivan en condiciones suficientes como para producir hexametildiamina. Siguiendo las indicaciones y los lineamientos que se proporcionan en la presente memoria, los organismos microbianos de origen no natural de la invención pueden lograr la biosíntesis de hexametildiamina con concentraciones intracelulares de entre aproximadamente 0,1-200 mM o más como resultado. Por lo general, la concentración intracelular de hexametildiamina es de entre aproximadamente 3-150 mM, particularmente entre aproximadamente 5-125 mM y más particularmente entre aproximadamente 8-100 mM, lo cual incluye aproximadamente 10 mM, 20 mM, 50 mM, 80 mM, o más. También se pueden lograr concentraciones intracelulares dentro de y por encima de cada uno de estos ejemplos de intervalos a partir de los organismos microbianos de origen no natural de la invención.

En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo incluyen condiciones de desarrollo o mantenimiento anaerobias o sustancialmente anaerobias. Anteriormente se han descrito ejemplos de condiciones anaerobias que son muy conocidos en la técnica. Ejemplos de condiciones anaerobias para los procesos de fermentación se describen en la presente memoria y, por ejemplo, en la publicación de EE. UU. 2009/0047719, presentada el 10 de agosto de 2007. Cualquiera de estas condiciones puede emplearse con los organismos microbianos de origen no natural así como otras condiciones anaerobias muy conocidas en la técnica. En esas condiciones anaerobias, los productores de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico pueden sintetizar ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico en concentraciones intracelulares de 5-10 mM o más, así como todas las demás concentraciones que se ejemplifican en la presente memoria. Se comprende que, aunque la descripción anterior hace referencia a concentraciones intracelulares, los organismos microbianos productores de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico pueden producir ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico a nivel intracelular y/o secretar el producto en el medio de cultivo.

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

Como se describe en la presente memoria, un ejemplo de condición de desarrollo para lograr la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico incluye las condiciones de cultivo anaerobias o de fermentación. En determinadas realizaciones, los organismos microbianos de origen no natural de la invención pueden mantenerse, cultivarse o fermentarse en condiciones anaerobias o sustancialmente anaerobias. En resumen, las condiciones anaerobias hacen referencia a un entorno desprovisto de oxígeno. Las condiciones sustancialmente anaerobias incluyen, por ejemplo, un cultivo, una fermentación por lotes o una fermentación continua de forma tal que la concentración de oxígeno disuelto en el medio permanezca entre un 0 y 10 % de saturación. Las condiciones sustancialmente anaerobias también incluyen desarrollar o reposar células en medio líquido o en agar sólido dentro de una cámara sellada mantenida con una atmósfera de menos de 1 % de oxígeno. El porcentaje de oxígeno puede mantenerse, por ejemplo, al rociar el cultivo con una mezcla de N₂/CO₂ u otro gas o

gases adecuados que no sean oxígeno.

Las condiciones de cultivo que se describen en la presente memoria pueden aumentarse en escala y desarrollarse de manera continua para la fabricación de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico. Los ejemplos de procedimientos de desarrollo incluyen, por ejemplo, la fermentación por lotes alimentados y la separación por lotes; la fermentación por lotes alimentados y la separación continua, o la fermentación continua y la separación continua. Todos estos procesos son muy conocidos en la técnica. Los procedimientos de fermentación son particularmente útiles para la producción biosintética de cantidades comerciales de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico. Por lo general, y al igual que sucede con procedimientos de cultivo no continuos, la producción continua y/o casi continua de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico incluirá el cultivo de un organismo productor de hexametildiamina de origen no natural de la invención en nutrientes y medio suficientes como para mantener y/o mantener aproximadamente el desarrollo en una fase exponencial. El cultivo continuo en esas condiciones puede incluir, por ejemplo, 1 día, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días o más. De manera adicional, el cultivo continuo puede incluir 1 semana, 2, 3, 4 o 5 o más semanas y hasta varios meses. De manera alternativa, los organismos de la invención pueden cultivarse durante horas, si es adecuado para una aplicación particular. Se ha de comprender que las condiciones de cultivo continuas y/o casi continuas también pueden incluir todos los intervalos de tiempo entre estos ejemplos de períodos. Se comprende además que el tiempo de cultivo del organismo microbiano de la invención es durante un período de tiempo suficiente como para producir una cantidad suficiente de producto con un propósito deseado.

Los procedimientos de fermentación son muy conocidos en la técnica. En resumen, la fermentación para la producción biosintética de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico puede utilizarse, por ejemplo, en la fermentación por lotes alimentados y la separación por lotes; la fermentación por lotes alimentados y la separación continua; o la fermentación continua y la separación continua. Los ejemplos de procedimientos de fermentación por lotes y continua son muy conocidos en la técnica.

Además de los procedimientos de fermentación anteriores que usan los productores de hexametildiamina de la invención para la producción continua de cantidades sustanciales de hexametildiamina, los productores de hexametildiamina pueden ser, por ejemplo, sometidos de manera simultánea a procedimientos de síntesis química para convertir el producto en otros compuestos o el producto puede separarse del cultivo de fermentación y someterse en secuencia a la conversión química para convertir el producto en otros compuestos, si se desea. Como se describe en la presente memoria, un producto intermedio en la vía de adipato mediante la utilización de 3-oxoadipato, hexa-2-enodioato, puede convertirse en adipato, por ejemplo, mediante hidrogenación química a través de un catalizador de platino (véase el Ejemplo III).

Como se describe en la presente memoria, los ejemplos de condiciones de desarrollo para lograr la biosíntesis de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico incluyen la adición de un osmoprotector a las condiciones de cultivo. En determinadas realizaciones, los organismos microbianos de origen no natural de la invención pueden mantenerse, cultivarse o fermentarse como se describió anteriormente en presencia de un osmoprotector. En resumen, un osmoprotector hace referencia a un compuesto que actúa como un osmolito y ayuda a un organismo microbiano descrito en la presente memoria a sobrevivir al estrés osmótico. Los osmoprotectores incluyen, pero no se limitan a, betaínas, aminoácidos y el azúcar trehalosa. Los ejemplos no taxativos de estos incluyen glicina betaína, pralina betaína, dimetiltetina, dimetilsulfoniopropionato, 3-dimetilsulfonio-2-metilpropionato, ácido pipécólico, dimetilsulfonioacetato, colina, L-carnitina y ectoína. En un aspecto, el osmoprotector es glicina betaína. Los expertos en la técnica comprenden que la cantidad y el tipo de osmoprotector adecuados para proteger un organismo microbiano descrito en la presente memoria contra el estrés osmótico dependerá del organismo microbiano usado. Por ejemplo, como se describe en el Ejemplo XXII, la *Escherichia coli* en presencia de cantidades variables de ácido 6-aminocaproico se desarrolla de manera adecuada en presencia de glicina betaína 2 mM. La cantidad de osmoprotector en las condiciones de cultivo puede ser, por ejemplo, de no más de aproximadamente 0,1 mM, no más de aproximadamente 0,5 mM, no más de aproximadamente 1,0 mM, no más de aproximadamente 1,5 mM, no más de aproximadamente 2,0 mM, no más de aproximadamente 2,5 mM, no más de aproximadamente 3,0 mM, no más de aproximadamente 5,0 mM, no más de aproximadamente 7,0 mM, no más de aproximadamente 10 mM, no más de aproximadamente 50 mM, no más de aproximadamente 100 mM o no más de aproximadamente 500 mM.

Para generar mejores productores, se puede utilizar el modelado metabólico para optimizar las condiciones de cultivo. También se puede usar el modelado para diseñar inactivaciones génicas que optimicen de manera adicional la utilización de la vía (véase, por ejemplo, las publicaciones de patentes de EE. UU. 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 EE. UU. n.º 7,127,379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos sobre el desarrollo celular del cambio del metabolismo hacia una producción más eficiente de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico.

Un método informático para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorezcan la biosíntesis de un producto deseado es el marco informático OptKnock, Burgard et al., Biotechnol. Bioeng. 84:647-657 (2003). El OptKnock es un programa de modelado y simulación de carácter metabólico que propone estrategias de eliminación

de genes que producen microorganismos con estabilidad genética que sobreproducen el producto objetivo. Específicamente, el marco examina la red metabólica y/o bioquímica completa de un microorganismo con el fin de proponer manipulaciones genéticas que fueren al bioquímico deseado a volverse un subproducto obligatorio del desarrollo celular. Al acoplar la producción bioquímica al desarrollo celular a través de eliminaciones de genes en ubicaciones estratégicas u otras alteraciones genéticas funcionales, las presiones de selección de desarrollo impuestas a las cepas modificadas genéticamente después de largos períodos de tiempo en un biorreactor conducen a mejoras en el rendimiento como resultado de la producción bioquímica acoplada al desarrollo obligatoria. Por último, cuando se construyen eliminaciones de genes, hay una cantidad insignificante de que las cepas diseñadas vuelvan a sus estados de tipo salvaje dado que los genes seleccionados mediante OptKnock han de removerse por completo del genoma. Por lo tanto, esta metodología informática puede usarse para identificar vías alternativas que conduzcan a la biosíntesis de un producto deseado o usarse en conexión con los organismos microbianos de origen no natural para la optimización adicional de la biosíntesis de un producto deseado.

El concepto de producción bioquímica acoplada al desarrollo puede visualizarse en el contexto de las envolturas de producción bioquímica de una red metabólica típica que se calcula mediante el uso de un modelo *in silico*. Estos límites se obtienen mediante la fijación de la o las tasas de absorción del o de los sustratos de limitación en su o sus valores medidos a nivel experimental y el cálculo de las tasas máximas y mínimas de producción bioquímica en cada nivel alcanzable de desarrollo. Si bien existen excepciones, normalmente la producción de un bioquímico deseado se encuentra en competencia directa con la formación de biomasa para obtener recursos intracelulares. Por lo tanto, las tasas mejoradas de producción bioquímica producirán necesariamente tasas de desarrollo menores que el nivel máximo. Las inactivaciones propuestas por OptKnock están diseñadas para restringir los límites de solución permitibles, forzando un cambio en el comportamiento metabólico de la cepa de tipo salvaje. Si bien los límites de solución efectivos para una cepa determinada se expandirán o contraerán en la medida en que la o las tasas de absorción aumenten o disminuyan, cada punto experimental debería encontrarse dentro de su límite de solución calculado. Las gráficas como estas ayudan a visualizar qué tan cerca se encuentran las cepas de sus límites de rendimiento o, en otras palabras, qué tanto lugar hay para mejoras. El marco de OptKnock ya ha sido capaz de identificar estrategias de eliminación de genes auspiciosas para la sobreproducción bioquímica (Burgard et ál., *Biotechnol Bioeng*, 84(6):647-657 (2003); Pharkya et ál., *Biotechnol Bioeng*, 84(7):887-899 (2003)) y establece un marco sistemático que abarcará de manera natural mejoras futuras en los marcos de modelado metabólico y regulador.

En resumen, «OptKnock» es un término que se usa en la presente memoria para hacer referencia a un método y sistema informático para modelar el metabolismo celular. El programa OptKnock hace referencia a un marco de modelos y métodos que incorporan limitaciones particulares en modelos de análisis de equilibrio de flujo (FBA, por sus siglas en inglés). Estas limitaciones incluyen, por ejemplo, información de cinética cualitativa, información de regulación cualitativa y/o datos experimentales de micromatrices de ADN. El OptKnock también computa soluciones para diversos problemas metabólicos, por ejemplo, mediante el estrechamiento de los límites de flujo obtenidos a través de modelos de equilibrio de flujo y el posterior sondeo de los límites de rendimiento de las redes metabólicas en presencia de adiciones o eliminaciones de genes. El marco informático de OptKnock permite la construcción de formulaciones de modelos que permiten una consulta eficaz de los límites de rendimiento de las redes metabólicas y proporciona métodos para resolver los problemas de programación lineal entera mixta. El método de modelado y simulación de carácter metabólico al que se hace referencia en la presente memoria como «OptKnock» se describe, por ejemplo, en la publicación de EE. UU. 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 EE. UU. con el n.º de serie 2009/0047719, presentada el 10 de agosto de 2007.

Otro método informático para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorezcan la producción biosintética de un producto es un sistema de modelado y simulación de carácter metabólico que se denomina SimPheny®. Este método y sistema informático se describe, por ejemplo, en la publicación de EE. UU. 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 informático 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 contenga todas y cada una de las posibles funcionalidades de las reacciones químicas en el sistema, mediante lo cual se determina una variedad de actividades permitidas para el sistema biológico. Se hace referencia a esta estrategia como «modelado basado en limitaciones» dado que el espacio de solución se define mediante limitaciones tales como la estequiometría conocida de las reacciones incluidas así como las limitaciones de capacidad y termodinámica de reacción asociadas a los flujos máximos a través de las reacciones. El espacio definido por estas limitaciones puede interrogarse para determinar las capacidades fenotípicas y el comportamiento del sistema biológico o de sus componentes bioquímicos. Los métodos de análisis tales como el análisis convexo, la programación lineal y el cálculo de vías de extremos descritos, por ejemplo, en Schilling et ál., *J. Theor. Biol.* 203:229-248 (2000); Schilling et ál., *Biotech. Bioeng.* 71:286-306 (2000) y Schilling et ál., *Biotech. Prog.* 15:288-295 (1999), pueden usarse para determinar esas capacidades fenotípicas.

Como se describió anteriormente, un método basado en limitaciones usado en los programas informáticos aplicables a la invención es el análisis de equilibrio de flujo. El análisis de equilibrio de flujo se basa en el equilibrio de flujo en una condición estable y puede realizarse como se describe, por ejemplo, en Varma y Palsson, *Biotech. Bioeng.* 12:994-998 (1994). Se han aplicado estrategias de equilibrio de flujo a redes de reacción para simular o predecir

propiedades sistémicas de, por ejemplo, el metabolismo de los adipocitos como se describe en Fell y Small, J. Biochem. 138:781-786 (1986), la secreción de acetato a partir de *E. coli* en condiciones de maximización de ATP como se describe en Majewski y Domach, Biotech. Bioeng. 35:732-738 (1990) o la secreción de etanol por parte de levaduras como se describe en Vanrolleghem et ál., Biotech. Prog. 12:434-448 (1996). De manera adicional, esta estrategia puede usarse para predecir o simular el desarrollo de *S. cerevisiae* en una variedad de fuentes de carbono simple así como el metabolismo de la *H. influenzae* como se describe en Edwards y Palsson, Proc. Natl. Acad. Sci. 97:5528-5533 (2000), Edwards y Palsson, J. Bio. Chem. 274:17410-17416 (1999) y Edwards et ál., Nature Biotech. 19:125-130 (2001).

Una vez que se ha definido el espacio de solución, se puede analizar para determinar posibles soluciones en diversas condiciones. Esta estrategia informática es coherente con las realidades biológicas dado que los sistemas biológicos son flexibles y pueden lograr el mismo resultado de muchas maneras diferentes. Los sistemas biológicos se diseñan a través de mecanismos de evolución que se han visto restringidos por limitaciones fundamentales que todos los sistemas vivos deben enfrentar. Por lo tanto, la estrategia de modelado basada en limitaciones se condice con estas realidades generales. Además, la capacidad de imponer continuamente restricciones adicionales a un modelo de red a través del estrechamiento de las limitaciones produce una reducción en el tamaño del espacio de solución, mediante lo cual se mejora la precisión con la que se puede predecir el fenotipo o rendimiento fisiológico.

Estas estrategias informáticas son coherentes con las realidades biológicas dado que los sistemas biológicos son flexibles y pueden lograr el mismo resultado de muchas maneras diferentes. Los sistemas biológicos se diseñan a través de mecanismos de evolución que se han visto restringidos por limitaciones fundamentales que todos los sistemas vivos deben enfrentar. Por lo tanto, la estrategia de modelado basada en limitaciones se condice con estas realidades generales. Además, la capacidad de imponer continuamente restricciones adicionales a un modelo de red a través del estrechamiento de las limitaciones produce una reducción en el tamaño del espacio de solución, mediante lo cual se mejora la precisión con la que se puede predecir el fenotipo o rendimiento fisiológico.

Teniendo en cuenta las indicaciones y los lineamientos que se proporcionan en la presente memoria, los expertos en la técnica serán capaces de aplicar diversos marcos informáticos para el modelado y la simulación de carácter metabólico para diseñar e implementar la biosíntesis de un compuesto deseado en organismos microbianos hospedadores. Esos métodos de modelado y simulación de carácter metabólico incluyen, por ejemplo, los sistemas informáticos ejemplificados anteriormente tales como SimPheny® y OptKnock. Para ilustrar la invención, algunos métodos se describen en la presente memoria con respecto al marco informático OptKnock para el modelado y la simulación. Los expertos en la técnica sabrán cómo aplicar la identificación, el diseño y la implementación de las alteraciones metabólicas mediante el uso de OptKnock a cualquiera de esos otros marcos y métodos informáticos de modelado y simulación de carácter metabólico muy conocidos en la técnica.

La capacidad de una célula o un organismo de acoplar obligatoriamente el desarrollo a la producción de un bioquímico puede ilustrarse en el contexto de los límites de producción bioquímica de una red metabólica típica que se calcula mediante el uso de un modelo *in silico*. Estos límites se obtienen mediante la fijación de la o las tasas de absorción del o de los sustratos de limitación en su o sus valores medidos a nivel experimental y el cálculo de las tasas máximas y mínimas de producción bioquímica en cada nivel alcanzable de desarrollo. Por lo general, la producción de un bioquímico deseado se encuentra en competencia directa con la formación de biomasa para obtener recursos intracelulares. En estas circunstancias, las tasas mejoradas de producción bioquímica producirán necesariamente tasas de desarrollo menores que el nivel máximo. Las inactivaciones propuestas por los programas de modelado y simulación de carácter metabólico mencionados anteriormente están diseñadas para restringir los límites de solución permitibles, forzando un cambio en el comportamiento metabólico de la cepa de tipo salvaje. Si bien los límites de solución efectivos para una cepa determinada se expandirán o contraerán en la medida en que la o las tasas de absorción aumenten o disminuyan, cada punto experimental se encontrará dentro de su límite de solución calculado. Las gráficas como estas permiten predicciones precisas de qué tan cerca se encuentran las cepas diseñadas de sus límites de rendimiento, lo cual indica también qué tanto lugar hay para mejoras.

El marco matemático OptKnock se ejemplifica en la presente memoria para identificar eliminación de genes que conducen a la producción bioquímica acoplada al desarrollo (véase el Ejemplo XXX). El procedimiento se construye sobre la base del modelo metabólico basado en limitaciones que estrecha el rango de fenotipos posibles que un sistema celular puede presentar a través de la imposición sucesiva de limitaciones físicas-químicas en rigor, Price et ál., Nat Rev Microbiol, 2: 886-97 (2004). Como se describió anteriormente, los modelos y las simulaciones con base en las limitaciones se conocen muy bien en la técnica y por lo general invocan la optimización de un objetivo celular particular, sujeto a la estequiometría de la red, para proponer una distribución de flujo probable.

En resumen, la maximización de un objetivo celular cuantificado como un flujo de reacción acumulado para una red metabólica en estado estable que comprende un conjunto $N = \{1, \dots, N\}$ de metabolitos y un conjunto $M = \{1, \dots, M\}$ de reacciones metabólicas se expresa matemáticamente de la siguiente manera:

maximizar $V_{\text{objetivo celular}}$

con sujeción a

$\forall i \in N$

$$\sum_{j=1}^M S_{ij} v_j = 0,$$

$$v_{sustrato} = v_{absorción\_sustrato} \text{ mmol/gDW}\cdot h \quad \forall i \in \{\text{sustrato/s de limitación}\}$$

$$v_{atp} \geq v_{atp\_principal} \text{ mmol/gDW}\cdot h$$

$$v_j \geq 0, \quad \forall j \in \{\text{reacciones irrev.}\}$$

donde S_{ij} es el coeficiente estequiométrico del metabolito i en la reacción j , v_j es el flujo de reacción j , $v_{absorción\_sustrato}$ representa la o las tasas de absorción presupuestas o medidas del o de los sustratos de limitación, y $v_{atp\_principal}$ es el requisito de mantenimiento de ATP no asociado al desarrollo. El vector v incluye flujos internos y externos. En este estudio, a menudo se presupone que el objetivo celular es una fuga de precursores biosintéticos en las relaciones necesarias para la formación de biomasa, Neidhardt, F.C. et ál., 2.^a ed. 1996, Washington, DC: ASM Press. 2 v. (xx, 2822, lxxvi). Por lo general, los flujos se indican por cada 1 gDW·h (gramo de peso seco multiplicado por hora) de forma tal que la formación de biomasa se expresa como g de biomasa producido/gDW·h o 1/h.

El modelado de las eliminaciones de genes y, por lo tanto, la eliminación de reacciones, emplea en primer lugar la incorporación de variables binarias en el marco de estrategia basado en limitaciones, Burgard et ál., Biotechnol Bioeng, 74: 364-375 (2001), Burgard et ál., Biotechnol Prog, 17: 791-797 (2001). Estas variables binarias,

$$y_j = \begin{cases} 1, & \text{si el flujo de reacción } v_j \text{ se encuentra activo} \\ 0, & \text{si el flujo de reacción } v_j \text{ no se encuentra activo} \end{cases}, \quad \forall j \in M$$

asumen un valor de 1 si la reacción j se encuentra activa y un valor de 0 si se encuentra inactiva. La siguiente limitación,

$$v_j^{\min} \cdot y_j \leq v_j \leq v_j^{\max} \cdot y_j, \quad \forall j \in M$$

garantiza que el flujo de reacción v_j se fije en cero solamente si la variable y_j es igual a cero. De manera alternativa, cuando y_j es igual a uno, v_j puede asumir cualquier valor entre un límite $v_j^{\min}$ inferior y un límite $v_j^{\max}$ superior. Aquí,

$v_j^{\min}$ y $v_j^{\max}$ se identifican mediante la minimización y maximización, respectivamente, de cada flujo de reacción sujeto a las limitaciones de red descritas anteriormente, Mahadevan et ál., Metab Eng, 5: 264-76 (2003).

Las inactivaciones génicas/de reacción óptimas se identifican mediante la solución de un problema de optimización de dos niveles que selecciona el conjunto de reacciones activas ($y_j = 1$) de forma tal que una solución de desarrollo óptimo para la red resultante genere una sobreproducción del producto químico de interés. Esquemáticamente, este problema de optimización de dos niveles se ilustra en la Figura 2. Matemáticamente, este problema de optimización de dos niveles se expresa como el siguiente problema de optimización entero mixto de dos niveles:

$$\begin{array}{ll} \text{maximizar} & V_{\text{químico}} \\ & (OptKnock) \\ y_j & \\ \left(\begin{array}{ll} \text{con sujeción a} & \text{maximizar} \\ v_j & v_{\text{biomasa}} \\ \text{con sujeción a} & \sum_{j=1}^M S_{ij} v_j = 0, \quad \forall i \in N \\ & v_{\text{sustrato}} = v_{\text{absorción\_sustrato}} \quad \forall i \in \{\text{sustrato/s limitante/s}\} \\ & v_{\text{atp}} \geq v_{\text{atp\_principal}} \\ & v_{\text{biomasa}} \geq v_{\text{biomasa}}^{\text{target}} \end{array} \right) \end{array}$$

$$v_j^{\min} \cdot y_j \leq v_j \leq v_j^{\max} \cdot y_j, \quad \forall j \in M$$

$$\sum_{j \in M_{\text{directo}}} (1 - y_j) = K$$

$$y_j \in \{0,1\}, \quad \forall j \in M$$

donde $v_{\text{químico}}$ es la producción del producto objetivo deseado, por ejemplo, adipato, 6-ACA y/o HMDA, u otro bioquímico, y K es la cantidad de inactivaciones que se pueden permitir. Nótese que la configuración K igual a cero devuelve la solución de biomasa máxima de la red completa, mientras que la configuración K igual a uno identifica la inactivación génica/de reacción individual ($y_j = 0$) de forma tal que la red resultante implique la sobreproducción máxima dado su rendimiento de biomasa máximo. La limitación final garantiza que la red resultante cumpla con un rendimiento de biomasa mínimo. Burgard et ál., *Biotechnol Bioeng*, 84: 647-57 (2003) proporciona una descripción más detallada de la formulación del modelo y el procedimiento de solución. Se pueden solucionar problemas que contengan cientos de variables binarias en el orden de los minutos a las horas mediante el uso de CPLEX 8.0, *GAMS: The Solver Manuals*. 2003: GAMS Development Corporation, al que se accede a través de GAMS, Brooke et ál., GAMS Development Corporation (1998), entorno de modelado en una estación de trabajo IBM RS6000-270. El marco OptKnock ya ha sido capaz de identificar estrategias de eliminación de genes auspiciosas para la sobreproducción bioquímica, Burgard et ál., *Biotechnol Bioeng*, 84: 647-57 (2003), Pharkya et ál., *Biotechnol Bioeng*, 84: 887-899 (2003), y establece una red sistemática que abarcará naturalmente futuras mejoras en los marcos de modelado metabólico y de regulación.

Los métodos descritos anteriormente proporcionarán un conjunto de reacciones metabólicas a alterar. La eliminación de cada reacción dentro del conjunto o la modificación metabólica puede producir un producto deseado como un producto obligatorio durante la fase de desarrollo del organismo. Dado que las reacciones son conocidas, una solución al problema de OptKnock de dos niveles también proporcionará el gen o los genes asociados que codifiquen una o más enzimas que catalicen cada reacción dentro del conjunto de reacciones. La identificación de un conjunto de reacciones y sus genes correspondientes que codifiquen las enzimas que participen en cada reacción es por lo general un proceso automatizado, que se alcanza a través de la correlación de las reacciones con una base de datos de reacciones con una relación entre enzimas y genes de codificación.

Una vez que se identifica, el conjunto de reacciones que se han de alterar con el fin de lograr la producción de un producto deseado se implementa en el organismo o la célula objetivo mediante la alteración funcional de al menos un gen que codifique 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 de codificación. Sin embargo, en algunos casos, puede ser beneficioso alterar la reacción mediante otras aberraciones genéticas que incluyen, por ejemplo, la mutación, eliminación de regiones reguladoras tales como promotores o sitios de unión cis para factores de regulación, o mediante el truncamiento de la secuencia de codificación en cualquiera de una cantidad de ubicaciones. Estas últimas aberraciones, que producen una eliminación no total del conjunto de genes, pueden ser útiles, por ejemplo, cuando se deseen evaluaciones rápidas del acoplamiento de un producto o cuando la reversión genética tenga menor probabilidad de producirse.

Para identificar soluciones productivas adicionales para el problema de OptKnock de dos niveles descrito anteriormente que conduzcan a conjuntos adicionales de reacciones para la alteración o modificaciones metabólicas que puedan producir la biosíntesis, incluida la biosíntesis acoplada al desarrollo, de un producto deseado, se puede implementar un método de optimización, denominado «cortes de enteros». Este método tiene lugar mediante la solución iterativa del problema de OptKnock ejemplificado anteriormente con la incorporación de una limitación adicional a la que se hace referencia como «corte de enteros» en cada iteración. Las limitaciones de cortes de enteros impiden de manera eficaz que el procedimiento de solución seleccione exactamente el mismo conjunto de reacciones identificado en cualquier iteración anterior que acople obligatoriamente la biosíntesis del producto al desarrollo. Por ejemplo, si una modificación metabólica acoplada al desarrollo identificada anteriormente especifica las reacciones 1, 2 y 3 para la alteración, la siguiente limitación impide que las mismas reacciones se consideren de manera simultánea en las soluciones posteriores. El método de corte de enteros es muy conocido en la técnica y puede encontrarse descrito, por ejemplo, en Burgard et ál., *Biotechnol. Prog.* 17:791-797 (2001). Al igual que sucede con todos los métodos que se describen en la presente memoria con respecto a su uso en combinación con el marco informático OptKnock para el modelado y la simulación de carácter metabólico, el método de corte de enteros para reducir la redundancia en el análisis informático iterativo también puede aplicarse con otros marcos informáticos muy conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, SimPheny®.

Los métodos que se ejemplifican en la presente memoria permiten la construcción de células y organismos que producen biosintéticamente un producto deseado, incluido el acoplamiento obligatorio de la producción de un bioquímico objetivo al desarrollo de la célula o del organismo modificado genéticamente para albergar las alteraciones genéticas identificadas. Por lo tanto, los métodos informáticos que se describen en la presente memoria permiten la identificación e implementación de modificaciones metabólicas identificadas mediante un método *in silico* seleccionado de entre OptKnock o SimPheny®. El conjunto de modificaciones metabólicas puede incluir, por ejemplo, la adición de una o más enzimas de vías biosintéticas y/o la alteración funcional de una o más reacciones metabólicas que incluyan, por ejemplo, la alteración mediante eliminación de genes.

Como se describió anteriormente, la metodología de OptKnock se desarrolló sobre la premisa de que las redes microbianas mutantes pueden evolucionar hacia sus fenotipos de desarrollo máximo previstos de manera informática cuando se someten a largos periodos de selección de desarrollo. En otras palabras, la estrategia aprovecha la capacidad de un organismo para su autooptimización bajo presiones selectivas. El marco OptKnock permite la enumeración exhaustiva de combinaciones de eliminaciones de genes que fuerzan un acoplamiento entre la producción bioquímica y el desarrollo de células en función de la estequiometría de la red. La identificación de las inactivaciones génicas/de reacción óptimas requiere la solución de un problema de optimización de dos niveles que seleccione el conjunto de reacciones activas de forma tal que una solución de desarrollo óptimo para la red resultante genere una sobreproducción del producto químico de interés (Burgard et ál., *Biotechnol. Bioeng.* 84:647-657 (2003)).

Un modelo estequiométrico *in silico* de metabolismo de *E. coli* puede emplearse para identificar genes esenciales para vías metabólicas ejemplificadas anteriormente y descritas, por ejemplo, en las publicaciones de patentes de EE. UU. 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 EE. UU. n.º 7,127,379. Como se describe en la presente memoria, el marco matemático OptKnock puede aplicarse para identificar eliminaciones de genes que conduzcan a la producción acoplada al desarrollo de un producto deseado. Además, la solución del problema de OptKnock de dos niveles proporciona un solo conjunto de eliminaciones. Para enumerar todas las soluciones significativas, es decir, todos los conjuntos de inactivaciones que conducen a la formación de producción acoplada al desarrollo, se puede implementar una técnica de optimización, denominada «cortes de enteros». Esto implica la solución iterativa del problema de OptKnock con la incorporación de una limitación adicional a la que se hace referencia como «corte de enteros» en cada iteración, como se mencionó anteriormente.

Teniendo en cuenta las indicaciones y los lineamientos que se proporcionan en la presente memoria, los expertos en la técnica comprenderán que para alterar una reacción enzimática, se ha de alterar la actividad catalítica de la o las enzimas involucradas en la reacción. La alteración puede producirse mediante una variedad de medios que incluyen, por ejemplo, la eliminación de un gen de codificación o la incorporación de una alteración genética en una o más de las secuencias genéticas de codificación. Los genes de codificación seleccionados para la alteración pueden ser uno, algunos o todos los genes que codifiquen enzimas involucradas en la actividad catalítica. Por ejemplo, cuando una sola enzima está involucrada en una actividad catalítica seleccionada, se pueden producir alteraciones mediante una alteración genética que reduzca o destruya la actividad catalítica del producto génico codificado. De manera similar, cuando la enzima individual es multimérica, incluso heteromérica, se pueden producir alteraciones mediante una alteración genética que reduzca o destruya la función de una o todas las subunidades de los productos génicos codificados. La destrucción de la actividad puede alcanzarse mediante la pérdida de la actividad de unión de una o más subunidades con el fin de formar un complejo activo y/o mediante la destrucción de la subunidad catalítica del complejo multimérico. Otras funciones de asociación y actividad de las proteínas multiméricas también pueden seleccionarse con el fin de alterar una reacción metabólica de la invención. Algunas otras funciones son muy conocidas para los expertos en la técnica. Además, algunas o todas las funciones de un solo polipéptido o complejo multimérico pueden alterarse de acuerdo con la invención con el fin de reducir o abolir la actividad catalítica de una o más enzimas involucradas en una reacción o modificación metabólica de la invención. De manera similar, algunas o todas las enzimas involucradas en una reacción o modificación metabólica de la invención pueden alterarse siempre y cuando la reacción seleccionada se reduzca o elimine.

Teniendo en cuenta las indicaciones y los lineamientos que se proporcionan en la presente memoria, los expertos en la técnica también comprenderán que una reacción enzimática puede alterarse mediante la reducción o eliminación de reacciones codificadas por un gen común y/o por uno o más ortólogos de ese gen que presenten una actividad similar o sustancialmente igual. La reducción del gen común y todos los ortólogos puede conducir a una abolición total de cualquier actividad catalítica de una reacción seleccionada. Sin embargo, la alteración del gen común o uno o más ortólogos puede conducir a una reducción en la actividad catalítica de la reacción seleccionada que sea suficiente como para promover el acoplamiento del desarrollo a la biosíntesis del producto. En la presente memoria, se ejemplifican los genes comunes que codifican actividades catalíticas para una variedad de modificaciones metabólicas así como sus ortólogos. Los expertos en la técnica comprenderán que la alteración de algunos o todos los genes que codifican una enzima de una reacción metabólica seleccionada pueden ponerse en práctica en los métodos de la invención e incorporarse en los organismos microbianos de origen no natural de la invención con el fin de lograr la producción de productos acoplada al desarrollo. Los ejemplos de alteraciones para conferir un aumento en la producción de adipato, 6-ACA y/o HMDA se describen en el Ejemplo XXX y las Tablas 14-16.

Al emplear los métodos que se ejemplificaron anteriormente, los métodos de la invención permiten la construcción de células y organismos que aumenten la producción de un producto deseado, por ejemplo, mediante el acoplamiento de la producción de un producto deseado al desarrollo de la célula o del organismo modificado genéticamente para albergar las alteraciones genéticas identificadas. Como se describe en la presente memoria, se han identificado alteraciones metabólicas que acoplan la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico al desarrollo del organismo. Las cepas de organismos microbianos construidas con las alteraciones metabólicas identificadas producen niveles elevados, en comparación con la ausencia de las alteraciones metabólicas, de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico durante la fase de desarrollo exponencial. Estas cepas pueden usarse de manera beneficiosa para la producción comercial de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina o ácido levulínico en un proceso

de fermentación continua sin someterse a las presiones selectivas negativas descritas anteriormente. Si bien se ejemplifican en la presente memoria como alteraciones metabólicas, en particular una o más alteraciones genéticas, que confieren una producción acoplada al desarrollo de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico, se comprende que cualquier alteración genética que aumente la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico puede introducirse en un organismo microbiano hospedador, según se desee.

Por lo tanto, los métodos de la invención proporcionan un conjunto de modificaciones metabólicas identificadas mediante un método *in silico* tal como OptKnock. El conjunto de modificaciones metabólicas puede incluir la alteración funcional de una o más reacciones metabólicas que incluyan, por ejemplo, la alteración mediante eliminación de genes. Para la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico, se pueden seleccionar modificaciones metabólicas de entre el conjunto de modificaciones metabólicas enumeradas en las Tablas 14-16 (véase el Ejemplo XXX).

También se proporciona un método para producir organismos microbianos de origen no natural con una producción estable acoplada al desarrollo de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico. El método puede incluir identificar *in silico* un conjunto de modificaciones metabólicas que aumenten la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico, por ejemplo, que aumenten la producción durante el desarrollo exponencial; modificar genéticamente un organismo para que contenga el conjunto de modificaciones metabólicas que aumenten la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico, y cultivar el organismo modificado genéticamente. Si se desea, el cultivo puede incluir hacer que el organismo modificado genéticamente evolucione de manera adaptativa en condiciones que requieran la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico. Los métodos de la invención son aplicables a bacterias, levaduras y hongos así como a una variedad de otras células y microorganismos, como se describe en la presente memoria.

Por lo tanto, la invención proporciona un organismo microbiano de origen no natural que comprende una o más alteraciones genéticas que confieren un aumento en la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico. En una realización, la o las alteraciones genéticas confieren una producción acoplada al desarrollo de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico y pueden, por ejemplo, conferir una producción estable acoplada al desarrollo de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico. En otra realización, la o las alteraciones genéticas pueden conferir el acoplamiento obligatorio de la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico al desarrollo del organismo microbiano. Esa o esas alteraciones genéticas reducen la actividad de la o las enzimas codificadas respectivas.

El organismo microbiano de origen no natural puede tener una o más alteraciones genéticas incluidas en una modificación metabólica enumerada en las Tablas 14-16. Como se describe en la presente memoria, la o las alteraciones genéticas pueden ser una eliminación. Esos organismos microbianos de origen no natural de la invención incluyen bacterias, levaduras, hongos, o cualquiera de una variedad de otros microorganismos aplicables a procesos de fermentación, como se describe en la presente memoria.

Por lo tanto, la invención proporciona un organismo microbiano de origen no natural, que comprende una o más alteraciones genéticas, donde la o las alteraciones genéticas se producen en genes que codifican proteínas o enzimas, donde la o las alteraciones genéticas confieran un aumento de la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico en el organismo. La producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico puede estar acoplada al desarrollo o no. En una realización particular, la producción de 6-hexametildiamina puede acoplarse obligatoriamente al desarrollo del organismo, como se describe en la presente memoria.

La invención proporciona organismos microbianos de origen no natural con alteraciones genéticas tales como alteraciones genéticas que aumenten la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico, por ejemplo, la producción acoplada al desarrollo de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico. La producción de productos, por ejemplo, puede estar enlazada obligatoriamente a la fase de desarrollo exponencial del microorganismo mediante la alteración genética de las vías metabólicas de la célula, como se describe en la presente memoria. Las alteraciones genéticas pueden aumentar la producción del producto deseado o incluso volver al producto deseado un producto obligatorio durante la fase de desarrollo. Los conjuntos de alteraciones metabólicas o transformaciones que producen un aumento en la producción y niveles elevados de biosíntesis de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico se ejemplifican en las Tablas 14-16 (véase el Ejemplo XXX). Cada alteración dentro de un conjunto corresponde a la reacción metabólica requerida que debería alterarse funcionalmente. La alteración funcional de todas las reacciones dentro de cada conjunto puede producir un aumento en la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico por parte de la cepa modificada genéticamente durante la fase de desarrollo. Las reacciones correspondientes a las alteraciones mencionadas pueden encontrarse en las Tablas 14-16 (véase el Ejemplo XXX) y el gen o los genes que codifican las enzimas o las proteínas que llevan a cabo las reacciones se indican en las Tablas 14-16.

Por ejemplo, para cada cepa ejemplificada en las Tablas 14-16, las alteraciones metabólicas que pueden generarse para la producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico se muestran en cada fila. Estas alteraciones incluyen la alteración funcional de las reacciones que se muestran en las Tablas 14-16. Cada una de estas alteraciones de origen no natural produce un aumento en la producción y un nivel mejorado de producción de ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametildiamina o ácido levulínico, por ejemplo, durante la fase de desarrollo exponencial del organismo microbiano, en comparación con una cepa que no contiene esas alteraciones metabólicas, en condiciones de cultivo adecuadas. Las condiciones adecuadas incluyen, por ejemplo, aquellas que se describen en la presente memoria, lo cual incluye condiciones tales como la evolución adaptativa y/o disponibilidad de reactantes o fuentes de carbono particulares.

Se comprende que las modificaciones que no afecten sustancialmente la actividad de las diversas realizaciones de la presente invención también se proporcionan dentro de la definición de la invención que se proporciona en la presente memoria. Por consiguiente, los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar la presente invención, pero no para limitarla.

Ejemplo I

Vía de degradación de adipato inversa

Este ejemplo describe un ejemplo de vía de síntesis de adipato a través de una vía de degradación de adipato inversa.

Organismos tales como *Penicillium chrysogenum* tienen la capacidad de degradar naturalmente el adipato (Thykaer et al., Metab. 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 de 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 mediante la reducción de oxígeno. En la oxidación de ácidos grasos de carácter mitocondrial, 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* lleva a cabo 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.

Una vía altamente eficiente para la producción de adipato se logra a través de la alteración genética de un microorganismo de forma tal que se empleen 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 adecuados, adaptar su expresión y alterar las condiciones de cultivo de forma tal que las relaciones altas de acetil-CoA, succinil-CoA y/o redox (por ejemplo, NADH/NAD⁺) impulsarán el flujo metabólico a través de esta vía en la dirección de la síntesis de adipato en lugar de la degradación. Los paralelismos fuertes con la formación de butirato en *Clostridia* (Kanehisa y Goto, Nucl. Acids Res. 28:27-30 (2000)) respaldan que cada etapa en la vía de síntesis de adipato es viable desde el punto de vista termodinámico con la direccionalidad de las reacciones regida 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 mediante el uso de esta vía se calculan en presencia y ausencia de un aceptor de electrones externo tal como el oxígeno. Estos cálculos muestran que la vía puede transformar de manera eficiente la glucosa en adipato y CO₂ en condiciones anaerobias con un rendimiento molar del 92 % (Tabla 1). La producción de adipato mediante el uso de esta vía no requiere la absorción de oxígeno ya que se puede generar NAD⁺ en las dos etapas de hidrogenasa que forman 3-hidroxiadipil-CoA y adipil-CoA (véase la Figura 2). Además, la vía es favorable desde el punto de vista energético dado que se forman hasta aproximadamente 1,55 moles de ATP por mol de glucosa consumido en el rendimiento teórico máximo de adipato bajo el supuesto de un mecanismo de sintetasa, fosfotransadipilasa/cinasa o transferasa para la etapa de conversión final. El rendimiento de ATP puede mejorarse de manera adicional hasta 2,47 moles de ATP producidos por mol de glucosa si se presupone que la fosfoenolpiruvato carboxicinas (PPCK) funciona en la dirección de generación de ATP hacia la formación de oxaloacetato. Luego, se realizaron cálculos de rendimiento máximo de ATP bajo el supuesto de que la transformación de adipil-CoA en adipato es una etapa de hidrólisis. Esto reduce los rendimientos máximos de ATP con la producción máxima de adipato hasta 0,85 y 1,77 moles de ATP por mol de glucosa consumido si se presupone que la PPCK es irreversible y reversible, respectivamente. No obstante, estos rendimientos de ATP son suficientes para el desarrollo, el mantenimiento y la producción de células.

Tabla 1: Rendimientos teóricos máximos de adipato y rendimientos de ATP asociados por mol de glucosa mediante el uso de la vía de degradación inversa bajo el supuesto de que la etapa final en la vía es una sintetasa, fosfotransadipilasa/cinasa o transferasa.

	Aerobia	Anaerobia

	Aerobia	Anaerobia
Rendimiento de adipato	0,92	0,92
Rendimiento máx. de ATP con rendimiento máx. de adipato	1,55	1,55
Rendimiento máx. de ATP con rendimiento máx. de adipato, bajo el supuesto de PPCK	2,47	2,47

La modificación genética exitosa de esta vía implica identificar un conjunto adecuado de enzimas con una actividad y especificidad suficientes. Esto implica identificar un conjunto adecuado de enzimas, clonar sus genes correspondientes en un hospedador de producción, optimizar condiciones de fermentación y realizar ensayos para determinar la formación de productos luego de la fermentación. Para modificar genéticamente un hospedador de producción para la producción de adipato, una o más secuencias de ADN exógeno se expresan en un microorganismo hospedador adecuado. Además, los microorganismos pueden tener uno o más genes endógenos eliminados funcionalmente. Estas modificaciones permiten la producción de adipato mediante el uso de materias primas renovables.

Más adelante, se describirá una cantidad de genes candidatos caracterizados bioquímicamente que codifican enzimas que catalizan cada etapa de la vía de degradación de adipato inversa en un hospedador de producción. Si bien se describe el uso de *E. coli* como un organismo hospedador para modificar genéticamente la vía, esencialmente se puede usar cualquier organismo hospedador adecuado. Se enumeran específicamente genes naturales de la *E. coli* así como genes en otros organismos que pueden aplicarse para catalizar las transformaciones adecuadas cuando se clonan y expresan de manera adecuada.

Con respecto a la Figura 2, la etapa 1 involucra succinil CoA:acetil CoA acil transferasa (β -cetotiolasa). La primera etapa en la vía combina acetil-CoA y succinil-CoA para formar 3-oxoadipil-CoA. Los productos génicos codificados por *pcaF* en *Pseudomonas* cepa B13 (Kaschabek et ál., J. Bacteriol. 184:207-215 (2002)), *phaD* en *Pseudomonas putida* U (Olivera et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 95:6419-6424 (1998)), *paaE* en *Pseudomonas fluorescens* ST (Di Gennaro et ál., Arch. Microbiol. 188:117-125 (2007)), y *paaJ* de *E. coli* (Nogales et ál., 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 ál., J. Biosci. Bioengineer. 103:38-44 (2007)). De manera similar, se ha indicado que una β -ceto tiolasa (*bktB*) cataliza la condensación de acetil-CoA y propionil-CoA para formar β -cetovaleril-CoA (Slater et ál., J. Bacteriol. 180: 1979-1987 (1998)) en *R. eutropha*. Se encuentran candidatos adicionales en *Burkholderia ambifaria* AMMD. Las secuencias de proteínas para los productos génicos mencionados anteriormente son muy conocidas en la técnica y se puede acceder a ellas en bases de datos públicas tales como GenBank mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>paaJ</i>	16129358	NP_415915.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>pcaF</i>	17736947	AAL02407	<i>Pseudomonas knackmussii</i> (B13)
<i>phaD</i>	3253200	AAC24332.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaE</i>	106636097	ABF82237.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Bamb_0447	115350501	YP_772340	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD

Estos ejemplos de secuencias pueden usarse 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 correspondientes secuencias genéticas proporcionan secuencias de ADN exógeno para la transformación en *E. coli* u otros microorganismos hospedadores adecuados para generar hospedadores de producción.

Por ejemplo, se pueden encontrar ortólogos de *paaJ* a partir de la *Escherichia coli* K12 mediante el uso de los

siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
152970031	YP_001335140.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
157371321	YP_001479310.1	<i>Serratia proteamaculans</i>
3253200	AAC24332.1	<i>Pseudomonas putida</i>

Se pueden encontrar ejemplos de ortólogos de *pcaF* a partir de la *Pseudomonas knackmussii* mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
4530443	AAD22035.1	<i>Streptomyces sp.</i> 2065
24982839	AAN67000.1	<i>Pseudomonas putida</i>
115589162	ABJ15177.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

5

Otros genes candidatos naturales para la etapa de cetotiolasa incluyen *atoB*, que puede catalizar la condensación reversible de 2 moléculas de acetyl-CoA (Sato et ál., J. Biosci. Bioengineer. 103:38-44 (2007)) y su homólogo *yqeF*. Los candidatos génicos no naturales incluyen *phaA* (Sato et ál., *supra*, 2007) y *bktB* (Slater et ál., J. Bacteriol. 180:1979-1987 (1998)) a partir de *R. eutropha*, y las dos cetotiolasas, *thiA* y *thiB*, a partir de *Clostridium acetobutylicum* (Winzer et ál., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2:531-541 (2000)). Las secuencias de proteínas para cada uno de estos ejemplos de productos génicos pueden encontrarse mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

10

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>atoB</i>	16130161	NP_416728.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>yqeF</i>	90111494	NP_417321.2	<i>Escherichia coli</i>
<i>phaA</i>	113867452	YP_725941	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>bktB</i>	3046397	AAC38322.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>thiA</i>	15896127	NP_349476.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>thiB</i>	15004782	NP_149242.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>

Es menos conveniente el uso de los genes codificadores de tiolasa *fadA* y *fadB*, genes en la vía de degradación de ácidos grasos en la *E. coli*, en este ejemplo de vía. Estos genes forman un complejo que codifica múltiples actividades, la mayoría de las cuales no se desea en esta vía.

15

Con respecto a la Figura 2, la etapa 2 involucra la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa. La segunda etapa en la vía involucra la reducción de 3-oxoadipil-CoA a 3-hidroxiadipil-CoA. Los productos génicos codificados por *phaC* en *Pseudomonas putida* U (Olivera et ál., Proc Natl. Acad. Sci. EUA 95:6419-6424 (1998)) y *paaC* en *Pseudomonas fluorescens* ST (Di Gennaro et ál., 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 esas deshidrogenasas son reversibles y, por consiguiente, estos genes representan candidatos para llevar a cabo la segunda etapa de la síntesis de adipato como se muestra en la Figura 2. Una transformación similar también es llevada a cabo por el producto génico de *hbd* en *Clostridium acetobutylicum*.

20

(Atsumi et ál., Metab. Eng. (pub. electrónica el 14 de sep. de 2007); Boynton et ál., J. Bacteriol. 178:3015-3024 (1996)). Esta enzima convierte acetoacetyl-CoA en 3-hidroxiacetyl-CoA. Por último, dada la proximidad en la *E. coli* de *paaH* con respecto a otros genes en el operón de degradación de fenilacetato (Nogales et ál., Microbiol. 153:357-365 (2007)) y el hecho de que los mutantes *paaH* no pueden desarrollarse en fenilacetato (Ismail et ál., Eur. J. Biochem. 270:3047-3054 (2003)), se espera que el gen de *E. coli paaH* codifique una 3-hidroxiacetyl-CoA deshidrogenasa. Las secuencias de proteínas para cada uno de estos ejemplos de productos génicos pueden encontrarse mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>paaH</i>	16129356	NP_415913.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>phaC</i>	26990000	NP_745425.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaC</i>	106636095	ABF82235.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>hbd</i>	15895965	NP_349314.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>

Con respecto a la Figura 2, la etapa 3 involucra la 3-hidroxiadipil-CoA deshidatasa. El producto génico de *crt* proveniente de *C. acetobutylicum* cataliza la deshidratación de 3-hidroxiacetyl-CoA para formar crotonil-CoA (véase la Figura 2) (Atsumi et ál., *supra*, 2007; Boynton et ál., J. Bacteriol. 178:3015-3024 (1996)). Los homólogos de este gen son fuertes candidatos para llevar a cabo la tercera etapa en la vía de síntesis de adipato que se ejemplifica en la Figura 2. Además, los genes que se sabe que catalizan la hidroxilación de enlaces dobles en compuestos de enoil-CoA representan candidatos adicionales dada la capacidad de reversión de esas transformaciones enzimáticas. Por ejemplo, se cree que las enoil-CoA hidratatasas, *phaA* y *phaB*, de *P. putida* llevan a cabo la hidroxilación de enlaces dobles durante el catabolismo de fenilacetato (Olivera et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 95:6419-6424 (1998)) y, por lo tanto, representan candidatos adicionales para la incorporación en *E. coli*. La eliminación de estos genes excluye la degradación de fenilacetato en *P. putida*. El *paaA* y *paaB* de *P. fluorescens* catalizan transformaciones análogas (Olivera et ál., *supra*, 1998). Por último, se ha demostrado que una cantidad de genes de *Escherichia coli* muestran funcionalidad de enoil-CoA hidratasa, lo cual incluye *maoC* (Park y Lee, J. Bacteriol. 185:5391-5397 (2003)), *paaF* (Ismail et ál., 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 ál., *supra*, 2003; Park y Lee, *supra*, 2004; Park y Lee, *supra*, 2004). Las secuencias de proteínas para cada uno de estos ejemplos de productos génicos pueden encontrarse mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>maoC</i>	16129348	NP_415905.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaF</i>	16129354	NP_415911.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaG</i>	16129355	NP_415912.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>cr</i>	15895969	NP_349318.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>paaA</i>	26990002	NP_745427.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaB</i>	26990001	NP_745426.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>phaA</i>	106636093	ABF82233.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>phaB</i>	106636094	ABF82234.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

De manera alternativa, los genes de betaoxidación son candidatos para las primeras tres etapas en la síntesis de adipato. Los genes candidatos para la vía de síntesis de adipato propuesta también incluyen los genes de oxidación de ácidos grasos naturales de la *E. coli* y sus homólogos en otros organismos. Los genes de la *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 ál., Biochem. 30:6788-6795 (1991); Yang et ál., J. Biol. Chem. 265:10424-10429 (1990); Yang et ál., J. Biol. Chem. 266:16255 (1991); Nakahigashi e Inokuchi, Nucl. Acids Res. 18: 4937 (1990)). Estas actividades son similares desde el punto de vista de su mecanismo a las primeras tres transformaciones que se muestran en la Figura 2. Los genes *fadI* y *fadJ* codifican funciones similares y se expresan de manera natural solo en condiciones anaerobias (Campbell et ál., Mol. Microbiol. 47:793-805 (2003)). Estos productos génicos funcionan naturalmente para degradar compuestos de ácidos grasos de cadena corta, media y larga-CoA para formar acetil-CoA, en lugar de convertir succinil-CoA y acetil-CoA en 5-carboxi-2-pentenoil-CoA tal 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, se pueden aplicar estrategias de evolución dirigida y relacionadas para adaptar las especificidades de los sustratos de la maquinaria de betaoxidación natural de la *E. coli*. Por lo tanto, estas enzimas o sus homólogos pueden aplicarse para la producción de adipato. Si los genes naturales funcionan para degradar el adipato o sus precursores *in vivo*, se realizan las modificaciones genéticas adecuadas para atenuar o eliminar estas funciones. Sin embargo, esto puede no ser necesario dado que se ha descrito un método para producir poli[(R)-3-hidroxi-butanato] en *E. coli* que implica activar el *fadB*, mediante la inactivación de un regulador negativo, el *fadR*, y la expresión conjunta de una cetotiolasa no natural, *phaA* de *Ralstonia eutropha* (Sato et ál., J. Biosci. Bioeng. 103:38-44 (2007)). Este trabajo demostró claramente que una enzima de betaoxidación, en particular el producto génico de *fadB* que codifica las actividades de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y enoil-CoA hidratasa, puede funcionar como parte de una vía para producir moléculas de cadena más larga a partir de precursores de acetil-CoA. Las secuencias de proteínas para cada uno de estos ejemplos de productos génicos pueden encontrarse mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>fadA</i>	49176430	YP_026272.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadB</i>	16131692	NP_418288.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadI</i>	16130275	NP_416844.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadJ</i>	16130274	NP_416843.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadR</i>	16129150	NP_415705.1	<i>Escherichia coli</i>

Con respecto a la Figura 2, la etapa 4 involucra la 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 ál., J. Biol. Chem. 280:4329-4338 (2005)). El *FadE* cataliza esta transformación probablemente en la *E. coli* (Campbell y Cronan, J. Bacteriol. 184:3759-3764 (2002)). La vía requiere una enzima que pueda reducir un producto intermedio de 2-enoil-CoA, no una como el *FadE* que solamente oxidará una acil-CoA para formar un compuesto de 2-enoil-CoA. Además, si bien se ha sugerido que la *E. coli* posee naturalmente enzimas para la reducción de enoil-CoA (Mizugaki et ál., J. Biochem. 92:1649-1654 (1982); Nishimaki et ál., J. Biochem. 95:1315-1321 (1984)), no se ha caracterizado bioquímicamente ningún gen de la *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 ál., *supra*, 2007; Boynton et ál., J. Bacteriol. 178:3015-3024 (1996)), que cataliza naturalmente la reducción de crotonil-CoA a butiril-CoA, una reacción similar en cuanto al mecanismo a la reducción deseada de 5-carboxi-2-pentenoil-CoA a adipil-CoA en la vía de síntesis de adipato. La actividad de esta enzima puede mejorarse mediante la expresión de *bcd* junto con la expresión de los genes *etfAB* de *C. acetobutylicum*, 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 la *E. gracilis* (Hoffmeister et ál., J. Biol. Chem. 280:4329-4338 (2005)). Una construcción derivada de esta secuencia luego de la remoción de su secuencia líder de direccionamiento mitocondrial se clonó en la *E. coli*, lo cual produjo una enzima activa (Hoffmeister et ál., *supra*, 2005). Esta estrategia es muy conocida por los expertos en la técnica de la expresión de genes eucariotas, particularmente aquellos con secuencias líderes que puedan dirigir el producto génico a un compartimento intracelular específico, en organismos procariotas. Un homólogo cercano de este gen, TDE0597, de la *Treponema denticola* procariota representa una tercera enoil-CoA reductasa que se ha clonado y expresado en la *E. coli* (Tucci y Martin, FEBS Lett. 581:1561-1566 (2007)). Las secuencias de proteínas para cada uno de estos ejemplos de productos génicos pueden encontrarse mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>bcd</i>	15895968	NP_349317.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>etfA</i>	15895966	NP_349315.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>etfB</i>	15895967	NP_349316.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
TER	62287512	Q5EU90.1	<i>Euglena gracilis</i>
TDE0597	42526113	NP_971211.1	<i>Treponema denticola</i>

Con respecto a la Figura 2, la etapa 5 involucra adipil-CoA sintetasa (a la que también se hace referencia como «adipato-CoA ligasa»), fosfotransadipilasa/adipato cinasa, adipil-CoA:acetil-CoA transferasa o adipil-CoA hidrolasa. Desde un punto de vista energético, es conveniente que la etapa final en la vía de síntesis de adipato sea catalizada por una enzima o un par 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 la *E. coli*, o sus homólogos, puede llegar a catalizar la transformación final que se muestra en la Figura 2, en caso de que presenten actividad sobre la adipil-CoA. Los genes *sucCD* forman naturalmente un complejo succinil-CoA sintetasa que cataliza la formación de succinil-CoA a partir de succinato con el consumo concomitante de ATP, una reacción que es reversible *in vivo* (Buck et ál., Biochem. 24:6245-6252 (1985)). Dada la similitud estructural entre succinato y adipato, es decir, dado que ambos son ácidos dicarboxílicos de cadena recta, es razonable esperar cierta actividad de la enzima *sucCD* sobre adipil-CoA. Una enzima que presenta una actividad de adipil-CoA ligasa puede llevar a cabo de manera equivalente la producción generadora de ATP de adipato a partir de adipil-CoA, mediante el uso aquí de AMP y PPi como cofactores, cuando funciona en la dirección fisiológica opuesta como se ilustra en la Figura 1. Los ejemplos de CoA-ligasas incluyen la dicarboxilato-CoA ligasa de ratas, para la cual la secuencia todavía no se ha caracterizado (Vamecq et ál., Biochem. J. 230:683-693 (1985)), cualquiera de las dos fenilacetato-CoA ligasas caracterizadas de *P. chrysogenum* (Lamas-Maceiras et ál., Biochem. J. 395, 147-155 (2005); Wang et ál., Biochem. Biophys. Res. Commun. 360:453-458 (2007)), la fenilacetato-CoA ligasa de *Pseudomonas putida* (Martínez-Blanco et ál., J. Biol. Chem. 265:7084-7090 (1990)), y la 6-carboxihexanoato-CoA ligasa de *Bacillus subtilis* (Bower et ál., J. Bacteriol. 178:4122-4130 (1996)). Las secuencias de proteínas para cada uno de estos ejemplos de productos génicos pueden encontrarse mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>sucC</i>	16128703	NP_415256.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>sucD</i>	1786949	AAC73823.1	<i>Escherichia coli</i>

Otra opción, mediante el uso de fosfotransadipilasa/adipato cinasa, es catalizada por los productos génicos de *buk1*, *buk2*, y *ptb* de *C. acetobutylicum* (Walter et ál., Gene 134:107-111 (1993); Huang et ál., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2:33-38 (2000)), o sus homólogos. 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 *buk* con la generación concomitante de ATP. El conjunto análogo de transformaciones, es decir, la conversión de adipil-CoA en adipil-fosfato seguida por la conversión de adipil-fosfato en adipato, puede ser llevado a cabo por los productos génicos *buk1*, *buk2*, y *ptb*. Las secuencias de proteínas para cada uno de estos ejemplos de productos génicos pueden encontrarse mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>ptb</i>	15896327	NP_349676	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>buk1</i>	15896326	NP_349675	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>buk2</i>	20137415	Q97II1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>

De manera alternativa, se puede aplicar una acetiltransferasa capaz de transferir el grupo CoA de adipil-CoA a acetato. Los productos génicos de *cat1*, *cat2*, y *cat3* de *Clostridium kluyveri*, que se ha demostrado que presentan actividad de succinil-CoA, 4-hidroxibutiril-CoA y butiril-CoA acetiltransferasa, respectivamente, catalizan transformaciones similares (Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996); Seedorf et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 105:2128-2133 (2008)). Las secuencias de proteínas para cada uno de estos ejemplos de productos génicos pueden encontrarse mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>cat1</i>	729048	P38946.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>cat2</i>	172046066	P38942.2	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>cat3</i>	146349050	EDK35586.1	<i>Clostridium kluyveri</i>

Finalmente, aunque no es tan conveniente desde un punto de vista energético, la conversión de adipil-CoA en adipato también puede ser llevada a cabo por una acil-CoA hidrolasa o, de manera equivalente, una tioesterasa. El candidato génico de la *E. coli* es *tesB* (Naggert et ál., J. Biol. Chem. 266:11044-11050 (1991)), que muestra una similitud alta con respecto al *acot8* humano, que es un ácido dicarboxílico acetiltransferasa con actividad sobre la adipil-CoA (Westin et ál., J. Biol. Chem. 280:38125-38132 (2005)). Esta actividad también se ha caracterizado en el hígado de ratas (Deana, Biochem. Int. 26:767-773 (1992)). Las secuencias de proteínas para cada uno de estos ejemplos de productos génicos pueden encontrarse mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>tesB</i>	16128437	NP_414986	<i>Escherichia coli</i>
<i>acot8</i>	3191970	CAA15502	<i>Homo sapiens</i>
<i>acot8</i>	51036669	NP_570112	<i>Rattus norvegicus</i>

Otros genes candidatos naturales incluyen *tesA* (Bonner y Bloch, J. Biol. Chem. 247:3123-3133 (1972)), *ybgC* (Kuznetsova et ál., FEMS Microbiol. Rev. 29:263-279 (2005); Zhuang et ál., FEBS Lett. 516:161-163 (2002)), *paal* (Song et ál., J. Biol. Chem. 281:11028-11038 (2006)), y *ybdB* (Leduc et ál., J. Bacteriol. 189:7112-7126 (2007)). Las secuencias de proteínas para cada uno de estos ejemplos de productos génicos pueden encontrarse mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>tesA</i>	16128478	NP_415027	<i>Escherichia coli</i>
<i>ybgC</i>	16128711	NP_415264	<i>Escherichia coli</i>
<i>paal</i>	16129357	NP_415914	<i>Escherichia coli</i>
<i>ybdB</i>	16128580	NP_415129	<i>Escherichia coli</i>

La descripción anterior proporciona un ejemplo de vía de síntesis de adipato por medio de una vía de degradación de adipato inversa.

Ejemplo II

Preparación de un organismo microbiano productor de adipato con una vía de degradación inversa

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir adipato mediante el uso de la

vía de degradación inversa.

La *Escherichia coli* se usa como un organismo objetivo para modificar genéticamente una vía de degradación de adipato inversa como se muestra en la Figura 2. La *E. coli* proporciona un buen hospedador para generar un microorganismo de origen no natural capaz de producir adipato. La *E. coli* es pasible de manipulaciones genéticas y se sabe que es capaz de producir diversos productos, tales como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, de manera eficaz en condiciones anaerobias o microaerobias.

Para generar una cepa de *E. coli* modificada genéticamente para producir adipato, se expresan ácidos nucleicos que codifican las enzimas utilizadas en la vía de degradación inversa en *E. coli* mediante el uso de técnicas de biología molecular muy conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook, *supra*, 2001; Ausubel *supra*, 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) con 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 actividades de 5-carboxi-2-pentenil-CoA reductasa y adipil-CoA sintetasa, respectivamente, se clonan en el vector pZA33 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con el promotor PA1/lacO. Los dos conjuntos de plásmidos se transforman en la *E. coli*, cepa MG1655, para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la síntesis de adipato a través de la vía de degradación inversa.

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

Las cepas microbianas modificadas genéticamente para que tengan una vía de síntesis de adipato funcional se aumentan de manera adicional mediante optimización para la utilización eficiente de la vía. En resumen, la cepa modificada genéticamente se evalúa para determinar si se expresa cualquiera de los genes exógenos en un nivel de limitación de la tasa. La expresión aumenta para cualquier enzima expresada en niveles bajos que pueda limitar el flujo a través de la vía mediante, por ejemplo, la introducción de cantidades de copias de genes adicionales.

Para generar mejores productores, se utiliza el modelado metabólico para optimizar las condiciones de cultivo. También se usa el modelado para diseñar inactivaciones génicas que optimicen de manera adicional la utilización de la vía (véase, por ejemplo, las publicaciones de patentes de EE. UU. 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 EE. UU. n.º 7,127,379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos sobre el desarrollo celular del cambio del metabolismo hacia una producción más eficiente de adipato. Un método de modelado es la estrategia de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard et al., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar inactivaciones de genes que de manera colectiva tengan como resultado una mejor producción de adipato. También se puede usar la evolución adaptativa para generar mejores productores de, por ejemplo, los productos intermedios de acetil-CoA y succinil-CoA o el producto de adipato. La evolución adaptativa se realiza para mejorar las características de desarrollo y producción (Fong y Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et al., *Science* 314:1565-1568 (2006)). En función de los resultados, se pueden aplicar rondas sucesivas de modelado, modificación genética y evolución adaptativa al productor de adipato para aumentar de manera adicional la producción.

Para la producción a gran escala de adipato, el organismo que contiene la vía de degradación inversa anterior se cultiva en un fermentador mediante el uso de un medio conocido en la técnica para respaldar el desarrollo del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan por lotes, por lotes alimentados o de manera continua. Las condiciones anaerobias se mantienen al rociar en primer lugar el medio con nitrógeno y luego sellar el recipiente de cultivo, por ejemplo, los matraces pueden sellarse con un tabique y una tapa con sello. También se pueden utilizar condiciones microaerobias mediante el suministro de un pequeño orificio en el tabique para una ventilación limitada. El pH del medio se mantiene en un pH de alrededor de 7 mediante la adición de un ácido, tal como H₂SO₄. La tasa de desarrollo se determina mediante la medición de la densidad óptica mediante el uso de un espectrofotómetro (600 nm) y la tasa de absorción de glucosa mediante la supervisión de la eliminación de fuentes de carbono con el transcurso del tiempo. Los subproductos tales como alcoholes no convenientes, ácidos orgánicos y glucosa residual pueden cuantificarse mediante HPLC (Shimadzu, Columbia MD), por ejemplo, mediante el uso de una serie Aminex® de columnas de HPLC (por ejemplo, la serie IIPX-87) (BioRad, Hercules, CA), mediante el uso de un detector del índice de refracción para la glucosa y los alcoholes y un detector UV para los ácidos orgánicos (Lin et al., *Biotechnol. Bioeng.* 775-779 (2005)).

Este ejemplo describe la preparación de un organismo microbiano productor de adipato mediante el uso de una vía

de degradación inversa.

Ejemplo III

Síntesis de adipato a través de 3-oxoadipato

Este ejemplo describe un ejemplo de vía de síntesis de adipato a través de 3-oxoadipato.

- 5 Una vía adicional aparte de la que se describe 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 producto intermedio metabólico, el 3-oxoadipato, se
muestra en la Figura 3. Las dos transformaciones iniciales en esta vía son las dos etapas terminales de la vía de
degradación para los compuestos aromáticos y coloroaromáticos que funcionan en la dirección inversa (Kaschabek
et ál., J. Bacteriol. 184:207-215 (2002); Nogales et ál., Microbiol. 153:357-365 (2007); Ismail et ál., Eur. J. Biochem.
10 270:3047-3054 (2003)). Específicamente, la primera etapa forma 3-oxoadipil CoA mediante la condensación de
succinil- y acetil-CoA. La segunda etapa forma 3-oxoadipato y se indica que es reversible en *Pseudomonas* sp.,
cepa B13 (Kaschabek et ál., J. Bacteriol. 184:207-215 (2002)).

- Las etapas posteriores implican la reducción de 3-oxoadipato a 3-hidroxiadipato (conversión de un grupo ceto en un
grupo hidroxilo), la deshidratación de 3-hidroxiadipato para proporcionar hexa-2-enodioato y la reducción de hexa-2-
enodioato para formar adipato. Estas etapas de la vía son análogas a la conversión de oxaloacetato en succinato a
15 través del ciclo de TCA de reducción (véase la Figura 4). Esto respalda que las etapas en la vía sean favorables
desde el punto de vista termodinámico con sujeción a la presencia de concentraciones de metabolitos adecuadas.
La etapa de reducción final puede llevarse a cabo bioquímicamente o mediante el uso de un catalizador químico
para convertir hexa-2-enodioato en adipato. La hidrogenación química puede realizarse mediante el uso del
20 catalizador de Pt en carbono activado como se ha descrito en (Niu et ál., Biotechnol. Prog. 18:201-211 (2002)).

- El rendimiento teórico máximo de adipato mediante el uso de esta vía es de 0,92 moles por mol de glucosa
consumido y no se requiere oxígeno para alcanzar estos rendimientos (véase la Tabla 2). Las energéticas asociadas
son idénticas a las de la vía de adipato inversa. En teoría, se observa una formación de ATP de hasta 1,55 moles
por mol de glucosa utilizado a través de esta vía. El rendimiento de ATP mejora hasta aproximadamente 2,47 moles
si se presupone que la fosfoenolpiruvato cinasa (PPCK) funciona en la dirección de la generación de ATP. Resulta
25 interesante que el rendimiento del producto puede aumentar de manera adicional hasta 1 mol de adipato por mol de
glucosa consumido si se usa hidrogenación química para la última etapa y se presupone un 100 % de eficiencia de
catálisis. En esta situación, se forman en teoría hasta 1,95 moles de ATP sin presuponer la funcionalidad de
reversión de la PPCK.

- 30 Tabla 2: Rendimientos teóricos máximos de adipato y rendimientos de ATP asociados por mol de glucosa mediante
el uso de la vía de 3-oxoadipato.

	Etapa final enzimática		Etapa final de hidrogenación química	
	Aerobia	Anaerobia	Aerobia	Anaerobia
Rendimiento de adipato	0,92	0,92	1,00	1,00
Rendimiento máx. de ATP con rendimiento máx. de adipato	1,55	1,55	1,95	1,95

- La modificación genética exitosa de esta vía implica identificar un conjunto adecuado de enzimas con una actividad y
especificidad suficientes. Esto implica identificar un conjunto adecuado de enzimas, clonar sus genes
35 correspondientes en un hospedador de producción, optimizar condiciones de fermentación y realizar ensayos para
determinar la formación de productos luego de la fermentación. Para modificar genéticamente un hospedador de
producción para la producción de adipato, una o más secuencias de ADN exógeno pueden expresarse en un
microorganismo hospedador. Además, el microorganismo hospedador puede tener uno o más genes endógenos
eliminados funcionalmente. Estas modificaciones permiten la producción de adipato mediante el uso de materias
40 primas renovables.

- Más adelante, se describirá una cantidad de genes candidatos caracterizados bioquímicamente capaces de codificar
enzimas que catalizan cada etapa de la vía de 3-oxoadipato para la síntesis de adipato. Si bien este método se
describe para la *E. coli*, el experto en la técnica puede aplicar estas indicaciones a cualquier otro organismo
hospedador adecuado. Más adelante, se enumerarán específicamente genes naturales de la *E. coli* así como genes
45 en otros organismos que pueden aplicarse para catalizar las transformaciones adecuadas cuando se clonan y
expresan de manera adecuada.

Con respecto a la Figura 3, la etapa 1 involucra succinil CoA:acetil CoA acil transferasa (β -cetotiolasa). Los candidatos génicos para esta enzima se enumeraron anteriormente (Figura 2, etapa 1).

- 5 Con respecto a la Figura 3, la etapa 2 involucra la 3-oxoadipil-CoA transferasa. En esta etapa, se forma 3-oxoadipato mediante la transferencia del grupo CoA de 3-oxoadipil-CoA a succinato. Esta actividad se indica en una enzima de dos unidades codificada por *peal* y *pcaJ* en *Pseudomonas* (Kaschabek et ál., J. Bacterial. 184:207-215 (2002)). Esta enzima cataliza una transformación reversible. Las secuencias de proteínas de ejemplos de productos génicos para la subunidad A de este complejo pueden encontrarse mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>pcaI</i>	24985644	AAN69545.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>pcaI</i>	50084858	YP_046368.1	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1
<i>pcaI</i>	21224997	NP_630776.1	<i>Streptomyces coelicolor</i>

- 10 Las secuencias de proteínas de ejemplos de productos génicos para la subunidad B de este complejo pueden encontrarse mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>pcaJ</i>	26990657	NP_746082.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>pcaJ</i>	21224996	NP_630775.1	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>pcaJ</i>	141776	AAC37147.1	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1

- 15 Con respecto a la Figura 3, la etapa 3 involucra la 3-oxoadipato reductasa. La *E. coli* tiene varias alcohol deshidrogenasas candidatas; dos que tienen funciones análogas son la malato deshidrogenasa (*mdh*) y lactato deshidrogenasa (*ldhA*). Si bien no se ha demostrado que estas dos enzimas tengan especificidades de sustratos amplias en la *E. coli*, se ha demostrado que la lactato deshidrogenasa de *Ralstonia eutropha* muestra actividades altas en sustratos de diversas longitudes de cadenas tales como lactato, 2-oxobutirato, 2-oxopentanoato y 2-oxoglutarato (Steinbuchel y Schlegel, Eur. J. Biochem. 130:329-334 (1983)). Un candidato enzimático no natural adicional para esta etapa es la 3-hidroxiacetoato deshidrogenasa mitocondrial (*bdh*) del corazón humano que se ha clonado y caracterizado (Marks et ál., J. Biol. Chem. 267:15459-15463 (1992)). Esta enzima es particularmente interesante en cuanto a que es una deshidrogenasa que funciona en un 3-hidroxiácido. Dado que las deshidrogenasas normalmente son reversibles, se espera que este producto génico, o un homólogo del mismo, sea capaz de reducir un 3-oxoácido, por ejemplo, 3-oxoadipato, al 3-hidroxiácido correspondiente, por ejemplo, 3-hidroxiadipato. Las secuencias de proteínas para cada uno de estos ejemplos de productos génicos pueden encontrarse mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>mdh</i>	1789632	AAC76268.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>ldhA</i>	16129341	NP_415898.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>ldh</i>	113866693	YP_725182.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>bdh</i>	177198	AAA58352.1	<i>Homo sapiens</i>

Con respecto a la Figura 3, la etapa 4 involucra la 3-hidroxiadipato deshidratasa. En esta reacción, el 3-hidroxiadipato se deshidrata y forma hexa-2-enodioato. Si bien no se han identificado pruebas directas de esta transformación enzimática, la mayoría de las deshidratasas catalizan la eliminación α , β de agua. Esto implica la

activación del α -hidrógeno mediante un grupo carbonilo, carboxilato o CoA-tiol éster aceptor de electrones y la remoción del grupo hidroxilo de la posición β (Martins et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 101:15645-15649 (2004); Buckel y Golding, FEMS Microbiol. Rev. 22:523-541 (1998)). Las secuencias de proteínas para los ejemplos de productos génicos pueden encontrarse mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>acnA</i>	166215073	P25516.3	<i>Escherichia coli</i>
<i>fumB</i>	33112655	P14407.2	<i>Escherichia coli</i>
<i>ilvD</i>	146451	AAA24013.1	<i>Escherichia coli</i>

Otras candidatas adecuadas para llevar a cabo esta función son las serina deshidratasas. Estas enzimas catalizan una transformación muy similar en la remoción de amoníaco de la serina según sea necesario en esta etapa de deshidratación. La secuencia de proteínas para el ejemplo de producto génico puede encontrarse mediante el uso del siguiente número GI y/o identificador de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>dsdA</i>	2507445	P00926	<i>Escherichia coli</i>

También se han identificado candidatos génicos no naturales para esta transformación. Por ejemplo, se demostró que la L-serina deshidratasa con múltiples subunidades de *Peptostreptococcus asaccharolyticus* complementa una cepa de *E. coli* con deficiencia en la actividad de la L-serina deshidratasa (Hofmeister et ál., J. Bacteriol. 179:4937-4941 (1997)). Además, una 2-(hidroximetil)glutarato deshidratasa putativa, codificada por el gen *hmd* en *Eubacterium barkeri* muestra similitudes con respecto a las subunidades α y β de serinas deshidratasas bacterianas que contienen [4Fe-4S] (Alhapel et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 103:12341-12346 (2006)). La secuencia de proteínas para el ejemplo de producto génico puede encontrarse mediante el uso del siguiente número GI y/o identificador de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>Hmd</i>	86278275	ABC88407.1	<i>Eubacterium barkeri</i>

Con respecto a la Figura 3, la etapa 5 involucra la 2-enoato reductasa. La etapa final en la vía de 3-oxoadipato es la reducción del enlace doble en hexa-3-enodioato para formar adipato. Bioquímicamente, esta transformación puede ser catalizada por la 2-enoato reductasa (EC 1.3.1.31) que se sabe que cataliza la reducción dependiente de NADH de una amplia variedad de aldehídos y ácidos carboxílicos α , β -insaturados (Rohdich et ál., J. Biol. Chem. 276:5779-5787 (2001)). Esta enzima es codificada por *enr* en varias especies de *Clostridia* (Giesel y Simon, Arch. Microbiol. 135:51-57 (1983)) que incluyen *C. tyrobutyricum* y *C. thermoaceticum* (que ahora se denomina *Moorella thermoaceticum*) (Rohdich, et ál., J. Biol. Chem. 276:5779-5787 (2001)). En la secuencia genómica recientemente publicada de *C. kluyveri*, se han indicado 9 secuencias de codificación para las enoato reductasas, de las cuales se ha caracterizado una (Seedorf et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 105:2128-2133 (2008)). Los genes *enr* de la *C. tyrobutyricum* y *C. thermoaceticum* se han clonado y secuenciado y muestran un 59 % de identidad entre sí. También se descubrió que el primer gen tiene aproximadamente un 75 % de similitud con respecto al gen caracterizado en *C. kluyveri* (Giesel y Simon, Arch. Microbiol. 135:51-57 (1983)). Se ha indicado en función de estos resultados de secuencias que el *enr* es muy similar a la dienoil CoA reductasa en la *E. coli* (*fadH*) (Rohdich et ál., J. Biol. Chem. 276:5779-5787 (2001)). Por lo tanto, existen varios genes candidatos para catalizar esta última etapa en la vía de 3-oxoadipato que se enumerarán a continuación. El gen *enr* de *C. thermoaceticum* se ha expresado también en una forma enzimáticamente activa en la *E. coli* (Rohdich et ál., *supra*, 2001). Las secuencias de proteínas para los ejemplos de productos génicos pueden encontrarse mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>fadH</i>	16130976	NP_417552.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>enr</i>	169405742	ACA54153.1	<i>Clostridium botulinum</i> cepa A3
<i>enr</i>	2765041	CAA71086.1	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>
<i>enr</i>	3402834	CAA76083.1	<i>Clostridium kluyveri</i>

La descripción anterior proporciona un ejemplo de vía de síntesis de adipato por medio de una vía de 3-oxoadipato.

Ejemplo IV

Preparación de un organismo microbiano productor de adipato con una vía de 3-oxoadipato

- 5 Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir adipato mediante el uso de la vía de 3-oxoadipato.

10 La *Escherichia coli* se usa como un organismo objetivo para modificar genéticamente una vía de 3-oxoadipato como se muestra en la Figura 3. La *E. coli* proporciona un buen hospedador para generar un microorganismo de origen no natural capaz de producir adipato. La *E. coli* es pasible de manipulaciones genéticas y se sabe que es capaz de producir diversos productos, tales como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, de manera eficaz en condiciones anaerobias o microaerobias.

15 Para generar una cepa de *E. coli* modificada genéticamente para producir adipato, se expresan ácidos nucleicos que codifican las enzimas utilizadas en la vía de 3-oxoadipato en *E. coli* mediante el uso de técnicas de biología molecular muy conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook, *supra*, 2001; Ausubel *supra*, 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) con 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) con el promotor PA1/lacO. Los dos conjuntos de plásmidos se transforman en la *E. coli*, cepa MG1655, para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la síntesis de adipato a través de la vía de 3-oxoadipato.

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

30 Las cepas microbianas modificadas genéticamente para que tengan una vía de síntesis de adipato funcional se aumentan de manera adicional mediante optimización para la utilización eficiente de la vía. En resumen, la cepa modificada genéticamente se evalúa para determinar si se expresa cualquiera de los genes exógenos en un nivel de limitación de la tasa. La expresión aumenta para cualquier enzima expresada en niveles bajos que pueda limitar el flujo a través de la vía mediante, por ejemplo, la introducción de cantidades de copias de genes adicionales.

35 Para generar mejores productores, se utiliza el modelado metabólico para optimizar las condiciones de cultivo. También se usa el modelado para diseñar inactivaciones génicas que optimicen de manera adicional la utilización de la vía (véase, por ejemplo, las publicaciones de patentes de EE. UU. 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 EE. UU. n.º 7,127,379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos sobre el desarrollo celular del cambio del metabolismo hacia una producción más eficiente de adipato. Un método de modelado es la estrategia de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard et ál., Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar inactivaciones de genes que de manera colectiva tengan como resultado una mejor producción de adipato. También se puede usar la evolución adaptativa para generar mejores productores de, por ejemplo, los productos intermedios de acetil-CoA y succinil-CoA o el producto de adipato. La evolución adaptativa se realiza para mejorar las características de desarrollo y producción (Fong y Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058

(2004); Alper et ál., Science 314:1565-1568 (2006)). En función de los resultados, se pueden aplicar rondas sucesivas de modelado, modificación genética y evolución adaptativa al productor de adipato para aumentar de manera adicional la producción.

Para la producción a gran escala de adipato, el organismo que contiene la vía de 3-oxoadipato se cultiva en un fermentador mediante el uso de un medio conocido en la técnica para respaldar el desarrollo del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan por lotes, por lotes alimentados o de manera continua. Las condiciones anaerobias se mantienen al rociar en primer lugar el medio con nitrógeno y luego sellar el recipiente de cultivo, por ejemplo, los matraces pueden sellarse con un tabique y una tapa con sello. También se pueden utilizar condiciones microaerobias mediante el suministro de un pequeño orificio en el tabique para una ventilación limitada. El pH del medio se mantiene en un pH de alrededor de 7 mediante la adición de un ácido, tal como H₂SO₄. La tasa de desarrollo se determina mediante la medición de la densidad óptica mediante el uso de un espectrofotómetro (600 nm) y la tasa de absorción de glucosa mediante la supervisión de la eliminación de carbono con el transcurso del tiempo. Los subproductos tales como alcoholes no convenientes, ácidos orgánicos y glucosa residual pueden cuantificarse mediante HPLC (Shimadzu), por ejemplo, mediante el uso de una serie Aminex® de columnas de HPLC (por ejemplo, la serie HPX-87) (BioRad), mediante el uso de un detector del índice de refracción para la glucosa y los alcoholes y un detector UV para los ácidos orgánicos (Lin et ál., Biotechnol. Bioeng. 775-779 (2005)).

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

Ejemplo V

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

Este ejemplo describe una vía de síntesis de adipato descrita anteriormente (véase Niu et ál., Biotechnol. Prog. 18(2): p. 201-11. 2002; Frost et ál., patente de EE. UU. n.º 5,487,987, emitida el 30 de enero de 1996).

La síntesis de adipato a través de un proceso de conversión biológico y químico combinado se ha descrito anteriormente. (Niu et ál., Biotechnol. Prog. 18:201-211 (2002)) y se muestra en la Figura 5. Este método se describe de manera adicional en la patente de EE. UU. n.º 5,487,987. La síntesis de adipato a través de esta vía implica la introducción de tres genes heterólogos en la *E. coli* que puedan convertir el deshidroshikimato en ácido cis,cis-mucónico (Niu et ál., *supra*, 2002). Una etapa de hidrogenación química funcional conduce a la formación de ácido adípico. En esta etapa, el caldo de fermentación tratado previamente que contenía cis,cis-muconato 150 mM se mezcló con platino (Pt) al 10 % en carbono activado. La reacción de hidrogenación se llevó a cabo 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 bajo el supuesto de 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 molar del 85 % de adipato si se emplea una reacción química para la hidrogenación y se obtiene un rendimiento molar del 75 % si se usa una hidrogenasa basada en NADH.

Tabla 3: Rendimientos teóricos máximos de adipato por mol de glucosa mediante el uso de la vía de ácido cis,cis-mucónico.

	Etapa final enzimática		Etapa final de hidrogenación química	
	Aerobia	Anaerobia	Aerobia	Anaerobia
Rendimiento de adipato	0,75	0,00	0,85	0,00

Si bien este es un ejemplo de método, este método tiene desventajas en comparación con otros, tales como los que se describen en los Ejemplos I-IV. Por ejemplo, la primera limitación de este método son los menores rendimientos teóricos en comparación con los de las vías de 3-oxoadipato y de degradación de adipato de carácter inverso. La segunda limitación es que los rendimientos de ATP de esta vía son insignificantes. Una tercera limitación de esta vía es que involucra una dioxigenasa, que necesita un suministro de oxígeno para el biorreactor y que excluye la opción de la fermentación anaerobia.

La descripción anterior proporciona un ejemplo de vía de síntesis de adipato por medio de una vía de ácido cis,cis-mucónico.

Ejemplo VI

Síntesis de adipato a través de alfa-cetoadipato

Este ejemplo describe un ejemplo de vía de síntesis de adipato a través de una vía de alfa-cetoadipato.

El alfa-ceto adipato es un producto intermedio conocido en la biosíntesis de lisina en *S. cerevisiae*, y esta información se usó para identificar una vía adicional para la biosíntesis de ácido adípico (véase la Figura 6). La conversión de alfa-cetoglutarato en alfa-cetoadipato es catalizada por la homocitrato sintasa, homoaconitasa y homoisocitrato deshidrogenasa tal como indican las flechas discontinuas en la Figura 6. La conversión de alfa-cetoadipato en alfa-hidroxiadipato puede ser catalizada por la 2-cetoadipato reductasa, una enzima que se ha indicado que se encuentra en ratas y en la placenta humana (Suda et ál., Arch. Biochem. Biophys. 176:610-620 (1976); Suda et ál., Biochem. Biophys. Res. Commun. 77:586-591 (1977)). Las etapas posteriores involucran una deshidratasa para la conversión de alfa-hidroxiadipato en hexa-2-enodioato seguida por su reducción a ácido adípico. Esta última etapa puede ser catalizada por una enzima o puede tener lugar a través de una reacción química como se describió en el Ejemplo II. Se identifican los genes que codifican las enzimas para la vía de alfa-cetoadipato como se describió en los Ejemplos I-IV.

Los rendimientos de adipato asociados a esta vía se muestran en la Tabla 4. Dado que la pérdida de dos moléculas de CO₂ durante la conversión de acetil-CoA en adipato, solamente se puede convertir el 67 % de la glucosa en adipato. Esto se refleja en los rendimientos molares para esta vía en condiciones aerobias. Los rendimientos se reducen de manera adicional en la ausencia de absorción de oxígeno. Asimismo, dado que los rendimientos de ATP máximos en condiciones anaerobias son insignificantes, el organismo modificado genéticamente tendrá que utilizar sustrato adicional para formar energía para el desarrollo y mantenimiento de las células en esas condiciones.

Tabla 4: Los rendimientos teóricos máximos de adipato y los rendimientos de ATP asociados por mol de glucosa mediante el uso de la vía de alfa-cetoadipato.

	Etapa final enzimática		Etapa final de hidrogenación química	
	Aerobia	Anaerobia	Aerobia	Anaerobia
Rendimiento de adipato	0,67	0,45	0,67	0,40
Rendimiento máx. de ATP con rendimiento máx. de adipato	6,17	0,00	7,50	0,00

La descripción anterior proporciona un ejemplo de vía de síntesis de adipato por medio de una vía de alfa-cetoadipato.

Ejemplo VII

Síntesis de adipato a través de la degradación de lisina

Este ejemplo describe un ejemplo de vía de síntesis de adipato a través de una vía de degradación de lisina.

Dos vías adicionales para la síntesis de adipato dependen de la degradación de lisina para formar adipato. Una vía parte del alfa-cetoglutarato para formar lisina (vía no natural para la *E. coli* y que se encuentra en *S. cerevisiae*), y la otra usa aspartato como punto de partida para la biosíntesis de lisina (vía natural para la *E. coli*). La Figura 7 muestra la formación de adipato a partir de lisina. Los rendimientos teóricos máximos para el adipato, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno mediante el uso del modelo estequiométrico de la *E. coli* se muestran en las Tablas 5 y 6, con alfa-cetoglutarato y aspartato como los puntos de partida respectivos para la lisina. Los rendimientos de ATP máximos que acompañan estos rendimientos teóricos también se calcularon y se muestran en las mismas tablas. Estos rendimientos son menores en comparación con las otras vías que se describen en los Ejemplos I-IV. Se identifican los genes que codifican las enzimas para la vía de alfa-cetoadipato como se describió en los Ejemplos I-IV.

Tabla 5: Rendimiento teórico máximo de adipato y rendimiento de ATP correspondiente por mol de glucosa bajo el supuesto de la vía de biosíntesis de lisina con alfa-cetoglutarato como punto de partida.

	Aerobia	Anaerobia
Rendimiento de adipato	0,40	0,20
Rendimiento máx. de ATP con rendimiento máx. de adipato	5,60	0,00

Tabla 6: Rendimiento teórico máximo de adipato y rendimiento de ATP correspondiente por mol de glucosa bajo el supuesto de la vía de biosíntesis de lisina con aspartato como punto de partida.

	Aerobia	Anaerobia
Rendimiento de adipato	0,50	0,34
Rendimiento máx. de ATP con rendimiento máx. de adipato	0,50	0,04

5 La descripción anterior proporciona un ejemplo de vía de síntesis de adipato por medio de una vía de degradación de lisina.

Ejemplo VIII

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

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

10 Un ejemplo de vía para formar caprolactama y/o ácido 6-aminocaproico mediante el uso de adipil-CoA como el precursor se muestra en la Figura 8. La vía involucra una aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA que puede reducir adipil-CoA a adipato semialdehído y una transaminasa o 6-aminocaproato deshidrogenasa que puede transformar esta molécula en ácido 6-aminocaproico. La etapa terminal que convierte 6-aminocaproato en caprolactama puede alcanzarse a través de una amidohidrolasa o a través de la conversión química (Guit y Buijs, 15 patente de EE. UU. n.º 6,353,100, emitida el 7 de marzo de 2002; Wolters et ál., patente de EE. UU. n.º 5,700,934, emitida el 23 de diciembre de 1997; Agterberg et ál., patente de EE. UU. n.º 6,660,857, emitida el 9 de diciembre de 2003). Se calculó que el rendimiento teórico máximo de caprolactama fue de 0,8 moles por mol de glucosa consumido (véase la Tabla 7) bajo el supuesto de que la vía de degradación de adipato inversa se complementó con el esquema de reacción que se muestra en la Figura 8. La vía es favorable desde el punto de vista energético ya 20 que se forman hasta 0,78 moles de ATP por mol de glucosa consumido con el rendimiento teórico máximo de caprolactama. El rendimiento de ATP puede mejorarse de manera adicional hasta 1,63 moles de ATP producidos por mol de glucosa si se presupone que la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PPCK) funciona en la dirección de generación de ATP hacia la formación de oxaloacetato.

25 La etapa de amidohidrolasa final es neutra desde el punto de vista energético y de redox y, por lo tanto, los rendimientos molares de ATP y producto asociados a la producción de ácido 6-aminocaproico son equivalentes a aquellos asociados a la producción de caprolactama. Por lo tanto, se puede concebir de manera alternativa un microorganismo y proceso de fermentación asociado que forme ácido 6-aminocaproico en lugar de caprolactama, seguido por una operación de unidad adicional para deshidratar/ciclar ácido 6-aminocaproico para formar caprolactama.

30 Tabla 7: Rendimiento teórico máximo de la caprolactama y rendimiento de ATP correspondiente por mol de glucosa bajo el supuesto de que la vía de degradación de ácidos grasos inversa se complementa con el esquema de reacción de la Figura 8.

	Aerobia	Anaerobia
Rendimiento de caprolactama	0,80	0,80
Rendimiento máx. de ATP con rendimiento máx. de caprolactama	0,78	0,78
Rendimiento máx. de ATP con rendimiento máx. de caprolactama, bajo el supuesto de PPCK	1,63	1,63

35 La modificación genética exitosa de esta vía implica identificar un conjunto adecuado de enzimas con una actividad y especificidad suficientes. Esto implica identificar un conjunto adecuado de enzimas, clonar sus genes correspondientes en un hospedador de producción, optimizar condiciones de fermentación y realizar ensayos para determinar la formación de productos luego de la fermentación. Para modificar genéticamente un hospedador de producción para la producción de ácido 6-aminocaproico o caprolactama, una o más secuencias de ADN exógeno pueden expresarse en un microorganismo hospedador. Además, el microorganismo puede tener uno o más genes 40 endógenos eliminados funcionalmente. Estas modificaciones permitirán la producción de 6-aminocaproato o caprolactama mediante el uso de materias primas renovables.

Más adelante, se describirá una cantidad de genes candidatos caracterizados bioquímicamente capaces de codificar enzimas que catalizan cada etapa de la vía de formación de caprolactama que se describe en la Figura 8. Si bien se describen para la *E. coli*, el experto en la técnica puede aplicar estas indicaciones a cualquier otro organismo hospedador adecuado. Específicamente, los genes enumerados son naturales de la *E. coli* o son genes en otros organismos que pueden aplicarse para catalizar las transformaciones adecuadas cuando se clonan y expresan de manera adecuada.

Con respecto a la Figura 8, la etapa 1 involucra la aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA. Los ejemplos de genes que codifican enzimas para catalizar la reducción de una acil-CoA a su aldehído correspondiente incluyen el *acr1* de *Acinetobacter calcoaceticus* que codifica una acil-CoA reductasa grasa (Reiser y Somerville, J. Bacteriol. 179:2969-2975 (1997)), la acil-CoA reductasa grasa de *Acinetobacter* sp. M-1 (Ishige et ál., Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195 (2002)) y el gen *sucD* de *Clostridium kluyveri* (Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996)), que puede convertir succinil-CoA en succinato semialdehído.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>acr1</i>	50086359	YP_047869.1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	18857901	BAB85476.1	<i>Acinetobacter</i> sp., cepa M-1
<i>sucD</i>	172046062	P38947.1	<i>Clostridium kluyveri</i>

Con respecto a la Figura 8, la etapa 2 involucra la transaminasa. La segunda etapa en la vía es la conversión del 6-aldehído en una amina. Esta transformación puede alcanzarse probablemente mediante la gamma-aminobutirato transaminasa (GABA transaminasa), una enzima natural codificada por *gabT* que transfiere un grupo amino de glutamato al aldehído del extremo de succinil semialdehído (Bartsch et ál., J. Bacteriol. 172:7035-7042 (1990)). El producto génico de *puuE* cataliza otra 4-aminobutirato transaminasa en la *E. coli* (Kurihara et ál., J.Biol.Chem. 280:4602-4608 (2005)). Se ha demostrado que las GABA transaminasas en *Mus musculus*, *Pseudomonas fluorescens* y *Sus scrofa* reaccionan con el 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 los ejemplos de productos génicos pueden encontrarse mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>gabT</i>	16130576	NP_417148.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>puuE</i>	16129263	NP_415818.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>abat</i>	37202121	NP_766549.2	<i>Mus musculus</i>
<i>gabT</i>	70733692	YP_257332.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>abat</i>	47523600	NP_999428.1	<i>Sus scrofa</i>

Con respecto a la Figura 8, la etapa 2 puede involucrar de manera alternativa la 6-aminocaproato deshidrogenasa que comprende la aminación reductiva de adipato semialdehído para formar 6-aminocaproato. Esta transformación puede alcanzarse mediante la lisina-6-deshidrogenasa, que convierte naturalmente L-lisina en 2-aminoadipato-6-semialdehído. Se pueden encontrar ejemplos de enzimas en *Geobacillus stearothermophilus* (Heydari et ál., Appl. Environ. Microbiol. 70(2):937-942 (2004)), *Agrobacterium tumefaciens* (Hashimoto et ál., J. Biochem. (Tokio), 106(1):76-80 (1989); Misono et ál., J. Biochem. (Tokio), 105(6):1002-1008 (1989)), y *Achromobacter denitrificans* (Ruldeekulthamrong et ál., BMB Reports 790-795 (2008)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>lysDH</i>	13429872	BAB39707	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>lysDH</i>	15888285	NP_353966	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>lysDH</i>	74026644	AAZ94428	<i>Achromobacter denitrificans</i>

Con respecto a la Figura 8, la etapa 3 involucra la 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 mediante D-lisina lactamasa (EC 3.5.2.11) de *Cryptococcus laurentii* (Fukumura et ál., FEBS Lett. 89:298-300 (1978)). Sin embargo, las secuencias de proteínas y nucleótidos de esta enzima no se conocen actualmente y, hasta ahora, no se ha demostrado actividad de lisina lactamasa en otros organismos.

Se ha demostrado que los plásmidos contenidos en varias cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas del suelo confieren la capacidad de desarrollo en caprolactama como fuente de carbono exclusiva (Boronin et ál., FEMS Microbiol. Lett. 22:167-170 (1984)); sin embargo, las secuencias de genes o proteínas asociadas no se han asociado a esta función hasta ahora.

La enzima candidata con relación más estrecha con información de secuencia disponible es la 6-aminohexanoato-dímero cíclico hidrolasa, que se ha caracterizado en *Pseudomonas* sp. y *Flavobacterium* sp. El producto génico *nylB* de *Pseudomonas* sp NK87 se clonó y expresó en *E. coli* (Kanagawa et ál., J. Gen. Microbiol. 139:787-795 (1993)). La especificidad de sustratos de la enzima se evaluó en *Flavobacterium* sp K172 y se demostró que reacciona con oligómeros de orden más alto de 6-aminohexanoato pero no caprolactama (Kinoshita et ál., Eur. J. Biochem. 116:547-551 (1981)). La capacidad de reversión y capacidad de 6-aminohexanoato dímero hidrolasas en otros organismos de reaccionar con el sustrato deseado en la dirección de interés puede evaluarse de manera adicional. Las secuencias de proteínas para los ejemplos de productos génicos pueden encontrarse mediante el uso de los siguientes números GI y/o identificadores de GenBank:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>nylB</i>	148711	AAA24929.1	<i>Pseudomonas</i> sp NK87
<i>nylB</i>	129000	P13397	<i>Flavobacterium</i> sp K172
<i>nylB</i>	119961013	YP_949627.1	<i>Arthrobacter aureescens</i> TC1

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

Ejemplo IX

Preparación de un organismo microbiano productor de 6-aminocaproato o caprolactama con una vía de 3-oxoadipato

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir adipato mediante el uso de la vía de degradación inversa y la conversión del adipato intracelular en 6-aminocaproato y/o caprolactama.

La *Escherichia coli* se usa como un organismo objetivo para modificar los genes necesarios para la síntesis de adipato, 6-aminocaproato y/o caprolactama (véase la Figura 2 y la Figura 8). La *E. coli* proporciona un buen hospedador para generar un microorganismo de origen no natural capaz de producir adipato, 6-aminocaproato y/o caprolactama. La *E. coli* es pasible de manipulaciones genéticas y se sabe que es capaz de producir diversos productos, tales como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, de manera eficaz en condiciones anaerobias o microaerobias.

Para generar una cepa de *E. coli* modificada genéticamente para producir 6-aminocaproato y/o caprolactama, se expresan ácidos nucleicos que codifican las enzimas utilizadas en la vía de degradación de adipato inversa y las vías de síntesis de 6-aminocaproato o caprolactama en *E. coli* mediante el uso de técnicas de biología molecular muy conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook, *supra*, 2001; Ausubel *supra*, 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) con 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 actividades de

5-carboxi-2-pentenil-CoA reductasa y adipil-CoA sintetasa, respectivamente, se clonan en el vector pZA33 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con 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, con el promotor PA1/lacO. El pZS23 se obtiene mediante el remplazo del módulo de resistencia a la ampicilina del vector pZS13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con un módulo de resistencia a la canamicina mediante técnicas de biología molecular muy conocidas. Los tres conjuntos de plásmidos se transforman en la *E. coli*, cepa MG1655, para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la síntesis de 6-aminocaproato y/o caprolactama.

El organismo modificado genéticamente resultante se cultiva en medio que contiene glucosa siguiendo procedimientos muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et ál., *supra*, 2001).

La expresión de los genes de la síntesis de 6-aminocaproato y caprolactama se corrobora mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica para determinar la expresión de polipéptidos o la actividad enzimática, que incluyen, por ejemplo, transferencias Northern, amplificación por PCR de ARNm, inmunotransferencias, y similares. Las actividades enzimáticas de las enzimas expresadas se confirman mediante el uso de ensayos específicos para las actividades individuales. La capacidad de la cepa de *E. coli* modificada genéticamente de producir 6-aminocaproato y/o caprolactama se confirma mediante el uso de HPLC, cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS) y/o cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS).

Las cepas microbianas modificadas genéticamente para que tengan una vía funcional para la síntesis de 6-aminocaproato y/o caprolactama se aumentan de manera adicional mediante optimización para la utilización eficiente de la vía. En resumen, la cepa modificada genéticamente se evalúa para determinar si se expresa cualquiera de los genes exógenos en un nivel de limitación de la tasa. La expresión aumenta para cualquier enzima expresada en niveles bajos que pueda limitar el flujo a través de la vía mediante, por ejemplo, la introducción de cantidades de copias de genes adicionales.

Para generar mejores productores, se utiliza el modelado metabólico para optimizar las condiciones de cultivo. También se usa el modelado para diseñar inactivaciones génicas que optimicen de manera adicional la utilización de la vía (véase, por ejemplo, las publicaciones de patentes de EE. UU. 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 EE. UU. n.º 7,127,379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos sobre el desarrollo celular del cambio del metabolismo hacia una producción más eficiente de 6-aminocaproato y/o caprolactama. Un método de modelado es la estrategia de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard et ál., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar inactivaciones de genes que de manera colectiva tengan como resultado una mejor producción de 6-aminocaproato y/o caprolactama. También se puede usar la evolución adaptativa para generar mejores productores de, por ejemplo, los productos intermedios acetil-CoA y succinil-CoA de los productos. La evolución adaptativa se realiza para mejorar las características de desarrollo y producción (Fong y Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et ál., *Science* 314:1565-1568 (2006)). En función de los resultados, se pueden aplicar rondas sucesivas de modelado, modificación genética y evolución adaptativa al productor de 6-aminocaproato y/o caprolactama para aumentar de manera adicional la producción.

Para la producción a gran escala de 6-aminocaproato y/o caprolactama, el organismo anterior se cultiva en un fermentador mediante el uso de un medio conocido en la técnica para respaldar el desarrollo del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan por lotes, por lotes alimentados o de manera continua. Las condiciones anaerobias se mantienen al rociar en primer lugar el medio con nitrógeno y luego sellar el recipiente de cultivo, por ejemplo, los matraces pueden sellarse con un tabique y una tapa con sello. También se pueden utilizar condiciones microaerobias mediante el suministro de un pequeño orificio en el tabique para una ventilación limitada. El pH del medio se mantiene en un pH de alrededor de 7 mediante la adición de un ácido, tal como H₂SO₄. La tasa de desarrollo se determina mediante la medición de la densidad óptica mediante el uso de un espectrofotómetro (600 nm) y la tasa de absorción de glucosa mediante la supervisión de la eliminación de fuentes de carbono con el transcurso del tiempo. Los subproductos tales como alcoholes no convenientes, ácidos orgánicos y glucosa residual pueden cuantificarse mediante HPLC (Shimadzu), por ejemplo, mediante el uso de una serie Aminex® de columnas de HPLC (por ejemplo, la serie IIPX-87) (BioRad), mediante el uso de un detector del índice de refracción para la glucosa y los alcoholes y un detector UV para los ácidos orgánicos (Lin et ál., *Biotechnol. Bioeng.* 775-779 (2005)).

Ejemplo X

Síntesis de adipato a través de 2-hidroxiadipil-CoA

Este ejemplo describe dos ejemplos de vías de síntesis de adipato que proceden del alfa-cetoadipato y pasan a través de un producto intermedio de 2-hidroxiadipil-CoA.

Como se describe en el Ejemplo VI, el alfa-cetoadipato es un producto intermedio conocido en la biosíntesis de lisina que puede formarse a partir de alfa-cetoglutarato a través de la homocitrato sintasa, homoaconitasa y homoisocitrato deshidrogenasa. El alfa-cetoadipato puede convertirse en 2-hidroxiadipil-CoA mediante las dos vías que se ilustran en la Figura 9. Posteriormente, se puede deshidratar 2-hidroxiadipil-CoA y reducirse a adipil-CoA que luego puede

convertirse en adipato como se muestra en la Figura 9. El rendimiento máximo de adipato a partir de glucosa a través de estas vías es de 0,67 mol/mol.

La conversión de alfa-cetoadipato en 2-hidroxiadipato puede ser catalizada por la 2-cetoadipato reductasa, una enzima que se ha indicado que se encuentra en ratas y en la placenta humana (Suda et ál., Arch. Biochem. Biophys. 176:610-620 (1976); Suda et ál., Biochem. Biophys. Res. Commun. 77:586-591 (1977)). De manera alternativa, las enzimas capaces de reducir el alfa-cetoglutarato a 2-hidroxioglutarato también pueden mostrar actividad en alfa-cetoadipato, que es solamente un átomo de carbono más largo. Una enzima de ese tipo que posee actividad de alfa-cetoglutarato reductasa es *serA* de *Escherichia coli* (Zhao y Winkler, J. Bacteriol. 178(1):232-9 (1996)). Se pueden encontrar ejemplos de enzimas adicionales en la *Arabidopsis thaliana* (Ho, et ál., J. Biol. Chem. 274(1):397-402 (1999)) y *Haemophilus influenzae*.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>serA</i>	16130814	NP_417388.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>PGDH</i>	18394525	NP_564034	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>serA</i>	1173427	P43885	<i>Haemophilus influenzae</i>

Con respecto a la Figura 9, el 2-hidroxiadipato puede convertirse probablemente en 2-hidroxiadipil-CoA mediante las sintetasa, transferasas, fosfotransadipilasas y cinasas descritas en el Ejemplo I. De manera alternativa, las enzimas con actividad de 2-hidroxioglutarato CoA-transferasa o glutaconato CoA-transferasa probablemente sean adecuadas para transferir un resto de CoA a 2-hidroxiadipato. Un ejemplo de una enzima de ese tipo es codificado por los genes *gctA* y *gctB* de *Acidaminococcus fermentans* (Buckel, et ál., Eur. J. Biochem. 118(2):315-321 (1981); Mack, et ál., Eur. J. Biochem. 226(1):41-51 (1994)). De manera similar, se necesitarían actividades de sintetasa, transferasa o fosfotransadipilasa y cinasa para convertir alfa-cetoadipato en alfa-cetoadipil-CoA, como se ilustra en la Figura 9. La conversión de alfa-cetoadipil-CoA en 2-hidroxiadipil-CoA puede ser llevada a cabo por una enzima alfa-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa. Se indicó una actividad similar en células de *E. coli* adaptadas al propionato cuyos extractos catalizaron la oxidación de lactil-CoA para formar piruvil-CoA (Megraw et ál., J. Bacteriol. 90(4): 984-988 (1965)). Se describieron hidroxiacil-CoA deshidrogenasas adicionales en el Ejemplo I.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>gctA</i>	3122155	Q59111	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>gctB</i>	3122156	Q59112	<i>Acidaminococcus fermentans</i>

La deshidratación de 2-hidroxiadipil-CoA para formar 5-carboxi-2-pentenoil-CoA puede ser llevada a cabo por una 2-hidroxiacil-CoA deshidratasa. Un sistema de 2-hidroxiacil-CoA deshidratasa se ha caracterizado en *Acidaminococcus fermentans* y requiere las subunidades de *hgdA* y *hgdB* y la proteína activadora, *hgdC*, para la actividad óptima (Dutscho et ál., Eur. J. Biochem. 181(3):741-746 (1989); Locher et ál. J. Mol. Biol. 307(1):297-308; Muller y Buckel, Eur. J. Biochem. 230(2):698-704 (2001); Schweiger et ál. Eur. J. Biochem. 169(2):441-448 (1987)). Este sistema enzimático es similar en cuanto a su 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)). Existen homólogos de *hgdA*, *hgdB* y *hgdC* en varios organismos.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>hgdA</i>	123112	P11569	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>hgdB</i>	123113	P11570	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>hgdC</i>	2506909	P11568	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>hgdA</i>	225177593	ZP_03731126.1	<i>Clostridium sp. M62/1</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>hgdB</i>	225177592	ZP_03731125.1	<i>Clostridium sp. M62/1</i>
<i>hgdC</i>	225177594	ZP_03731127.1	<i>Clostridium sp. M62/1</i>
<i>hgdA</i>	19703552	NP_603114.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>hgdB</i>	19703553	NP_603115.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>hgdC</i>	19703551	NP_603113.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>

La conversión de 5-carboxi-2-pentenoil-CoA en adipato es llevada a cabo por las enzimas descritas en el Ejemplo I.

La descripción anterior proporciona un ejemplo de vía de síntesis de adipato por medio de una vía de 2-hidroxiadipil-CoA.

5 Ejemplo XI

Preparación de un organismo microbiano productor de adipato con una vía de 2-hidroxiadipil-CoA

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir adipato mediante el uso de una vía de 2-hidroxiadipil-CoA.

10 La *Escherichia coli* se usa como un organismo objetivo para modificar los genes necesarios para la síntesis de adipato (véase la Figura 9). La *E. coli* proporciona un buen hospedador para generar un microorganismo de origen no natural capaz de producir adipato. La *E. coli* es pasible de manipulaciones genéticas y se sabe que es capaz de producir diversos productos, tales como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, de manera eficaz en condiciones anaerobias o microaerobias.

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

25 El organismo modificado genéticamente resultante se cultiva en medio que contiene glucosa siguiendo procedimientos muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et ál., *supra*, 2001). La expresión de los genes de la vía de 2-hidroxiadipil-CoA para la síntesis de adipato se corrobora mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica para determinar la expresión de polipéptidos o la actividad enzimática, que incluyen, por ejemplo, transferencias Northern, amplificación por PCR de ARNm, inmunotransferencias, y similares. Las actividades enzimáticas de las enzimas expresadas se confirman mediante el uso de ensayos específicos para las actividades individuales. La capacidad de la cepa de *E. coli* modificada genéticamente de producir adipato se
35 confirma mediante el uso de HPLC, cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS) y/o cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS).

Las cepas microbianas modificadas genéticamente para que tengan una vía de síntesis de adipato funcional se aumentan de manera adicional mediante optimización para la utilización eficiente de la vía. En resumen, la cepa modificada genéticamente se evalúa para determinar si se expresa cualquiera de los genes exógenos en un nivel de limitación de la tasa. La expresión aumenta para cualquier enzima expresada en niveles bajos que pueda limitar el
40 flujo a través de la vía mediante, por ejemplo, la introducción de cantidades de copias de genes adicionales.

Para generar mejores productores, se utiliza el modelado metabólico para optimizar las condiciones de cultivo. También se usa el modelado para diseñar inactivaciones génicas que optimicen de manera adicional la utilización de

la vía (véase, por ejemplo, las publicaciones de patentes de EE. UU. 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 EE. UU. n.º 7,127,379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos sobre el desarrollo celular del cambio del metabolismo hacia una producción más eficiente de adipato. Un método de modelado es la estrategia de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard et ál., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar inactivaciones de genes que de manera colectiva tengan como resultado una mejor producción de adipato. También se puede usar la evolución adaptativa para generar mejores productores de, por ejemplo, el producto intermedio de alfa-cetoadipato o el producto de adipato. La evolución adaptativa se realiza para mejorar las características de desarrollo y producción (Fong y Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et ál., *Science* 314:1565-1568 (2006)). En función de los resultados, se pueden aplicar rondas sucesivas de modelado, modificación genética y evolución adaptativa al productor de adipato para aumentar de manera adicional la producción.

Para la producción a gran escala de adipato, el organismo que contiene la vía de 2-hidroxiadipil-CoA se cultiva en un fermentador mediante el uso de un medio conocido en la técnica para respaldar el desarrollo del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan por lotes, por lotes alimentados o de manera continua. Las condiciones anaerobias se mantienen al rociar en primer lugar el medio con nitrógeno y luego sellar el recipiente de cultivo, por ejemplo, los matraces pueden sellarse con un tabique y una tapa con sello. También se pueden utilizar condiciones microaerobias mediante el suministro de un pequeño orificio en el tabique para una ventilación limitada. El pH del medio se mantiene en un pH de alrededor de 7 mediante la adición de un ácido, tal como H₂SO₄. La tasa de desarrollo se determina mediante la medición de la densidad óptica mediante el uso de un espectrofotómetro (600 nm) y la tasa de absorción de glucosa mediante la supervisión de la eliminación de fuentes de carbono con el transcurso del tiempo. Los subproductos tales como alcoholes no convenientes, ácidos orgánicos y glucosa residual pueden cuantificarse mediante HPLC (Shimadzu), por ejemplo, mediante el uso de una serie Aminex® de columnas de HPLC (por ejemplo, la serie IIPX-87) (BioRad), mediante el uso de un detector del índice de refracción para la glucosa y los alcoholes y un detector UV para los ácidos orgánicos (Lin et ál., *Biotechnol. Bioeng.* 775-779 (2005)).

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

Ejemplo XII

Vías para la producción de hexametilendiamina, caprolactama y ácido 6-aminocaproico

Este ejemplo describe ejemplos de vías para la producción de hexametilendiamina, caprolactama y ácido 6-aminocaproico.

A continuación, se describirán diversas vías que conducen a la producción de caprolactama, hexametilendiamina (HMDA) o 6-aminocaproato a partir de metabolitos centrales comunes. La primera vía descrita implica la activación de 6-aminocaproato a 6-aminocaproil-CoA mediante una enzima transferasa o sintasa (Figura 10, Etapa Q o R) seguida por la ciclación espontánea de 6-aminocaproil-CoA para formar caprolactama (Figura 10, Etapa T). La segunda vía descrita implica la activación de 6-aminocaproato a 6-aminocaproil-CoA (Figura 10, Etapa Q o R), seguida por una reducción (Figura 10, Etapa U) y aminación (Figura 10, Etapa V o W) para formar HMDA. De manera alternativa, se puede activar ácido 6-aminocaproico para formar 6-aminocaproil-fosfato en lugar de 6-aminocaproil-CoA. El 6-aminocaproil-fosfato puede ciclarse de manera espontánea para formar caprolactama. De manera alternativa, el 6-aminocaproil-fosfato puede reducirse a 6-aminocaproato semialdehído, que luego puede convertirse en HMDA como se ilustra en las Figuras 10 y 11. En cualquier caso, la reacción de aminación debe producirse de manera relativamente rápida para minimizar la formación espontánea de la imina cíclica de 6-aminocaproato semialdehído. El enlace o andamiaje de las enzimas participantes representa una opción que puede llegar a ser potente para garantizar que el producto intermedio de 6-aminocaproato semialdehído se canalice de manera eficiente de la enzima reductasa a la enzima de aminación.

Otra opción para minimizar o incluso eliminar la formación de la imina cíclica o caprolactama durante la conversión de ácido 6-aminocaproico en HMDA implica añadir un grupo funcional (por ejemplo, acetilo, succinilo) al grupo amina de ácido 6-aminocaproico para protegerlo contra la ciclación. Esto es análogo a la formación de ornitina a partir de L-glutamato en la *Escherichia coli*. Específicamente, el glutamato se convierte en primer lugar en N-acetil-L-glutamato mediante N-acetilglutamato sintasa. Luego se activa el N-acetil-L-glutamato para formar N-acetilglutamil-fosfato, que se reduce y transamina para formar N-acetil-L-ornitina. Luego el grupo acetilo se remueve de la N-acetil-L-ornitina mediante N-acetil-L-ornitina desacetilasa con formación de L-ornitina. Una vía de ese tipo es necesaria debido a que la formación de glutamato-5-fosfato a partir de glutamato seguida por la reducción a glutamato-5-semialdehído conduce a la formación de (S)-1-pirrolin-5-carboxilato, una imina cíclica formada de manera espontánea a partir de glutamato-5-semialdehído. En el caso de la formación de HMDA a partir de ácido 6-aminocaproico, las etapas pueden implicar la acetilación de ácido 6-aminocaproico para formar ácido acetil-6-aminocaproico, la activación del grupo de ácido carboxílico con un grupo fosfato o CoA, la reducción, la aminación y la desacetilación.

Cabe destacar que se puede formar 6-aminocaproato a partir de diversas moléculas iniciales. Por ejemplo, la estructura principal de carbono de 6-aminocaproato puede derivar de succinil-CoA y acetil-CoA como se ilustra en la

Figura 10 y también se describe en las Figuras 2, 3 y 8. De manera alternativa, el 6-aminocaproato puede derivar de alfa-cetoadipato, donde se convierte alfa-cetoadipato en adipil-CoA (véase la Figura 9) y se convierte adipil-CoA en 6-aminocaproato como se muestra en la Figura 10.

La Figura 11 proporciona dos vías metabólicas adicionales al 6-aminocaproato o 6-aminocaproyl-CoA a partir de 4-aminobutiril-CoA y acetil-CoA. La primera vía implica la condensación de 4-aminobutiril-CoA y acetil-CoA para formar 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA (Etapa A) seguida por una reducción (Etapa B), deshidratación (Etapa C) y reducción (Etapa D) para formar 6-aminocaproyl-CoA. Se puede convertir 6-aminocaproyl-CoA en 6-aminocaproato mediante una enzima transferasa (Etapa K), sintasa (Etapa L) o hidrolasa (Etapa M). De manera alternativa, se puede convertir 6-aminocaproyl-CoA en caprolactama mediante ciclación espontánea (Etapa Q) o en HMDA luego de su reducción (Etapa N) y aminación (Etapa O o P). La segunda vía descrita en la Figura 11 implica la condensación de 4-aminobutiril-CoA y acetil-CoA para formar 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA (Etapa A) que luego se convierte en 3-oxo-6-aminohexanoato mediante una transferasa (Etapa E), sintasa (Etapa F) o hidrolasa (Etapa G). Luego se reduce el 3-oxo-6-aminohexanoato (Etapa H), se deshidrata (Etapa I) y se reduce (Etapa J) para formar 6-aminocaproato.

La molécula inicial, 4-aminobutiril-CoA, puede formarse a partir de diversos metabólicos centrales comunes. Por ejemplo, el glutamato puede descarboxilarse para formar 4-aminobutirato, que luego es activado por una CoA-transferasa o sintasa para formar 4-aminobutiril-CoA. De manera alternativa, el succinato semialdehído, formado a partir de la reducción de succinil-CoA o la descarboxilación de alfa-cetoglutarato, puede transaminarse para formar 4-aminobutirato antes de la activación por parte de una CoA-transferasa o sintasa para formar 4-aminobutiril-CoA. Cabe destacar que 4-aminobutiril-CoA y varios de los productos intermedios de la vía de 4-aminobutiril-CoA a 6-aminocaproyl-CoA pueden ciclarse espontáneamente y formar sus correspondientes lactamas. Por lo tanto, se puede usar la adición de un grupo funcional protector al grupo amina del extremo de 4-aminobutiril-CoA y/o varios de los productos intermedios de amino-CoA para minimizar la formación de subproductos cíclicos no deseados. En este caso, aplicaría el mismo conjunto general de transformaciones que se ilustran en la Figura 11, aunque se pueden añadir a la vía dos etapas adicionales, por ejemplo, una acetilasa y desacetilasa.

Todas las transformaciones que se ilustran en las Figuras 10-11 entran en las 12 categorías generales de transformaciones que se muestran en la Tabla 8. A continuación, se describirá una cantidad de genes candidatos caracterizados bioquímicamente en cada categoría. Se enumeran específicamente genes que pueden aplicarse para catalizar las transformaciones adecuadas en las Figuras 10-11 cuando se clonan y expresan.

Tabla 8. Tipos de enzimas para la conversión de succinil-CoA, acetil-CoA y/o 4-aminobutiril-CoA en 6-aminocaproato, caprolactama y/o hexametildiamina. Los primeros tres dígitos de cada etiqueta corresponden a los primeros tres números de la Comisión de Enzimas que indican el tipo general de transformación con independencia de la especificidad de sustratos.

Etiqueta	Función
1.1.1.a	Oxidoreductasa (de cetona a hidroxilo o de aldehído a alcohol)
1.2.1.b	Oxidoreductasa (de acil-CoA a aldehído)
1.3.1.a	Oxidoreductasa que funciona en donantes CH-CH
1.4.1.a	Oxidoreductasa que funciona en aminoácidos
2.3.1.b	Aciltransferasa
2.6.1.a	Aminotransferasa
2.8.3.a	Coenzima-A transferasa
3.1.2.a	Tioléster hidrolasa (específica de CoA)
4.2.1.a	Hidro-liasa
6.2.1.a	Ácido-tiol ligasa
6.3.1.a/6.3.2.a	Amida sintasas/péptido sintasas

Etiqueta	Función
No se necesitan enzimas	Ciclación espontánea

1.1.1.a Oxidorreductasas. Cuatro transformaciones que se ilustran en las Figuras 10 y 11 requieren oxidorreductasas que conviertan una funcionalidad de cetona en un grupo hidroxilo. La Etapa B en las Figuras 10 y 11 implica convertir 3-oxoacil-CoA en 3-hidroxiacil-CoA. La Etapa H en las Figuras 1 y 2 implica convertir un 3-oxoácido en un 3-hidroxiácido.

Los ejemplos de enzimas que pueden convertir moléculas de 3-oxoacil-CoA tales como 3-oxoadipil-CoA y 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA en moléculas de 3-hidroxiacil-CoA tales como 3-hidroxiadipil-CoA y 3-hidroxi-6-aminohexanoil-CoA, respectivamente, incluyen enzimas cuyas funciones fisiológicas naturales tienen que ver con la betaoxidación de ácidos grasos o el catabolismo de fenilacetato. Por ejemplo, las subunidades de dos complejos de oxidación de ácidos grasos en la *E. coli*, codificadas por *fadB* y *fadJ*, funcionan como 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasas (Binstock et ál., Methods Enzymol. 71:403-411 (1981)). Además, los productos génicos codificados por *phaC* en *Pseudomonas putida* U (Olivera et ál., Proc Natl. Acad. Sci. EUA 95:6419-6424 (1998)) y *paaC* en *Pseudomonas fluorescens* ST(Di Gennaro et ál., Arch. Microbiol. 188:117-125 (2007)) catalizan la reacción inversa de la etapa B en la Figura 10, es decir, la oxidación de 3-hidroxiadipil-CoA para formar 3-oxoadipil-CoA, durante el catabolismo de fenilacetato o estireno. Cabe destacar que las reacciones catalizadas por esas enzimas son reversibles. Además, dada la proximidad en la *E. coli* del *paaH* con respecto a otros genes en el operón de degradación de fenilacetato (Nogales et ál., Microbiology 153:357-365 (2007)) y el hecho de que los mutantes de *paaH* no pueden desarrollarse en fenilacetato (Ismail et ál., Eur.J Biochem. 270:3047-3054 (2003)), se espera que el gen *paaH* de *E. coli* codifique una 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>fadB</i>	119811	P21177.2	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadJ</i>	3334437	P77399.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaH</i>	16129356	NP_415913.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>phaC</i>	26990000	NP_745425.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaC</i>	106636095	ABF82235.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Otros ejemplos de oxidorreductasas capaces de convertir moléculas de 3-oxoacil-CoA en sus correspondientes moléculas de 3-hidroxiacil-CoA incluyen 3-hidroxiubutiril-CoA deshidrogenasas. La enzima de *Clostridium acetobutylicum*, codificada por el *hbd*, se ha clonado y expresado funcionalmente en la *E. coli* (Youngleson et ál., J. Bacteriol. 171:6800-6807 (1989)). Otros candidatos génicos incluyen *HbdI* (dominio de extremo C) y *Hbd2* (dominio de extremo N) en *Clostridium kluyveri* (Hillmer et ál., FEBS Lett. 21:351-354 (1972)) y *HSD17B10* en *Bos taurus* (Wakil et ál., J. Biol. Chem. 207:631-638 (1954)). Incluso otros candidatos génicos que han demostrado reducir acetoacetyl-CoA a 3-hidroxiubutiril-CoA son el *phbB* de *Zoogloea ramigera* (Ploux et ál., Eur. J. Biochem. 174:177-182 (1988)) y el *phaB* de *Rhodobacter sphaeroides* (Alber et ál., Mol. Microbiol. 61:297-309 (2006)). El primero de estos candidatos génicos depende de NADPH, se ha determinado su secuencia de nucleótidos (Peoples et ál., Mol. Microbiol. 3:349-357 (1989)) y el gen se ha expresado en la *E. coli*. Los estudios de especificidad de sustratos en el gen conducen a la conclusión de que podría aceptar 3-oxopropionil-CoA como un sustrato además de acetoacetyl-CoA (Ploux et ál., *supra*).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>hbd</i>	18266893	P52041.2	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>Hbd2</i>	146348271	EDK34807.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>Hbd1</i>	146345976	EDK32512.1	<i>Clostridium kluyveri</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>HSD17B10</i>	3183024	O02691.3	<i>Bos taurus</i>
<i>phbB</i>	130017	P23238.1	<i>Zoogloea ramigera</i>
<i>phaB</i>	146278501	YP_001168660.1	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>

Se ha descubierto una cantidad de enzimas similares en otras especies de *Clostridia* y en la *Metallosphaera sedula* (Berg et ál., Science 318:1782-1786 (2007)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>hbd</i>	15895965	NP_349314.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>hbd</i>	20162442	AAM14586.1	<i>Clostridium beijerinckii</i>
<i>Msed_1423</i>	146304189	YP_001191505	<i>Metallosphaera sedula</i>
<i>Msed_0399</i>	146303184	YP_001190500	<i>Metallosphaera sedula</i>
<i>Msed_0389</i>	146303174	YP_001190490	<i>Metallosphaera sedula</i>
<i>Msed_1993</i>	146304741	YP_001192057	<i>Metallosphaera sedula</i>

- 5 Diversas alcohol deshidrogenasas representan buenos candidatos para convertir 3-oxoadipato en 3-hidroxiadipato (etapa H, Figura 10) o 3-oxo-6-aminohexanoato en 3-hidroxi-6-aminohexanoato (etapa H, Figura 11). Dos enzimas de ese tipo capaces de convertir un oxoácido en un hidroxiácido son codificadas por los genes de malato deshidrogenasa (*mdh*) y lactato deshidrogenasa (*ldhA*) en la *E. coli*. Además, se ha demostrado que la lactato deshidrogenasa de *Ralstonia eutropha* muestra actividades altas en sustratos de diversas longitudes de cadenas
- 10 tales como lactato, 2-oxobutirato, 2-oxopentanoato y 2-oxoglutarato (Steinbuchel et ál., Eur. J. Biochem. 130:329-334 (1983)). La conversión de alfa-cetoadipato en alfa-hidroxiadipato puede ser catalizada por la 2-cetoadipato reductasa, una enzima que se ha indicado que se encuentra en ratas y en la placenta humana (Suda et ál., Arch. Biochem. Biophys. 176:610-620 (1976); Suda et ál., Biochem. Biophys. Res. Commun. 77:586-591 (1977)). Un candidato adicional para estas etapas es la 3-hidroxiobutirato deshidrogenasa mitocondrial (*bdh*) del corazón humano
- 15 que se ha clonado y caracterizado (Marks et ál., J. Biol. Chem. 267:15459-15463 (1992)). Esta enzima es una deshidrogenasa funciona en un 3-hidroxiácido. Otro ejemplo de alcohol deshidrogenasa convierte acetona en isopropanol como se mostró en *C. beijerinckii* (Ismail et ál., J. Bacteriol. 175:5097-5105 (1993) y *T. Brockii* (Lamed et ál., Biochem. J. 195:183-190 (1981); Peretz et ál., Biochemistry 28:6549-6555 (1989)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>mdh</i>	1789632	AAC76268.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>ldhA</i>	16129341	NP_415898.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>ldh</i>	113866693	YP_725182.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>bdh</i>	177198	AAA58352.1	<i>Homo sapiens</i>
<i>adh</i>	60592974	AAA23199.2	<i>Clostridium beijerinckii</i>
<i>adh</i>	113443	P14941.1	<i>Thermoanaerobacter Brockii</i>

1.2.1.b Oxidorreductasa (de acil-CoA a aldehído). Las transformaciones de adipil-CoA a adipato semialdehído (Etapa N, Figura 10) y de 6-aminocaproil-CoA a 6-aminocaproato semialdehído (Etapa U, Figura 10; Etapa N, Figura 11) necesitan acil-CoA deshidrogenasas capaces de reducir acil-CoA a su aldehído correspondiente. Los ejemplos de genes que codifican esas enzimas incluyen el *acr1* de *Acinetobacter calcoaceticus* que codifica una acil-CoA reductasa grasa (Reiser et ál., J. Bacteriology 179:2969-2975 (1997)), la acil-CoA reductasa grasa de *Acinetobacter* sp. M-1 (Ishige et ál., Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195 (2002)), y una succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA y NADP codificada por el gen *sucD* en *Clostridium kluyveri* (Sohling et ál., J. Bacteriol. 178:871-880 (1996)). El *SucD* de *P. gingivalis* es otra succinato semialdehído deshidrogenasa (Takahashi et ál., J. Bacteriol. 182:4704-4710 (2000)). La enzima acetaldehído deshidrogenasa de acilación en *Pseudomonas* sp, codificada por el *bphG*, es incluso otra candidata ya que se ha demostrado que oxida y acila acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, isobutiraldehído y formaldehído (Powlowski et ál., J Bacteriol. 175:377-385 (1993)). Además de reducir acetil-CoA a etanol, se ha demostrado que la enzima codificada por *adhE* en *Leuconostoc mesenteroides* oxida el compuesto de cadena ramificada isobutiraldehído para formar isobutiril-CoA (Kazahaya et ál., J. Gen. Appl. Microbiol. 18:43-55 (1972); Koo et ál., Biotechnol Lett. 27:505-510 (2005)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>acr1</i>	50086359	YP_047869.1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
<i>acr1</i>	1684886	AAC45217	<i>Acinetobacter baylyi</i>
<i>acr1</i>	18857901	BAB85476.1	<i>Acinetobacter</i> sp., cepa M-1
<i>sucD</i>	172046062	P38947.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>sucD</i>	34540484	NP_904963.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>bphG</i>	425213	BAA03892.1	<i>Pseudomonas</i> sp
<i>adhE</i>	55818563	AAV66076.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

Un tipo de enzima adicional que convierte una acil-CoA en su aldehído correspondiente es la malonil-CoA reductasa que transforma malonil-CoA en semialdehído malónico. La malonil-CoA reductasa es una enzima fundamental en la fijación de carbono de carácter autotrófico a través del ciclo de 3-hidroxiisopropionato en bacterias arqueales termoacidófilas (Berg et ál., *supra*; Thauer R.K., Science 318:1732-1733 (2007)). La enzima utiliza NADPH como un cofactor y se ha caracterizado en *Metallosphaera* y *Sulfolobus* spp (Alber et ál., J.Bacteriol. 188:8551-8559 (2006); Hugler et ál., J.Bacteriol. 184:2404-2410 (2002)). La enzima es codificada por *Msed_0709* en *Metallosphaera sedula* (Alber et ál., *supra*; Berg et ál., *supra*). Un gen que codifica una malonil-CoA reductasa de *Sulfolobus tokodaii* se clonó y expresó de manera heteróloga en *E. coli* (Alber et ál., *supra*). También se ha demostrado que esta enzima cataliza la conversión de metilmalonil-CoA en su aldehído correspondiente (WO/2007/141208). Si bien la funcionalidad de aldehído deshidrogenasa de estas enzimas es similar a la deshidrogenasa funcional de *Chloroflexus aurantiacus*, hay poca similitud de secuencia. Ambas enzimas candidatas de malonil-CoA reductasa tienen una similitud de secuencia alta con respecto a la aspartato-semialdehído deshidrogenasa, una enzima que cataliza la reducción y desfosforilación simultánea de aspartil-4-fosfato a aspartato semialdehído. Se pueden encontrar candidatos génicos adicionales mediante la homología de secuencia con respecto a proteínas en otros organismos que incluyen *Sulfolobus solfataricus* y *Sulfolobus acidocaldarius* y se enumerarán más adelante. Incluso otro candidato para la aldehído deshidrogenasa de acilación de CoA es el gen *ald* de *Clostridium beijerinckii* (Toth et ál., Appl Environ Microbiol 65:4973-4980 (1999)). Se ha indicado que esta enzima reduce acetil-CoA y butiril-CoA a sus aldehídos correspondientes. Este gen es muy similar al *eutE* que codifica acetaldehído deshidrogenasa de *Salmonella typhimurium* y *E. coli* (Toth et ál., *supra*).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>Msed_0709</i>	146303492	YP_001190808.1	<i>Metallosphaera sedula</i>
<i>mcr</i>	15922498	NP_378167.1	<i>Sulfolobus tokodaii</i>
<i>asd-2</i>	15898958	NP_343563.1	<i>Sulfolobus solfataricus</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>Saci_2370</i>	70608071	YP_256941.1	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
<i>Ald</i>	49473535	AAT66436	<i>Clostridium beijerinckii</i>
<i>eutE</i>	687645	AAA80209	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>eutE</i>	2498347	P77445	<i>Escherichia coli</i>

1.3.1.a Oxidorreductasa que funciona en donantes CH-CH. Con respecto a la Figura 10, la etapa D hace referencia a la conversión de 5-carboxi-2-pentenoil-CoA en adipil-CoA por parte de la 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa. Con respecto a la Figura 11, la etapa D hace referencia a la conversión de 6-aminohex-2-enoil-CoA en 6-aminocaproil-CoA. Las enzimas enoil-CoA reductasas son enzimas adecuadas para cualquiera de estas transformaciones. Un ejemplo de enoil-CoA reductasa es el producto génico de *bcd* de *C. acetobutylicum* (Boynton et ál., J Bacteriol. 178:3015-3024 (1996); Atsumi et ál., Metab. Ing. 2008 10(6):305-311 (2008) (pub. electrónica el 14 de sep. de 2007), que cataliza naturalmente la reducción de crotonil-CoA a butiril-CoA. La actividad de esta enzima puede mejorarse mediante la expresión de *bcd* junto con la expresión de los genes *etfAB* de *C. acetobutylicum*, 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 la *E. gracilis* (Hoffmeister et ál., J. Biol. Chem. 280:4329-4338 (2005)). Una construcción derivada de esta secuencia luego de la remoción de su secuencia líder de direccionamiento mitocondrial se clonó en la *E. coli*, lo cual produjo una enzima activa (Hoffmeister et ál., *supra*). Esta estrategia es muy conocida por los expertos en la técnica de la expresión de genes eucariotas, particularmente aquellos con secuencias líderes que pueden dirigir el producto génico a un compartimento intracelular específico, en organismos procariotas. Un homólogo cercano de este gen, TDE0597, de la *Treponema denticola* procariota representa una tercera enoil-CoA reductasa que se ha clonado y expresado en la *E. coli* (Tucci et ál., FEBS Letters 581:1561-1566 (2007)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>bcd</i>	15895968	NP_349317.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>etfA</i>	15895966	NP_349315.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>etfB</i>	15895967	NP_349316.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
TER	62287512	Q5EU90.1	<i>Euglena gracilis</i>
TDE0597	42526113	NP_971211.1	<i>Treponema denticola</i>

La Etapa J de las Figuras 10 y 11 necesita una enzima 2-enoato reductasa. Se sabe que las 2-enoato reductasas (EC 1.3.1.31) catalizan la reducción dependiente de NAD(P)H de una amplia variedad de aldehídos y ácidos carboxílicos α , β -insaturados (Rohdich et ál., J.Biol.Chem. 276:5779-5787 (2001)). La 2-enoato reductasa es codificada por el *enr* en varias especies de *Clostridia* (Giesel et ál., Arch Microbiol 135:51-57 (1983)) que incluyen *C. tyrobutyricum* y *C. thermoaceticum* (que ahora se denomina *Moorella thermoaceticum*) (Rohdich et ál., *supra*). En la secuencia genómica publicada de *C. kluyveri*, se han indicado 9 secuencias de codificación para las enoato reductasas, de las cuales se ha caracterizado una (Seedorf et ál., Proc.Natl.Acad.Sci. EUA, 105:2128-2133 (2008)). Los genes *enr* de la *C. tyrobutyricum* y *C. thermoaceticum* se han clonado y secuenciado y muestran un 59 % de identidad entre sí. También se descubrió que el primero de estos genes tiene aproximadamente un 75 % de similitud con respecto al gen caracterizado en *C. kluyveri* (Giesel et ál., *supra*). Se ha indicado en función de estos resultados de secuencias que el *enr* es muy similar a la dienoil CoA reductasa en la *E. coli* (*fadH*) (Rohdich et ál., *supra*). El gen *enr* de *C. thermoaceticum* se ha expresado también en una forma enzimáticamente activa en la *E. coli* (Rohdich et ál., *supra*).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>fadH</i>	16130976	NP_417552.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>enr</i>	169405742	ACA54153.1	<i>Clostridium botulinum A3 str</i>
<i>enr</i>	2765041	CAA71086.1	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>
<i>enr</i>	3402834	CAA76083.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>enr</i>	83590886	YP_430895.1	<i>Moorella thermoacetica</i>

1.4.1.a Oxidorreductasa que funciona en aminoácidos. La Figura 10 ilustra dos aminaciones reductoras. Específicamente, la etapa P de la Figura 10 implica la conversión de adipato semialdehído en 6-aminocaproato y la etapa W de la Figura 10 implica la conversión de 6-aminocaproato semialdehído en hexametildiamina. Esta última transformación también es necesaria en la Figura 11, Etapa P.

La mayoría de las oxidorreductasas que funcionan en aminoácidos catalizan la desaminación oxidativa de alfa-aminoácidos con NAD⁺ o NADP⁺ como aceptor, aunque normalmente las reacciones son reversibles. Los ejemplos de oxidorreductasas que funcionan en aminoácidos incluyen la glutamato deshidrogenasa (de desaminación), codificada por el *gdhA*, la leucina deshidrogenasa (de desaminación), codificada por el *ldh*, y la aspartato deshidrogenasa (de desaminación), codificada por el *nadX*. El producto génico *gdhA* de la *Escherichia coli* (McPherson et ál., Nucleic.Acids Res. 11:5257-5266 (1983); Korber et ál., J.Mol.Biol. 234:1270-1273 (1993)), *gdh* de la *Thermotoga maritima* (Kort et ál., Extremophiles 1:52-60 (1997); Lebbink et ál., J.Mol.Biol. 280:287-296 (1998); Lebbink et ál., J.Mol.Biol. 289:357-369 (1999)) y *gdhA1* de la *Halobacterium salinarum* (Ingoldsby et ál., Gene. 349:237-244 (2005)) catalizan la interconversión reversible de glutamato en 2-oxoglutarato y amoniaco, al tiempo que favorecen a NADP(H), NAD(H) o ambos, respectivamente. El gen *ldh* de *Bacillus cereus* codifica la proteína LeuDH que tiene una amplia variedad de sustratos que incluyen leucina, isoleucina, valina y 2-aminobutanoato (Stoyan et ál., J.Biotechnol 54:77-80 (1997); Ansorge et ál., Biotechnol Bioeng. 68:557-562 (2000)). El gen *nadX* de la *Thermotoga maritima* que codifica la aspartato deshidrogenasa está involucrado en la biosíntesis de NAD (Yang et ál., J.Biol.Chem. 278:8804-8808 (2003)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>gdhA</i>	118547	P00370	<i>Escherichia coli</i>
<i>gdh</i>	6226595	P96110.4	<i>Thermotoga maritima</i>
<i>gdhA1</i>	15789827	NP_279651.1	<i>Halobacterium salinarum</i>
<i>ldh</i>	61222614	P0A393	<i>Bacillus cereus</i>
<i>nadX</i>	15644391	NP_229443.1	<i>Thermotoga maritima</i>

La lisina 6-deshidrogenasa (de desaminación), codificada por los genes *lysDH*, catalizan la desaminación oxidativa del grupo ε-amino de L-lisina para formar 2-aminoadipato-6-semialdehído, que a su vez se cicla de manera no enzimática para formar Δ¹-piperideina-6-carboxilato (Misono et ál., J.Bacteriol. 150:398-401 (1982)). Se pueden encontrar ejemplos de enzimas en *Geobacillus stearothermophilus* (Heydari et ál., Appl Environ.Microbiol 70:937-942 (2004)), *Agrobacterium tumefaciens* (Hashimoto et ál., J Biochem 106:76-80 (1989); Misono et ál., *supra*), y *Achromobacter denitrificans* (Ruldeekulthamrong et ál., BMB.Rep. 41:790-795 (2008)). Esas enzimas son candidatas particularmente buenas para convertir adipato semialdehído en 6-aminocaproato, dada la similitud estructural entre el adipato semialdehído y el 2-aminoadipato-6-semialdehído.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>lysDH</i>	13429872	BAB39707	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>lysDH</i>	15888285	NP_353966	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>lysDH</i>	74026644	AAZ94428	<i>Achromobacter denitrificans</i>

2.3.1.b Acil transferasa. Con respecto a la Figura 10, la etapa A involucra 3-oxoadipil-CoA tiolasa o, de manera equivalente, succinil CoA:acetil CoA acil transferasa (β -cetotiolasa). Los productos génicos codificados por *pcaF* en *Pseudomonas* cepa B13 (Kaschabek et ál., J. Bacteriol. 184:207-215 (2002)), *phaD* en *Pseudomonas putida* U (Olivera et ál., *supra*), *paaE* en *Pseudomonas fluorescens* ST (Di Gennaro et ál., *supra*) y *paaJ* de *E. coli* (Nogales et ál., *supra*) 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 síntesis de 3-oxoadipil-CoA. Por ejemplo, la cetotiolasa *phaA* de *R. eutropha* combina dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA (Sato et ál., J Biosci Bioeng 103:38-44 (2007)). De manera similar, se ha indicado que una β -ceto tiolasa (*bktB*) cataliza la condensación de acetil-CoA y propionil-CoA para formar β -cetovaleril-CoA (Slater et ál., J. Bacteriol. 180:1979-1987 (1998)) en *R. eutropha*. Además de la probabilidad de poseer actividad de 3-oxoadipil-CoA tiolasa, todas esas enzimas representan buenos candidatos para condensar 4-aminobutiril-CoA y acetil-CoA para formar 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA (etapa A, Figura 11) en sus formas naturales o una vez que se hayan modificado genéticamente de manera adecuada.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>paaJ</i>	16129358	NP_415915.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>pcaF</i>	17736947	AAL02407	<i>Pseudomonas knackmussii</i> (B13)
<i>phaD</i>	3253200	AAC24332.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaE</i>	106636097	ABF82237.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Las enzimas 2-amino-4-oxopentanoato (AKP) tiolasa o AKP tiolasa (AKPT) presentan candidatos adicionales para realizar la etapa A en las Figuras 10 y 11. La AKPT es una enzima dependiente de piridoxal fosfato que participa de la degradación de ornitina en *Clostridium sticklandii* Jeng et ál., Biochemistry 13:2898-2903 (1974); Kenkies et ál., Microbiology 145:819-826 (1999). Recientemente se identificó un conglomerado génico que codifica las subunidades alfa y beta de AKPT (*or-2* (*ortA*) y *or-3* (*ortB*)) y se caracterizaron las propiedades bioquímicas de la enzima (Fonknechten et al., J.Bacteriol. In Press (2009)). La enzima es capaz de funcionar en ambas direcciones y reacciona naturalmente con el isómero D de alanina. La AKPT de *Clostridium sticklandii* se ha caracterizado pero todavía no se ha publicado su secuencia proteica. Se encuentran enzimas con homología de secuencia alta en *Clostridium difficile*, *Alkaliphilus metalliredigenes* QYF, *Thermoanaerobacter* sp. X514 y *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 (Fonknechten et ál., *supra*).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>ortA</i> (α)	126698017	YP_001086914.1	<i>Clostridium difficile</i> 630
<i>ortB</i> (β)	126698018	YP_001086915.1	<i>Clostridium difficile</i> 630
<i>Amet_2368</i> (α)	150390132	YP_001320181.1	<i>Alkaliphilus metalliredigenes</i> QYF
<i>Amet_2369</i> (β)	150390133	YP_001320182.1	<i>Alkaliphilus metalliredigenes</i> QYF
<i>Teth514_1478</i> (α)	167040116	YP_001663101.1	<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514
<i>Teth514_1479</i> (β)	167040117	YP_001663102.1	<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>TTE1235</i> (α)	20807687	NP_622858.1	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4
<i>thrC</i> (β)	20807688	NP_622859.1	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4

2.6.1.a Aminotransferasa. La Etapa O de las Figuras 10 y 11 y la Etapa V de la Figura 10 necesitan transaminación de un 6-aldehído para formar una amina. Estas transformaciones pueden ser catalizadas por la gamma-aminobutirato transaminasa (GABA transaminasa). Una GABA transaminasa de *E. coli* es codificada por el *gabT* y transfiere un grupo amino de glutamato al aldehído del extremo del succinil semialdehído (Bartsch et ál., J. Bacteriol. 172:7035-7042 (1990)). El producto génico de *puuE* cataliza otra 4-aminobutirato transaminasa en la *E. coli* (Kurihara et ál., J.Biol.Chem. 280:4602-4608 (2005)). Se ha demostrado que las GABA transaminasas en *Mus musculus*, *Pseudomonas fluorescens* y *Sus scrofa* reaccionan con el ácido 6-aminocaproico (Cooper, Methods Enzymol. 113:80-82 (1985); Scott et ál., J. Biol. Chem. 234:932-936 (1959)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>gabT</i>	16130576	NP_417148.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>puuE</i>	16129263	NP_415818.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>abat</i>	37202121	NP_766549.2	<i>Mus musculus</i>
<i>gabT</i>	70733692	YP_257332.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>abat</i>	47523600	NP_999428.1	<i>Sus scrofa</i>

Otros candidatos enzimáticos incluyen putrescina aminotransferasas u otras diamina aminotransferasas. Esas enzimas se adaptan particularmente bien para llevar a cabo la conversión de 6-aminocaproato semialdehído en hexametildiamina. La putrescina aminotransferasa de *E. coli* es codificada por el gen *ygjG* y la enzima purificada también fue capaz de transaminar cadaverina y espermidina (Samsonova et ál., BMC Microbiol 3:2 (2003)). Además, se ha indicado la actividad de esta enzima sobre 1,7-diaminoheptano y con aminoaceptores que no son el 2-oxoglutarato (p. ej., piruvato, 2-oxobutanoato) (Samsonova et ál., *supra*; Kim, K.H., J Biol Chem 239:783-786 (1964)). Una putrescina aminotransferasa con una actividad más alta con piruvato como el aminoaceptor que el alfa-cetoglutarato es el gen *spuC* de la *Pseudomonas aeruginosa* (Lu et ál., J Bacteriol 184:3765-3773 (2002)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>ygjG</i>	145698310	NP_417544	<i>Escherichia coli</i>
<i>spuC</i>	9946143	AAG03688	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Incluso otras enzimas candidatas incluyen beta-alanina/alfa-cetoglutarato aminotransferasas que producen malonato semialdehído a partir de beta-alanina (WO08027742). También se demostró que el producto génico de SkPYD4 en la *Saccharomyces kluyveri* usa de manera preferencial beta-alanina como el donante de grupo amino (Andersen et ál., FEBS.J. 274:1804-1817 (2007)). El SkUGA1 codifica un homólogo de la GABA aminotransferasa de *Saccharomyces cerevisiae*, UGA1 (Ramos et ál., Eur.J.Biochem., 149:401-404 (1985)), mientras que el SkPYD4 codifica una enzima involucrada en la transaminación de β -alanina y GABA (Andersen et ál., *supra*). La 3-amino-2-metilpropionato transaminasa cataliza la transformación de metilmalonato semialdehído en 3-amino-2-metilpropionato. Esta enzima se ha caracterizado en *Rattus norvegicus* y *Sus scrofa* y es codificada por *Abat* (Tamaki et ál, Methods Enzymol, 324:376-389 (2000)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>SkyPYD4</i>	98626772	ABF58893.1	<i>Saccharomyces kluyveri</i>
<i>SkUGA1</i>	98626792	ABF58894.1	<i>Saccharomyces kluyveri</i>
<i>UGA1</i>	6321456	NP_011533.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Abat</i>	122065191	P50554.3	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Abat</i>	120968	P80147.2	<i>Sus scrofa</i>

2.8.3.a Coenzima-A transferasa. Las CoA transferasas catalizan reacciones reversibles que involucran la transferencia de un resto de CoA de una molécula a otra. Por ejemplo, la etapa E de la Figura 10 es catalizada por una 3-oxoadipil-CoA transferasa. En esta etapa, se forma 3-oxoadipato mediante la transferencia del grupo CoA de 3-oxoadipil-CoA a succinato, acetato u otro aceptor de CoA. La etapa E de la Figura 11 implica la transferencia de un resto de CoA de otra 3-oxoacil-CoA, 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA. Una enzima candidata para estas etapas es la enzima de dos unidades codificada por el *pcaI* y *pcaJ* en *Pseudomonas*, que se ha demostrado que tiene actividad de 3-oxoadipil-CoA/succinato transferasa (Kaschabek et ál., *supra*). Existen enzimas similares basadas en la homología en *Acinetobacter* sp. ADP1 (Kowalchuk et ál., Gene 146:23-30 (1994)) y *Streptomyces coelicolor*. Se encuentran ejemplos adicionales de succinil-CoA:3-oxoácido-CoA transferasas en *Helicobacter pylori* (Corthesy-Theulaz et ál., J.Biol.Chem. 272:25659-25667 (1997)) y *Bacillus subtilis* (Stols et ál., Protein.Expr.Purif. 53:396-403 (2007)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>pcaI</i>	24985644	AAN69545.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>pcaJ</i>	26990657	NP_746082.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>pcaI</i>	50084858	YP_046368.1	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1
<i>pcaJ</i>	141776	AAC37147.1	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1
<i>pcaI</i>	21224997	NP_630776.1	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>pcaJ</i>	21224996	NP_630775.1	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>HPAG1_0676</i>	108563101	YP_627417	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>HPAG1_0677</i>	108563102	YP_627418	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>ScoA</i>	16080950	NP_391778	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>ScoB</i>	16080949	NP_391777	<i>Bacillus subtilis</i>

Una 3-oxoacil-CoA transferasa que puede utilizar acetato como el aceptor de CoA es la acetoacetyl-CoA transferasa, codificada por los genes *atoA* (subunidad alfa) y *atoD* de *E. Coli* (subunidad beta) (Vanderwinkel et ál., Biochem.Biophys.Res Commun. 33:902-908 (1968); Korolev et ál., Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr. 58:2116-2121 (2002)). También se ha demostrado que esta enzima transfiere el resto de CoA a acetato de una variedad de sustratos de acil-CoA ramificados y lineales, que incluyen isobutirato (Matthies et ál., Appl Environ Microbiol 58:1435-1439 (1992)), valerato (Vanderwinkel et ál., *supra*) y butanoato (Vanderwinkel et ál., *supra*). Existen enzimas similares en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Duncan et ál., Appl Environ Microbiol 68:5186-5190 (2002)), *Clostridium acetobutylicum* (Cary et ál., Appl Environ Microbiol 56:1576-1583 (1990)) y *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kosaka et ál., Biosci.Biotechnol Biochem. 71:58-68 (2007)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>atoA</i>	2492994	P76459.1	<i>Escherichia coli</i> K12
<i>atoD</i>	2492990	P76458.1	<i>Escherichia coli</i> K12
<i>actA</i>	62391407	YP_226809.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032
<i>cg0592</i>	62389399	YP_224801.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032
<i>ctfA</i>	15004866	NP_149326.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>ctfB</i>	15004867	NP_149327.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>ctfA</i>	31075384	AAP42564.1	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>ctfB</i>	31075385	AAP42565.1	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>

Las enzimas anteriores también pueden presentar las actividades deseadas en adipil-CoA y adipato (Figura 10, etapa K) o 6-aminocaproato y 6-aminocaproil-CoA (Figura 10, etapa Q; Figura 2, etapa K). No obstante, otros ejemplos de candidatos de transferasa son catalizados por los productos génicos de *cat1*, *cat2*, y *cat3* de *Clostridium kluyveri* que se ha demostrado que presentan actividad de succinil-CoA, 4-hidroxibutiril-CoA y butiril-CoA transferasa, respectivamente (Seedorf et ál., *supra*; Sohling et ál., Eur.J Biochem. 212:121-127 (1993); Sohling et ál., J Bacteriol. 178:871-880 (1996)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>cat1</i>	729048	P38946.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>cat2</i>	172046066	P38942.2	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>cat3</i>	146349050	EDK35586.1	<i>Clostridium kluyveri</i>

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

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>gctA</i>	559392	CAA57199.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>gctB</i>	559393	CAA57200.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>

3.1.2.a Tioléster hidrolasa (específica de CoA). Varias acetil-CoA hidrolasas eucariotas tienen una amplia especificidad de sustratos y, por lo tanto, representan enzimas candidatas adecuadas para hidrolizar 3-oxoadipil-CoA, adipil-CoA, 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA o 6-aminocaproil-CoA (Etapas G y M de las Figuras 10 y 11). Por ejemplo, la enzima de *Rattus norvegicus* del cerebro (Robinson et ál., Biochem.Biophys.Res.Comm. 71:959-965 (1976)) puede reaccionar con butiril-CoA, hexanoil-CoA y malonil-CoA.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>acot12</i>	18543355	NP_570103.1	<i>Rattus norvegicus</i>

- 5 Otras enzimas hidrolasas incluyen 3-hidroxiisobutil-CoA hidrolasa que se ha descrito que cataliza de manera eficiente la conversión de 3-hidroxiisobutil-CoA en 3-hidroxiisobutirato durante la degradación de valina (Shimomura et ál., J Biol Chem. 269:14248-14253 (1994)). Los genes que codifican esta enzima incluyen el *hibch* de *Rattus norvegicus* (Shimomura et ál., *supra*; Shimomura et ál., Methods Enzymol. 324:229-240 (2000)) y *Homo sapiens* (Shimomura et ál., *supra*). Los genes candidatos por homología de secuencia incluyen el *hibch* de *Saccharomyces cerevisiae* y *BC_2292* de *Bacillus cereus*.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>hibch</i>	146324906	Q5XIE6.2	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>hibch</i>	146324905	Q6NVY1.2	<i>Homo sapiens</i>
<i>hibch</i>	2506374	P28817.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>BC_2292</i>	29895975	AP09256	<i>Bacillus cereus</i>

- 10 Incluso otra hidrolasa candidata es la ácido dicarboxílico tioesterasa humana, *acot8*, que presenta actividad sobre la glutaril-CoA, adipil-CoA, suberil-CoA, sebacil-CoA y dodecanodioil-CoA (Westin et ál., J.Biol.Chem. 280:38125-38132 (2005)) y el homólogo más cercano de *E. coli*, *eltesB*, que también puede hidrolizar una amplia variedad de CoA tiolésteres (Naggert et ál., J Biol Chem 266:11044-11050 (1991)). También se ha caracterizado una enzima similar en el hígado de ratas (Deana R., Biochem Int 26:767-773 (1992)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>tesB</i>	16128437	NP_414986	<i>Escherichia coli</i>
<i>acot8</i>	3191970	CAA15502	<i>Homo sapiens</i>
<i>acot8</i>	51036669	NP_570112	<i>Rattus norvegicus</i>

- 15 Otras posibles tioléster hidrolasas de la *E. coli* incluyen los productos génicos de *tesA* (Bonner et ál., J Biol Chem 247:3123-3133 (1972)), *ybgC* (Kuznetsova et ál., FEMS Microbiol Rev 29:263-279 (2005); Zhuang et ál., FEBS Lett 516:161-163 (2002)), *paal* (Song et ál., J Biol Chem 281:11028-11038 (2006)), y *ybdB* (Leduc et ál., J Bacteriol 189:7112-7126 (2007)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>tesA</i>	16128478	NP_415027	<i>Escherichia coli</i>
<i>ybgC</i>	16128711	NP_415264	<i>Escherichia coli</i>
<i>paal</i>	16129357	NP_415914	<i>Escherichia coli</i>
<i>ybdB</i>	16128580	NP_415129	<i>Escherichia coli</i>

- 20 6.3.1.a/6.3.2.a amida sintasas/péptido sintasas. La conversión directa de 6-aminocaproato en caprolactama (Etapa S, Figura 10; Etapa R, Figura 11) requiere la formación de un enlace peptídico intramolecular. Los ribosomas, que

ensamblan aminoácidos en proteínas durante la traducción, son los catalizadores formadores de enlaces peptídicos más abundantes en la naturaleza. Las sintetasas peptídicas no ribosómicas son catalizadores formadores de enlaces peptídicos que no involucran ARNm mensajero (Schwarzer et ál., Nat Prod.Rep. 20:275-287 (2003)). Otras enzimas capaces de formar enlaces peptídicos incluyen la acil-CoA sintetasa de *Pseudomonas chlororaphis* (Abe et ál., J Biol Chem 283:11312-11321 (2008)), la gamma-glutamylputrescina sintetasa de *E. coli* (Kurihara et ál., J Biol Chem 283:19981-19990 (2008)), y beta-lactama sintetasa de *Streptomyces clavuligerus* (Bachmann et ál., Proc Natl Acad Sci EUA 95:9082-9086 (1998); Bachmann et ál., Biochemistry 39:11187-11193 (2000); Miller et ál., Nat Struct.Biol 8:684-689 (2001); Miller et ál., Proc Natl Acad Sci EUA 99:14752-14757 (2002); Tahlan et ál., Antimicrob.Agents.Chemother. 48:930-939 (2004)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>acsA</i>	60650089	BAD90933	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
<i>puuA</i>	87081870	AAC74379	<i>Escherichia coli</i>
<i>bls</i>	41016784	Q9R8E3	<i>Streptomyces clavuligerus</i>

4.2.1.a Hidroliasa. La mayoría de las deshidratasas catalizan la eliminación α , β de agua. Esto implica la activación del α -hidrógeno mediante un grupo carbonilo, carboxilato o CoA-tiol éster aceptor de electrones y la remoción del grupo hidroxilo de la posición β . Las enzimas que presentan actividad en los sustratos con un grupo carboxilato aceptor de electrones son candidatos excelentes para deshidratar 3-hidroxiadipato (Figura 10, Etapa I) o 3-hidroxi-6-aminohexanoato (Figura 11, Etapa I).

Por ejemplo, las enzimas fumarasas catalizan de manera natural la deshidratación reversible de malato a fumarato. La *E. coli* tiene tres fumarasas: FumA, FumB y FumC que son reguladas por las condiciones de desarrollo. La FumB es sensible al oxígeno y solamente presenta actividad en condiciones anaerobias. La FumA es activa en condiciones microanaerobias y la FumC es la única enzima activa en el desarrollo aerobio (Tseng et ál., J Bacteriol 183:461-467 (2001); Woods et ál., Biochim Biophys Acta 954:14-26 (1988); Guest et ál., J Gen Microbiol 131:2971-2984 (1985)). Otros candidatos enzimáticos se encuentran en *Campylobacter jejuni* (Smith et ál., Int.J Biochem. Cell Biol 31:961-975 (1999)), *Thermus thermophilus* (Mizobata et ál., Arch.Biochem.Biophys. 355:49-55 (1998)) y *Rattus norvegicus* (Kobayashi et ál., J Biochem. 89:1923-1931 (1981)). Las enzimas similares con una homología de secuencia alta incluyen la fum1 de *Arabidopsis thaliana* y fumC de *Corynebacterium glutamicum*. La fumarasa MmcBC de *Pelotomaculum thermopropionicum* es otra clase de fumarasa con dos subunidades (Shimoyama et ál., FEMS Microbiol Lett 270:207-213 (2007)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>fumA</i>	81175318	P0AC33	<i>Escherichia coli</i>
<i>fumB</i>	33112655	P14407	<i>Escherichia coli</i>
<i>fumC</i>	120601	P05042	<i>Escherichia coli</i>
<i>fumC</i>	9789756	069294	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>fumC</i>	3062847	BAA25700	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>fumH</i>	120605	P14408	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>fum1</i>	39931311	P93033	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>fumC</i>	39931596	Q8NRN8	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>MmcB</i>	147677691	YP_001211906	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>
<i>MmcC</i>	147677692	YP_001211907	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>

Dos deshidratasas candidatas adicionales son la 2-(hidroximetil)glutarato deshidratasa y dimetilmaleato hidratasa, enzimas estudiadas por su función en el catabolismo de niconitinato en *Eubacterium barkeri* (anteriormente *Clostridium barkeri*) (Alhapel et ál., Proc Natl Acad Sci EUA 103:12341-6 (2006)). La 2-(hidroximetil)glutarato deshidratasa es una enzima que contiene [4Fe-4S] que deshidrata 2-(hidroximetil)glutarato para formar 2-metilenoglutarato. Esta enzima es codificada por el *hmd* en *Eubacterium barkeri* (Alhapel et ál., *supra*). Se encuentran enzimas similares con una homología de secuencia alta en *Bacteroides capillosus*, *Anaerotruncus colihominis* y *Natranaerobius thermophilus*. Estas enzimas son homólogas a las subunidades alfa y beta de serina deshidratasas bacterianas que contienen [4Fe-4S] (p. ej., enzimas de *E. coli* codificadas por el *tdcG*, *sdhB* y *sdaA*).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>hmd</i>	86278275	ABC88407.1	<i>Eubacterium barkeri</i>
<i>BACCAP_02294</i>	154498305	ZP_02036683.1	<i>Bacteroides capillosus</i>
<i>ANACOL_02527</i>	167771169	ZP_02443222.1	<i>Anaerotruncus colihominis</i> DSM 17241
<i>NtherDRAFT_2368</i>	169192667	ZP_02852366.1	<i>Natranaerobius thermophilus</i> JW/NM-WN-LF

La dimetilmaleato hidratasa (EC 4.2.1.85) es una enzima sensible al oxígeno y dependiente de Fe²⁺ reversible en la familia de aconitasas que hidrata dimetilmaleato para formar (2R,3S)-2,3-dimetilmalato. Esta enzima es codificada por el *dmdAB* en *Eubacterium barkeri* (Alhapel et ál., *supra*; Kollmann-Koch et ál., Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem. 365:847-857 (1984)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>dmdA</i>	86278276	ABC88408	<i>Eubacterium barkeri</i>
<i>dmdB</i>	86278277	ABC88409.1	<i>Eubacterium barkeri</i>

Un candidato enzimático adicional es la 2-metilmalato deshidratasa, también denominada «citramalato hidrolasa», una hidrolasa reversible que cataliza la eliminación alfa, beta de agua de citramalato para formar mesaconato. Esta enzima se ha purificado y caracterizado en *Clostridium tetanomorphum* (Wang et ál., J Biol.Chem. 244:2516-2526 (1969)). La actividad de esta enzima también se ha detectado en varias bacterias en los géneros *Citrobacter* y *Morganella* en el contexto de la vía de degradación de glutamato VI (Kato et ál., Arch.Microbiol 168:457-463 (1997)). Hasta ahora, no se han identificado genes que codifiquen esta enzima en ningún organismo.

Las enzimas que presentan actividad en sustratos con un grupo CoA-tiol éster aceptor de electrones adyacente al α -hidrógeno son candidatas excelentes para deshidratar 3-hidroxiadipil-CoA (Figura 10, Etapa C) o 3-hidroxi-6-aminohexanoil-CoA (Figura 11, Etapa C). Se cree que las enoil-CoA hidratasas, *phaA* y *phaB*, de *P. putida* llevan a cabo la hidroxilación de enlaces dobles durante el catabolismo de fenilacetato (Olivera et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 95:6419-6424 (1998)). El *paaA* y *paaB* de *P.fluorescens* catalizan transformaciones análogas (Olivera et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 95:6419-6424 (1998)). Por último, se ha demostrado que una cantidad de genes de *Escherichia coli* muestran funcionalidad de enoil-CoA hidratasa, lo cual incluye *maoC* (Park et ál., J. Bacteriol. 185:5391-5397 (2003)), *paaF* (Ismail et ál., *supra*; Park et ál., Appl.Biochem.Biotechnol 113-116:335-346 (2004); Park et ál., Biotechnol Bioeng 86:681-686 (2004)) y *paaG* (Ismail et ál., *supra*; Park et ál., Appl.Biochem.Biotechnol 113-116:335-346 (2004); Park et ál., Biotechnol Bioeng 86:681-686 (2004)). Las enzimas crotonasas son candidatas adicionales para deshidratar las moléculas de 3-hidroxiacil-CoA que se ilustran en las Figuras 10 y 11. Estas enzimas son necesarias para la formación de n-butanol en algunos organismos, particularmente la especie *Clostridia*, y también comprenden una etapa del ciclo 3-hidroxiopropionato/4-hidroxiobutirato en las arqueas termoacidófilas de los géneros *Sulfolobus*, *Acidianus* y *Metallosphaera*. Se pueden encontrar ejemplos de genes que codifican enzimas crotonasas en *C. acetobutylicum* (Boynton et ál., *supra*), *C. kluyveri* (Hillmer et ál., FEBS Lett. 21:351-354 (1972)) y *Metallosphaera sedula* (Berg et ál., *supra*) aunque la secuencia de este último gen no es conocida. Las enoil-CoA hidratasas, que están involucradas en la betaoxidación de ácidos grasos y/o el metabolismo de diversos aminoácidos, también pueden catalizar la hidratación de crotonil-CoA para formar 3-hidroxiobutiril-CoA (Roberts et ál., Arch.Microbiol 117:99-108 (1978); Agnihotri et ál., Bioorg.Med.Chem. 11:9-20 (2003); Conrad et ál., J Bacteriol. 118:103-111 (1974)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>paaA</i>	26990002	NP_745427.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>paaB</i>	26990001	NP_745426.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>phaA</i>	106636093	ABF82233.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>phaB</i>	106636094	ABF82234.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>maoC</i>	16129348	NP_415905.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaF</i>	16129354	NP_415911.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaG</i>	16129355	NP_415912.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>crt</i>	15895969	NP_349318.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>crt1</i>	153953091	YP_001393856	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555

6.2.1.a Ácido-tiol ligasa. Las Etapas F, L y R de la Figura 10 y las Etapas F y L de la Figura 11 necesitan la funcionalidad de ácido-tiol ligasa o sintetasa (los términos «ligasa», «sintetasa» y «sintasa» se usan en la presente memoria de manera intercambiable y hacen referencia a la misma clase de enzimas). Los ejemplos de genes que codifican enzimas que probablemente llevan a cabo estas transformaciones incluyen los genes *sucCD* de la *E. coli* que forman de manera natural un complejo de succinil-CoA sintetasa. Este complejo enzimático cataliza de manera natural la formación de succinil-CoA a partir de succinato con el consumo concomitante de ATP, una reacción que es reversible *in vivo* (Buck et ál., Biochem. 24:6245-6252 (1985)). Dada la similitud estructural entre succinato y adipato, es decir, dado que ambos son ácidos dicarboxílicos de cadena recta, es razonable esperar cierta actividad de la enzima *sucCD* sobre adipil-CoA.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>sucC</i>	16128703	NP_415256.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>sucD</i>	1786949	AAC73823.1	<i>Escherichia coli</i>

Otros ejemplos de CoA-ligasas incluyen la dicarboxilato-CoA ligasa de ratas para la cual no se ha caracterizado todavía la secuencia (Vamecq et ál., Biochemical Journal 230:683-693 (1985)), cualquiera de las dos fenilacetato-CoA ligasas caracterizadas de *P. chrysogenum* (Lamas-Maceiras et ál., Biochem. J. 395:147-155 (2005); Wang et ál., Biochem Biophys Res Commun 360(2):453-458 (2007)), la fenilacetato-CoA ligasa de *Pseudomonas putida* (Martínez-Blanco et ál., J. Biol. Chem. 265:7084-7090 (1990)), y la 6-carboxihexanoato-CoA ligasa de *Bacillus subtilis* (Bower et ál., J. Bacteriol. 178(14):4122-4130 (1996)). Otras enzimas candidatas son las acetoacetil-CoA sintetasas de *Mus musculus* (Hasegawa et ál., Biochim Biophys Acta 1779:414-419 (2008)) y *Homo sapiens* (Ohgami et ál., Biochem Pharmacol 65:989-994 (2003)) que catalizan de manera natural la conversión dependiente de ATP del acetoacetato en acetoacetil-CoA.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>phI</i>	77019264	CAJ15517.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>phIB</i>	152002983	ABS19624.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>paaF</i>	22711873	AAC24333.2	<i>Pseudomonas putida</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>bioW</i>	50812281	NP_390902.2	<i>Bacillus subtilis</i>
AACS	21313520	NP_084486.1	<i>Mus musculus</i>
AACS	31982927	NP_076417.2	<i>Homo sapiens</i>

- 5 La acetil-CoA sintetasa formadora de ADP (ACD, EC 6.2.1.13) es otra enzima candidata que acopla la conversión de ésteres de acil-CoA en sus correspondientes ácidos a la síntesis simultánea de ATP. Se han descrito varias enzimas con especificidades de sustratos amplias en la bibliografía. Se ha demostrado que la ACD I de *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por AF1211, funciona en una variedad de sustratos de cadena lineal y ramificada que incluyen acetil-CoA, propionil-CoA, butiril-CoA, acetato, propionato, butirato, isobutirato, isovalerato, succinato, fumarato, fenilacetato, indolacetato (Musfeldt et ál., J Bacteriol 184:636-644 (2002)). La enzima de *Haloarcula marismortui* (mencionada como una succinil-CoA sintetasa) acepta propionato, butirato y ácidos de cadena ramificada (isovalerato e isobutirato) como sustratos y se demostró que funciona en la dirección directa e inversa (Brasen et ál., Arch Microbiol 182:277-287 (2004)). La ACD codificada por PAE3250 de la crenarquea hipertermofílica *Pyrobaculum aerophilum* mostró la variedad de sustrato más amplia de todas las ACD caracterizadas, y reaccionó con acetil-CoA, isobutiril-CoA (sustrato preferido) y fenilacetil-CoA (Brasen et ál., *supra*). Todas las enzimas de *A. fulgidus*, *H. marismortui* y *P. aerophilum* se han clonado, expresado funcionalmente y caracterizado en *E. coli* (Musfeldt et ál., *supra*; Brasenet ál., *supra*).

15

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>AF1211</i>	11498810	NP_070039.1	<i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 4304
<i>scs</i>	55377722	YP_135572.1	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049
<i>PAE3250</i>	18313937	NP_560604.1	<i>Pyrobaculum aerophilum</i> str. IM2

- 20 Incluso otra opción es emplear un conjunto de enzimas con actividad de ligasa o sintetasa neta. Por ejemplo, las enzimas fosfotransadipilasa y adipato cinasa son catalizadas por los productos génicos de *buk1*, *buk2* y *ptb* de *C. acetobutylicum* (Walter et ál., Gene 134:107-111 (1993); Huang et ál., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2:33-38 (2000)). 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 *buk* con la generación concomitante de ATP.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>ptb</i>	15896327	NP_349676	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>buk1</i>	15896326	NP_349675	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>buk2</i>	20137415	Q97II1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>

- 25 No se necesitan enzimas - ciclación espontánea. La 6-aminocaproil-CoA se ciclará espontáneamente para formar caprolactama, lo cual elimina la necesidad de una enzima exclusiva para esta etapa. Se observa una ciclación espontánea similar con 4-aminobutiril-CoA que forma pirrolidinona (Ohsugi et ál., J Biol Chem 256:7642-7651 (1981)).

Ejemplo XIII

Preparación de un organismo microbiano productor de ácido 6-aminocaproico con una vía para convertir acetil-CoA

y 4-aminobutiril-CoA en ácido 6-aminocaproico

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir ácido 6-aminocaproico a partir de acetil-CoA y 4-aminobutiril-CoA.

La *Escherichia coli* se usa como un organismo objetivo para modificar genéticamente la vía de ácido 6-aminocaproico que se muestra en la Figura 11 que parte de acetil-CoA y 4-aminobutiril-CoA. La *E. coli* proporciona un buen hospedador para generar un microorganismo de origen no natural capaz de producir ácido 6-aminocaproico. La *E. coli* es pasible de manipulaciones genéticas y se sabe que es capaz de producir diversos productos, tales como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, de manera eficaz en condiciones anaerobias o microaerobias.

Para generar una cepa de *E. coli* modificada genéticamente para producir ácido 6-aminocaproico, se expresan ácidos nucleicos que codifican las enzimas requeridas en *E. coli* mediante el uso de técnicas de biología molecular muy conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook, *supra*, 2001; Ausubel *supra*, 1999). En particular, los genes *paaJ* (NP_415915.1), *paaH* (NP_415913.1) y *maoC* (NP_415905.1) que codifican las actividades de 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA tiolasa, 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA reductasa, 3-hidroxi-6-aminohexanoil-CoA deshidratasa, respectivamente, se clonan en el vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con el promotor PA1/lacO. Además, los genes *bcd* (NP_349317.1), *ettAB* (NP_349315.1 y NP_349316.1) y *acot8* (CAA15502) que codifican actividades de 6-aminohex-2-enol-CoA reductasa y 6-aminocaproil-CoA hidrolasa se clonan en el vector pZA33 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con el promotor PA1/lacO. Por último, los genes *sucD* (NP_904963.1), *gabT* (NP_417148.1) y *cat2* (P38942.2) que codifican las actividades de succinil-CoA reductasa (formadora de aldehído), GABA transaminasa y 4-aminobutiril-CoA/acil-CoA transferasa se clonan en un tercer plásmido compatible, pZS23, con el promotor PA1/lacO, para aumentar la disponibilidad de 4-aminobutiril-CoA. El pZS23 se obtiene mediante el remplazo del módulo de resistencia a la ampicilina del vector pZS13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con un módulo de resistencia a la canamicina mediante técnicas de biología molecular muy conocidas. Los tres conjuntos de plásmidos se transforman en la *E. coli*, cepa MG1655, para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la síntesis de ácido 6-aminocaproico.

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

Las cepas microbianas modificadas genéticamente para que tengan una vía de síntesis de ácido 6-aminocaproico funcional se aumentan de manera adicional mediante optimización para la utilización eficiente de la vía. En resumen, la cepa modificada genéticamente se evalúa para determinar si se expresa cualquiera de los genes exógenos en un nivel de limitación de la tasa. La expresión aumenta para cualquier enzima expresada en niveles bajos que pueda limitar el flujo a través de la vía mediante, por ejemplo, la introducción de cantidades de copias de genes adicionales.

Para generar mejores productores, se utiliza el modelado metabólico para optimizar las condiciones de cultivo. También se usa el modelado para diseñar inactivaciones génicas que optimicen de manera adicional la utilización de la vía (véase, por ejemplo, las publicaciones de patentes de EE. UU. 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 EE. UU. n.º 7,127,379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos sobre el desarrollo celular del cambio del metabolismo hacia una producción más eficiente de ácido 6-aminocaproico. Un método de modelado es la estrategia de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard et ál., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar inactivaciones de genes que de manera colectiva tengan como resultado una mejor producción de ácido 6-aminocaproico. También se puede usar la evolución adaptativa para generar mejores productores de, por ejemplo, los productos intermedios acetil-CoA y succinil-CoA del producto de ácido 6-aminocaproico. La evolución adaptativa se realiza para mejorar las características de desarrollo y producción (Fong y Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et ál., *Science* 314:1565-1568 (2006)). En función de los resultados, se pueden aplicar rondas sucesivas de modelado, modificación genética y evolución adaptativa al productor de ácido 6-aminocaproico para aumentar de manera adicional la producción.

Para la producción a gran escala de ácido 6-aminocaproico, el organismo anterior se cultiva en un fermentador mediante el uso de un medio conocido en la técnica para respaldar el desarrollo del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan por lotes, por lotes alimentados o de manera continua. Las condiciones anaerobias se mantienen al rociar en primer lugar el medio con nitrógeno y luego sellar el recipiente de cultivo, por ejemplo, los matraces pueden sellarse con un tabique y una tapa con sello. También se pueden utilizar condiciones microaerobias mediante el suministro de un pequeño orificio en el tabique para una ventilación limitada. El pH del medio se mantiene en un pH de alrededor de 7 mediante la adición de un ácido, tal como H₂SO₄. La tasa de

desarrollo se determina mediante la medición de la densidad óptica mediante el uso de un espectrofotómetro (600 nm) y la tasa de absorción de glucosa mediante la supervisión de la eliminación de fuentes de carbono con el transcurso del tiempo. Los subproductos tales como alcoholes no convenientes, ácidos orgánicos y glucosa residual pueden cuantificarse mediante HPLC (Shimadzu, Columbia MD), por ejemplo, mediante el uso de una serie Aminex® de columnas de HPLC (por ejemplo, la serie HPX-87) (BioRad, Hercules, CA), mediante el uso de un detector del índice de refracción para la glucosa y los alcoholes y un detector UV para los ácidos orgánicos (Lin et ál., Biotechnol. Bioeng. 775-779 (2005)).

Ejemplo XIV

Preparación de un organismo microbiano productor de ácido 6-aminocaproico con una vía para convertir acetil-CoA y 4-aminobutiril-CoA en ácido 6-aminocaproico

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir ácido 6-aminocaproico a partir de acetil-CoA y 4-aminobutiril-CoA.

La *Escherichia coli* se usa como un organismo objetivo para modificar genéticamente la vía de ácido 6-aminocaproico que se muestra en la Figura 11 que parte de acetil-CoA y 4-aminobutiril-CoA. La *E. coli* proporciona un buen hospedador para generar un microorganismo de origen no natural capaz de producir ácido 6-aminocaproico. La *E. coli* es pasible de manipulaciones genéticas y se sabe que es capaz de producir diversos productos, tales como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, de manera eficaz en condiciones anaerobias o microaerobias.

Para generar una cepa de *E. coli* modificada genéticamente para producir ácido 6-aminocaproico, se expresan ácidos nucleicos que codifican las enzimas requeridas en *E. coli* mediante el uso de técnicas de biología molecular muy conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook, *supra*, 2001; Ausubel *supra*, 1999). En particular, los genes *paaJ* (NP_415915.1), *pcaIJ* (AAN69545.1 y NP_746082.1) y *bdh* (AAA58352.1) que codifican las actividades de 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA tiolasa, 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA/acil-CoA transferasa, actividades de 3-oxo-6-aminohexanoato reductasa, respectivamente, se clonan en el vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con el promotor PA1/lacO. Además, los genes *enr* (CAA76083.1) y *hmd* (ABC88407.1) que codifican actividades de 6-aminohex-2-enoato reductasa y 3-hidroxi-6-aminohexanoato deshidratasa se clonan en el vector pZA33 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con el promotor PA1/lacO. Por último, los genes *sucD* (NP_904963.1), *gabT* (NP_417148.1) y *cat2* (P38942.2) que codifican las actividades de succinil-CoA reductasa (formadora de aldehído), GABA transaminasa y 4-aminobutiril-CoA/acil-CoA transferasa se clonan en un tercer plásmido compatible, pZS23, con el promotor PA1/lacO, para aumentar la disponibilidad de 4-aminobutiril-CoA. El pZS23 se obtiene mediante el remplazo del módulo de resistencia a la ampicilina del vector pZS13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con un módulo de resistencia a la canamicina mediante técnicas de biología molecular muy conocidas. Los tres conjuntos de plásmidos se transforman en la *E. coli*, cepa MG1655, para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la síntesis de ácido 6-aminocaproico.

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

Las cepas microbianas modificadas genéticamente para que tengan una vía de síntesis de ácido 6-aminocaproico funcional se aumentan de manera adicional mediante optimización para la utilización eficiente de la vía. En resumen, la cepa modificada genéticamente se evalúa para determinar si se expresa cualquiera de los genes exógenos en un nivel de limitación de la tasa. La expresión aumenta para cualquier enzima expresada en niveles bajos que pueda limitar el flujo a través de la vía mediante, por ejemplo, la introducción de cantidades de copias de genes adicionales.

Para generar mejores productores, se utiliza el modelado metabólico para optimizar las condiciones de cultivo. También se usa el modelado para diseñar inactivaciones génicas que optimicen de manera adicional la utilización de la vía (véase, por ejemplo, las publicaciones de patentes de EE. UU. 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 EE. UU. n.º 7,127,379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos sobre el desarrollo celular del cambio del metabolismo hacia una producción más eficiente de ácido 6-aminocaproico. Un método de modelado es la estrategia de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard et ál., Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar inactivaciones de genes que de manera colectiva tengan como resultado una mejor producción de ácido 6-aminocaproico. También se puede usar la evolución adaptativa para generar mejores productores de, por ejemplo, los productos intermedios acetil-CoA y succinil-CoA del producto de ácido 6-aminocaproico. La evolución adaptativa se realiza para mejorar las características de desarrollo y producción

(Fong y Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058 (2004); Alper et ál., Science 314:1565-1568 (2006)). En función de los resultados, se pueden aplicar rondas sucesivas de modelado, modificación genética y evolución adaptativa al productor de ácido 6-aminocaproico para aumentar de manera adicional la producción.

Para la producción a gran escala de ácido 6-aminocaproico, el organismo anterior se cultiva en un fermentador mediante el uso de un medio conocido en la técnica para respaldar el desarrollo del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan por lotes, por lotes alimentados o de manera continua. Las condiciones anaerobias se mantienen al rociar en primer lugar el medio con nitrógeno y luego sellar el recipiente de cultivo, por ejemplo, los matraces pueden sellarse con un tabique y una tapa con sello. También se pueden utilizar condiciones microaerobias mediante el suministro de un pequeño orificio en el tabique para una ventilación limitada. El pH del medio se mantiene en un pH de alrededor de 7 mediante la adición de un ácido, tal como H₂SO₄. La tasa de desarrollo se determina mediante la medición de la densidad óptica mediante el uso de un espectrofotómetro (600 nm) y la tasa de absorción de glucosa mediante la supervisión de la eliminación de fuentes de carbono con el transcurso del tiempo. Los subproductos tales como alcoholes no convenientes, ácidos orgánicos y glucosa residual pueden cuantificarse mediante HPLC (Shimadzu, Columbia MD), por ejemplo, mediante el uso de una serie Aminex® de columnas de HPLC (por ejemplo, la serie HPX-87) (BioRad, Hercules, CA), mediante el uso de un detector del índice de refracción para la glucosa y los alcoholes y un detector UV para los ácidos orgánicos (Lin et ál., Biotechnol. Bioeng. 775-779 (2005)).

Ejemplo XV

Preparación de un organismo microbiano productor de caprolactama con una vía para convertir acetil-CoA y succinil-CoA en ácido 6-aminocaproico

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir caprolactama a partir de acetil-CoA y succinil-CoA.

La *Escherichia coli* se usa como un organismo objetivo para modificar genéticamente la vía de caprolactama que se muestra en la Figura 10 que parte de acetil-CoA y succinil-CoA. La *E. coli* proporciona un buen hospedador para generar un microorganismo de origen no natural capaz de producir caprolactama. La *E. coli* es pasible de manipulaciones genéticas y se sabe que es capaz de producir diversos productos, tales como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, de manera eficaz en condiciones anaerobias o microaerobias.

Para generar una cepa de *E. coli* modificada genéticamente para producir caprolactama, se expresan ácidos nucleicos que codifican las enzimas requeridas en *E. coli* mediante el uso de técnicas de biología molecular muy conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook, *supra*, 2001; Ausubel *supra*, 1999). En particular, los genes *paaJ* (NP_415915.1), *paaH* (NP_415913.1) y *maoC* (NP_415905.1) que codifican las actividades de 3-oxoadipil-CoA tiolasa, 3-oxoadipil-CoA reductasa y 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, respectivamente, se clonan en el vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con el promotor PA1/lacO. Además, los genes *bcd* (NP_349317.1) y *etfAB* (NP_349315.1 y NP_349316.1) que codifican la actividad de 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa se clonan en el vector pZA33 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con el promotor PA1/lacO. Por último, los genes *acr1* (YP_047869.1), *gabT* (NP_417148.1) y *bioW* (NP_390902.2) que codifican las actividades de adipil-CoA reductasa (formadora de aldehído), ácido 6-aminocaproico transaminasa y 6-aminocaproil-CoA sintasa se clonan en un tercer plásmido compatible, pZS23, con el promotor PA1/lacO. El pZS23 se obtiene mediante el remplazo del módulo de resistencia a la ampicilina del vector pZS13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con un módulo de resistencia a la canamicina mediante técnicas de biología molecular muy conocidas. Los tres conjuntos de plásmidos se transforman en la *E. coli*, cepa MG1655, para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la síntesis de caprolactama.

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

Las cepas microbianas modificadas genéticamente para que tengan una vía de síntesis de caprolactama funcional se aumentan de manera adicional mediante optimización para la utilización eficiente de la vía. En resumen, la cepa modificada genéticamente se evalúa para determinar si se expresa cualquiera de los genes exógenos en un nivel de limitación de la tasa. La expresión aumenta para cualquier enzima expresada en niveles bajos que pueda limitar el flujo a través de la vía mediante, por ejemplo, la introducción de cantidades de copias de genes adicionales.

Para generar mejores productores, se utiliza el modelado metabólico para optimizar las condiciones de cultivo. También se usa el modelado para diseñar inactivaciones génicas que optimicen de manera adicional la utilización de la vía (véase, por ejemplo, las publicaciones de patentes de EE. UU. 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 EE. UU. n.º 7,127,379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos sobre el desarrollo celular del cambio del metabolismo hacia una producción más eficiente de caprolactama. Un método de modelado es la estrategia de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard et ál., Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar inactivaciones de genes que de manera colectiva tengan como resultado una mejor producción de caprolactama. También se puede usar la evolución adaptativa para generar mejores productores de, por ejemplo, los productos intermedios acetil-CoA y succinil-CoA del producto caprolactama. La evolución adaptativa se realiza para mejorar las características de desarrollo y producción (Fong y Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058 (2004); Alper et ál., Science 314:1565-1568 (2006)). En función de los resultados, se pueden aplicar rondas sucesivas de modelado, modificación genética y evolución adaptativa al productor de caprolactama para aumentar de manera adicional la producción.

Para la producción a gran escala de caprolactama, el organismo anterior se cultiva en un fermentador mediante el uso de un medio conocido en la técnica para respaldar el desarrollo del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan por lotes, por lotes alimentados o de manera continua. Las condiciones anaerobias se mantienen al rociar en primer lugar el medio con nitrógeno y luego sellar el recipiente de cultivo, por ejemplo, los matraces pueden sellarse con un tabique y una tapa con sello. También se pueden utilizar condiciones microaerobias mediante el suministro de un pequeño orificio en el tabique para una ventilación limitada. El pH del medio se mantiene en un pH de alrededor de 7 mediante la adición de un ácido, tal como H₂SO₄. La tasa de desarrollo se determina mediante la medición de la densidad óptica mediante el uso de un espectrofotómetro (600 nm) y la tasa de absorción de glucosa mediante la supervisión de la eliminación de fuentes de carbono con el transcurso del tiempo. Los subproductos tales como alcoholes no convenientes, ácidos orgánicos y glucosa residual pueden cuantificarse mediante HPLC (Shimadzu, Columbia MD), por ejemplo, mediante el uso de una serie Aminex® de columnas de HPLC (por ejemplo, la serie HPX-87) (BioRad, Hercules, CA), mediante el uso de un detector del índice de refracción para la glucosa y los alcoholes y un detector UV para los ácidos orgánicos (Lin et ál., Biotechnol. Bioeng. 775-779 (2005)).

Ejemplo XVI

Preparación de un organismo microbiano productor de hexametilendiamina con una vía para convertir acetil-CoA y succinil-CoA en ácido 6-aminocaproico

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir hexametilendiamina a partir de acetil-CoA y succinil-CoA.

La *Escherichia coli* se usa como un organismo objetivo para modificar genéticamente la vía de hexametilendiamina que se muestra en la Figura 10 que parte de acetil-CoA y succinil-CoA. La *E. coli* proporciona un buen hospedador para generar un microorganismo de origen no natural capaz de producir hexametilendiamina. La *E. coli* es pasible de manipulaciones genéticas y se sabe que es capaz de producir diversos productos, tales como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, de manera eficaz en condiciones anaerobias o microaerobias.

Para generar una cepa de *E. coli* modificada genéticamente para producir hexametilendiamina, se expresan ácidos nucleicos que codifican las enzimas requeridas en *E. coli* mediante el uso de técnicas de biología molecular muy conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook, *supra*, 2001; Ausubel *supra*, 1999). En particular, los genes *paaJ* (NP_415915.1), *paaH* (NP_415913.1) y *maoC* (NP_415905.1) que codifican las actividades de 3-oxoadipil-CoA tiolasa, 3-oxoadipil-CoA reductasa y 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa, respectivamente, se clonan en el vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con el promotor PA1/lacO. Además, los genes *bcd* (NP_349317.1) y *ettAB* (NP_349315.1 y NP_349316.1) que codifican la actividad de 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa se clonan en el vector pZA33 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con el promotor PA1/lacO. Por último, los genes *acr1* (YP_047869.1), *gabT* (NP_417148.1), *bioW* (NP_390902.2) y *ygjG* (NP_417544) que codifican las actividades de adipil-CoA reductasa (formadora de aldehído), 6-aminocaproil-CoA reductasa (formadora de aldehído), ácido 6-aminocaproico transaminasa, 6-aminocaproil-CoA sintasa y hexametilendiamina transaminasa se clonan en un tercer plásmido compatible, pZS23, con el promotor PA1/lacO. El pZS23 se obtiene mediante el remplazo del módulo de resistencia a la ampicilina del vector pZS13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con un módulo de resistencia a la canamicina mediante técnicas de biología molecular muy conocidas. Los tres conjuntos de plásmidos se transforman en la *E. coli*, cepa MG1655, para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la síntesis de hexametilendiamina.

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

Las cepas microbianas modificadas genéticamente para que tengan una vía de síntesis de hexametildiamina funcional se aumentan de manera adicional mediante optimización para la utilización eficiente de la vía. En resumen, la cepa modificada genéticamente se evalúa para determinar si se expresa cualquiera de los genes exógenos en un nivel de limitación de la tasa. La expresión aumenta para cualquier enzima expresada en niveles bajos que pueda limitar el flujo a través de la vía mediante, por ejemplo, la introducción de cantidades de copias de genes adicionales.

Para generar mejores productores, se utiliza el modelado metabólico para optimizar las condiciones de cultivo. También se usa el modelado para diseñar inactivaciones génicas que optimicen de manera adicional la utilización de la vía (véase, por ejemplo, las publicaciones de patentes de EE. UU. 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 EE. UU. n.º 7,127,379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos sobre el desarrollo celular del cambio del metabolismo hacia una producción más eficiente de hexametildiamina. Un método de modelado es la estrategia de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard et ál., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar inactivaciones de genes que de manera colectiva tengan como resultado una mejor producción de hexametildiamina. También se puede usar la evolución adaptativa para generar mejores productores de, por ejemplo, los productos intermedios acetyl-CoA y succinyl-CoA del producto hexametildiamina. La evolución adaptativa se realiza para mejorar las características de desarrollo y producción (Fong y Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et ál., *Science* 314:1565-1568 (2006)). En función de los resultados, se pueden aplicar rondas sucesivas de modelado, modificación genética y evolución adaptativa al productor de hexametildiamina para aumentar de manera adicional la producción.

Para la producción a gran escala de hexametildiamina, el organismo anterior se cultiva en un fermentador mediante el uso de un medio conocido en la técnica para respaldar el desarrollo del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan por lotes, por lotes alimentados o de manera continua. Las condiciones anaerobias se mantienen al rociar en primer lugar el medio con nitrógeno y luego sellar el recipiente de cultivo, por ejemplo, los matraces pueden sellarse con un tabique y una tapa con sello. También se pueden utilizar condiciones microaerobias mediante el suministro de un pequeño orificio en el tabique para una ventilación limitada. El pH del medio se mantiene en un pH de alrededor de 7 mediante la adición de un ácido, tal como H₂SO₄. La tasa de desarrollo se determina mediante la medición de la densidad óptica mediante el uso de un espectrofotómetro (600 nm) y la tasa de absorción de glucosa mediante la supervisión de la eliminación de fuentes de carbono con el transcurso del tiempo. Los subproductos tales como alcoholes no convenientes, ácidos orgánicos y glucosa residual pueden cuantificarse mediante HPLC (Shimadzu, Columbia MD), por ejemplo, mediante el uso de una serie Aminex® de columnas de HPLC (por ejemplo, la serie HPX-87) (BioRad, Hercules, CA), mediante el uso de un detector del índice de refracción para la glucosa y los alcoholes y un detector UV para los ácidos orgánicos (Lin et ál., *Biotechnol. Bioeng.* 775-779 (2005)).

Ejemplo XVII

Preparación de un organismo microbiano productor de caprolactama con una vía para convertir acetyl-CoA y 4-aminobutiril-CoA en 6-aminocaproil-CoA

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir caprolactama a partir de acetyl-CoA y 4-aminobutiril-CoA.

La *Escherichia coli* se usa como un organismo objetivo para modificar genéticamente la vía de caprolactama que se muestra en la Figura 11 que parte de acetyl-CoA y 4-aminobutiril-CoA. La *E. coli* proporciona un buen hospedador para generar un microorganismo de origen no natural capaz de producir caprolactama. La *E. coli* es pasible de manipulaciones genéticas y se sabe que es capaz de producir diversos productos, tales como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, de manera eficaz en condiciones anaerobias o microaerobias.

Para generar una cepa de *E. coli* modificada genéticamente para producir caprolactama, se expresan ácidos nucleicos que codifican las enzimas requeridas en *E. coli* mediante el uso de técnicas de biología molecular muy conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook, *supra*, 2001; Ausubel *supra*, 1999). En particular, los genes *paaJ* (NP_415915.1), *paaH* (NP_415913.1) y *maoC* (NP_415905.1) que codifican las actividades de 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA tiolasa, 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA reductasa, 3-hidroxi-6-aminohexanoil-CoA deshidratasa, respectivamente, se clonan en el vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con el promotor PA1/lacO. Además, los genes *bcd* (NP_349317.1) y *effAB* (NP_349315.1 y NP_349316.1) que codifican la actividad de 6-aminohex-2-enoil-CoA reductasa se clonan en el vector pZA33 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con el promotor PA1/lacO. Por último, los genes *sucD* (NP_904963.1), *gabT* (NP_417148.1) y *cat2* (P38942.2) que codifican las actividades de succinyl-CoA reductasa (formadora de aldehído), GABA transaminasa y 4-aminobutiril-CoA/acil-CoA transferasa se clonan en un tercer plásmido compatible, pZS23, con el promotor PA1/lacO, para aumentar la disponibilidad de 4-aminobutiril-CoA. El pZS23 se obtiene mediante el remplazo del módulo de resistencia a la ampicilina del vector pZS13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con un módulo de resistencia a la canamicina mediante técnicas de biología molecular muy conocidas. Los tres conjuntos de plásmidos se transforman en la *E. coli*, cepa MG1655, para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la síntesis de caprolactama.

El organismo modificado genéticamente resultante se cultiva en medio que contiene glucosa siguiendo

procedimientos muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et ál., *supra*, 2001). La expresión de los genes de la síntesis de caprolactama se corrobora mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica para determinar la expresión de polipéptidos o la actividad enzimática, que incluyen, por ejemplo, transferencias Northern, amplificación por PCR de ARNm, inmunotransferencias, y similares. Las actividades enzimáticas de las enzimas expresadas se confirman mediante el uso de ensayos específicos para las actividades individuales. La capacidad de la cepa de *E. coli* modificada genéticamente de producir caprolactama se confirma mediante el uso de HPLC, cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS) y/o cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS).

Las cepas microbianas modificadas genéticamente para que tengan una vía de síntesis de caprolactama funcional se aumentan de manera adicional mediante optimización para la utilización eficiente de la vía. En resumen, la cepa modificada genéticamente se evalúa para determinar si se expresa cualquiera de los genes exógenos en un nivel de limitación de la tasa. La expresión aumenta para cualquier enzima expresada en niveles bajos que pueda limitar el flujo a través de la vía mediante, por ejemplo, la introducción de cantidades de copias de genes adicionales.

Para generar mejores productores, se utiliza el modelado metabólico para optimizar las condiciones de cultivo. También se usa el modelado para diseñar inactivaciones génicas que optimicen de manera adicional la utilización de la vía (véase, por ejemplo, las publicaciones de patentes de EE. UU. 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 EE. UU. n.º 7,127,379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos sobre el desarrollo celular del cambio del metabolismo hacia una producción más eficiente de caprolactama. Un método de modelado es la estrategia de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard et ál., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar inactivaciones de genes que de manera colectiva tengan como resultado una mejor producción de caprolactama. También se puede usar la evolución adaptativa para generar mejores productores de, por ejemplo, los productos intermedios acetil-CoA y succinil-CoA del producto caprolactama. La evolución adaptativa se realiza para mejorar las características de desarrollo y producción (Fong y Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et ál., *Science* 314:1565-1568 (2006)). En función de los resultados, se pueden aplicar rondas sucesivas de modelado, modificación genética y evolución adaptativa al productor de caprolactama para aumentar de manera adicional la producción.

Para la producción a gran escala de caprolactama, el organismo anterior se cultiva en un fermentador mediante el uso de un medio conocido en la técnica para respaldar el desarrollo del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan por lotes, por lotes alimentados o de manera continua. Las condiciones anaerobias se mantienen al rociar en primer lugar el medio con nitrógeno y luego sellar el recipiente de cultivo, por ejemplo, los matraces pueden sellarse con un tabique y una tapa con sello. También se pueden utilizar condiciones microaerobias mediante el suministro de un pequeño orificio en el tabique para una ventilación limitada. El pH del medio se mantiene en un pH de alrededor de 7 mediante la adición de un ácido, tal como H₂SO₄. La tasa de desarrollo se determina mediante la medición de la densidad óptica mediante el uso de un espectrofotómetro (600 nm) y la tasa de absorción de glucosa mediante la supervisión de la eliminación de fuentes de carbono con el transcurso del tiempo. Los subproductos tales como alcoholes no convenientes, ácidos orgánicos y glucosa residual pueden cuantificarse mediante HPLC (Shimadzu, Columbia MD), por ejemplo, mediante el uso de una serie Aminex® de columnas de HPLC (por ejemplo, la serie HPX-87) (BioRad, Hercules, CA), mediante el uso de un detector del índice de refracción para la glucosa y los alcoholes y un detector UV para los ácidos orgánicos (Lin et ál., *Biotechnol. Bioeng.* 775-779 (2005)).

Ejemplo XVIII

Preparación de un organismo microbiano productor de hexametilendiamina con una vía para convertir acetil-CoA y 4-aminobutiril-CoA en 6-aminocaproil-CoA

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir hexametilendiamina a partir de acetil-CoA y 4-aminobutiril-CoA.

La *Escherichia coli* se usa como un organismo objetivo para modificar genéticamente la vía de hexametilendiamina que se muestra en la Figura XVII que parte de acetil-CoA y 4-aminobutiril-CoA. La *E. coli* proporciona un buen hospedador para generar un microorganismo de origen no natural capaz de producir hexametilendiamina. La *E. coli* es pasible de manipulaciones genéticas y se sabe que es capaz de producir diversos productos, tales como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, de manera eficaz en condiciones anaerobias o microaerobias.

Para generar una cepa de *E. coli* modificada genéticamente para producir hexametilendiamina, se expresan ácidos nucleicos que codifican las enzimas requeridas en *E. coli* mediante el uso de técnicas de biología molecular muy conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook, *supra*, 2001; Ausubel *supra*, 1999). En particular, los genes *paaJ* (NP_415915.1), *paaH* (NP_415913.1) y *maoC* (NP_415905.1) que codifican las actividades de 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA tiolasa, 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA reductasa, 3-hidroxi-6-aminohexanoil-CoA deshidratasa, respectivamente, se clonan en el vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con el promotor PA1/lacO. Además, los genes *bcd* (NP_349317.1), *ettAB* (NP_349315.1 y NP_349316.1), *acr1* (YP_047869.1) y *ygiG*

(NP_417544) que codifican actividades de 6-aminohex-2-enoil-CoA reductasa, 6-aminocaproil-CoA reductasa (formadora de aldehído) y hexametilendiamina transaminasa se clonan en el vector pZA33 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con el promotor PA1/lacO. Por último, los genes *sucD* (NP_904963.1), *gabT* (NP_417148.1) y *cat2* (P38942.2) que codifican las actividades de succinil-CoA reductasa (formadora de aldehído), GABA transaminasa y 4-aminobutiril-CoA/acil-CoA transferasa se clonan en un tercer plásmido compatible, pZS23, con el promotor PA1/lacO, para aumentar la disponibilidad de 4-aminobutiril-CoA. El pZS23 se obtiene mediante el remplazo del módulo de resistencia a la ampicilina del vector pZS13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con un módulo de resistencia a la canamicina mediante técnicas de biología molecular muy conocidas. Los tres conjuntos de plásmidos se transforman en la *E. coli*, cepa MG1655, para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la síntesis de hexametilendiamina.

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

Las cepas microbianas modificadas genéticamente para que tengan una vía de síntesis de hexametilendiamina funcional se aumentan de manera adicional mediante optimización para la utilización eficiente de la vía. En resumen, la cepa modificada genéticamente se evalúa para determinar si se expresa cualquiera de los genes exógenos en un nivel de limitación de la tasa. La expresión aumenta para cualquier enzima expresada en niveles bajos que pueda limitar el flujo a través de la vía mediante, por ejemplo, la introducción de cantidades de copias de genes adicionales.

Para generar mejores productores, se utiliza el modelado metabólico para optimizar las condiciones de cultivo. También se usa el modelado para diseñar inactivaciones génicas que optimicen de manera adicional la utilización de la vía (véase, por ejemplo, las publicaciones de patentes de EE. UU. 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 EE. UU. n.º 7,127,379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos sobre el desarrollo celular del cambio del metabolismo hacia una producción más eficiente de hexametilendiamina. Un método de modelado es la estrategia de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard et ál., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar inactivaciones de genes que de manera colectiva tengan como resultado una mejor producción de hexametilendiamina. También se puede usar la evolución adaptativa para generar mejores productores de, por ejemplo, los productos intermedios acetil-CoA y succinil-CoA del producto hexametilendiamina. La evolución adaptativa se realiza para mejorar las características de desarrollo y producción (Fong y Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et ál., *Science* 314:1565-1568 (2006)). En función de los resultados, se pueden aplicar rondas sucesivas de modelado, modificación genética y evolución adaptativa al productor de hexametilendiamina para aumentar de manera adicional la producción.

Para la producción a gran escala de hexametilendiamina, el organismo anterior se cultiva en un fermentador mediante el uso de un medio conocido en la técnica para respaldar el desarrollo del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan por lotes, por lotes alimentados o de manera continua. Las condiciones anaerobias se mantienen al rociar en primer lugar el medio con nitrógeno y luego sellar el recipiente de cultivo, por ejemplo, los matraces pueden sellarse con un tabique y una tapa con sello. También se pueden utilizar condiciones microaerobias mediante el suministro de un pequeño orificio en el tabique para una ventilación limitada. El pH del medio se mantiene en un pH de alrededor de 7 mediante la adición de un ácido, tal como H₂SO₄. La tasa de desarrollo se determina mediante la medición de la densidad óptica mediante el uso de un espectrofotómetro (600 nm) y la tasa de absorción de glucosa mediante la supervisión de la eliminación de fuentes de carbono con el transcurso del tiempo. Los subproductos tales como alcoholes no convenientes, ácidos orgánicos y glucosa residual pueden cuantificarse mediante HPLC (Shimadzu, Columbia MD), por ejemplo, mediante el uso de una serie Aminex® de columnas de HPLC (por ejemplo, la serie HPX-87) (BioRad, Hercules, CA), mediante el uso de un detector del índice de refracción para la glucosa y los alcoholes y un detector UV para los ácidos orgánicos (Lin et ál., *Biotechnol. Bioeng.* 775-779 (2005)).

Ejemplo XIX

Vías para la producción de ácido 6-aminocaproico a partir de piruvato y semialdehído succínico

Este ejemplo describe ejemplos de vías para la producción de ácido 6-aminocaproico.

En la presente memoria, se describen vías novedosas para producir ácido 6-aminocaproico (6-ACA) y productos relacionados. Estas vías sintetizan 6-ACA a partir de semialdehído succínico y piruvato, mediante la utilización de las enzimas aldolasa e hidratasa de la vía de degradación de ácido 4-hidroxifenilacético. Las enzimas candidatas y los riesgos de implementación asociados se describirán en el Ejemplo XXI más adelante.

Se describen microorganismos de origen no natural que expresan genes que codifican enzimas que catalizan la producción de 6-ACA. La modificación genética exitosa de estas vías implica identificar un conjunto adecuado de enzimas con una actividad y especificidad suficientes, clonar sus genes correspondientes en un hospedador de producción, optimizar la expresión de estos genes en el hospedador de producción, optimizar condiciones de fermentación y realizar ensayos para determinar la formación de productos luego de la fermentación.

Se produce ácido 6-aminocaproico y derivados a partir de piruvato y semialdehído succínico en un mínimo de cinco etapas enzimáticas. En la primera etapa de todas las vías, el piruvato y semialdehído succínico son unidos por la 4-hidroxi-2-oxoheptano-1,7-dioato (HODH) aldolasa. El producto de esta reacción, HODH, luego se deshidrata mediante 2-oxohept-4-eno-1,7-dioato (OHED) hidratasa para formar OHED. En etapas posteriores, la OHED se transamina, descarboxila o reduce como se muestra en la Figura 12.

En una vía, el alqueno de OHED es reducido por la OHED reductasa, mediante lo cual se forma 2-oxoheptano-1,7-dioato (2-OHD) (Figura 12, Etapa C), un 2-cetoácido. Luego se convierte 2-OHD en adipato semialdehído mediante una cetoácido descarboxilasa (Figura 12, Etapa D). En la etapa final, el aldehído de adipato semialdehído es convertido en una amina por una aminotransferasa o una oxidorreductasa de aminación (Figura 12, Etapa E).

De manera similar, el grupo 2-ceto de 2-OHD es transaminado por una aminotransferasa o una oxidorreductasa de aminación (Figura 12, Etapa II) para formar 2-aminoheptano-1,7-dioato (2-AIID). Luego, este producto es descarboxilado por la 2-AHD descarboxilasa para formar 6-aminocaproato (Figura 12, Etapa I).

En una vía alternativa, en primer lugar el OHED es descarboxilado por la OHED descarboxilasa (Figura 12, Etapa G), lo cual produce la formación de 6-oxohex-4-enoato (6-OHE). El grupo alquenal de 6-OHE es reducido por una oxidorreductasa para formar adipato semialdehído (Figura 12, Etapa G). Luego se convierte adipato semialdehído en 6-aminocaproato mediante una aminotransferasa u oxidorreductasa de aminación (Figura 12, Etapa E).

Incluso otra vía implica que una aminotransferasa u oxidorreductasa de aminación convierta OHED en 2-aminohept-4-eno-1,7-dioato (2-AHE) (Figura 12, Etapa J). El alqueno de 2-AHE es reducido posteriormente por una alqueno oxidorreductasa (Figura 12, Etapa K). El producto de esta reacción, 2-AHD, luego es descarboxilado por una aminoácido descarboxilasa (Figura 12, Etapa I) para formar 6-aminocaproato.

En incluso otra vía, se convierte HODH en 3-hidroxiadipil-CoA mediante una HODH deshidrogenasa o y HODH formiato-liasa (Figura 12, Etapa L). Posteriormente, la 3-hidroxiadipil-CoA se deshidrata y reduce para formar adipil-CoA (Figura 12, Etapas M, N). La adipil-CoA se reduce y desacila para formar adipato semialdehído (Figura 12, Etapa O), que luego es convertido en 6-aminocaproato por una aminotransferasa o una oxidorreductasa de aminación (Figura 12, Etapa E).

De manera similar, en primer lugar se convierte HODH en OHED (Figura 12, Etapa B), como se describió anteriormente. Luego se convierte OHED en 2,3-deshidroadipil-CoA mediante una deshidrogenasa o una OHED formiato-liasa (Figura 12, Etapa P). Luego, se reduce 2,3-dihidroadipil-CoA a adipil-CoA (Figura 12, Etapa N), que luego se convierte en 6-aminocaproato a través de adipato semialdehído (Figura 12, Etapas O, E), como se describió anteriormente.

En la vía final, se convierte HODH en 2-OHD a través de las etapas B y C, como se describió anteriormente. Una 2-OHD formiato-liasa o deshidrogenasa convierte 2-OHD en adipil-CoA (Figura 12, Etapa Q), que luego es reducida por una aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA (Figura 12, Etapa O). El producto, adipato semialdehído, se convierte en 6-aminocaproato mediante una aminotransferasa u oxidorreductasa de aminación (Figura 12, Etapa E).

Las vías detalladas en la Figura 12 son capaces de lograr el rendimiento máximo de 6-ACA teórico de 0,8 moles de 6-ACA por mol de glucosa utilizado. El rendimiento energético también es favorable, con un máximo de 1,6 moles de ATP por mol de glucosa utilizado con el rendimiento máximo del producto. Se usaron los siguientes presupuestos para calcular el rendimiento: 1) la fosfoenolpiruvato (PEP) carboxicina es capaz de funcionar en la dirección de generación de ATP, 2) se transporta NH_4 y 6-ACA dentro de la célula mediante el antiporte protónico, y 3) se forma semialdehído succínico a partir de alfa-cetoglutarato y/o succinil-CoA. La semialdehído succínico deshidrogenasa es una aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD(P)H y CoA que convierte succinil-CoA en semialdehído succínico. El semialdehído succínico es formado a partir de alfa-cetoglutarato por dos enzimas: la alfa-cetoglutarato descarboxilasa y 4-aminobutirato transaminasa.

Ejemplo XX

Vías para la producción de hexametilendiamina a partir de 6-aminocaproato

Este ejemplo describe ejemplos de vías para la producción de hexametilendiamina.

En la presente memoria, se describen vías novedosas para producir hexametilendiamina (HMDA) y productos relacionados. Esta vía sintetiza HMDA a partir de 6-aminocaproato (6-ACA). Estas vías involucran la activación del grupo ácido mediante fosforilación y/o acilación. La acetilación del grupo amino del extremo proporciona protección contra la ciclación espontánea de los productos intermedios de la vía. Las enzimas candidatas y los riesgos de

implementación asociados se describirán en el Ejemplo XXI más adelante.

La invención se dirige, en parte, a microorganismos de origen no natural que expresan genes que codifican enzimas que catalizan la producción de HMDA. La modificación genética exitosa de estas vías implica identificar un conjunto adecuado de enzimas con una actividad y especificidad suficientes, clonar sus genes correspondientes en un

Se detallan varias vías para producir HMDA a partir de 6-aminocaproato en la Figura 13. Todas las vías implican la activación del grupo de ácido carboxílico, seguida por la reducción y transaminación. En tres vías, se activa directamente el 6-aminocaproato, mientras que en otras vías el grupo amina del extremo es protegido mediante N-acetilación para impedir la ciclación espontánea.

En una vía, el 6-aminocaproato se fosforila para formar 6-AHOP mediante 6-aminocaproato cinasa (Figura 13, Etapa A). Luego se reduce 6-AHOP a semialdehído 6-aminocaproico (Figura 13, Etapa B) y posteriormente se transamina (Figura 13, Etapa C) mediante una aminotransferasa o una oxidoreductasa de aminación.

De manera alternativa, se convierte 6-AHOP en 6-aminocaproil-CoA mediante una aciltransferasa (Figura 13, Etapa L). Luego, se reduce 6-aminocaproil-CoA a semialdehído 6-aminocaproico mediante una aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA (Figura 13, Etapa N). Luego se forma HMDA mediante la transaminación de semialdehído 6-aminocaproico por parte de una aminotransferasa u oxidoreductasa de aminación (Figura 13, Etapa C).

En incluso otra vía, en primer lugar se activa 6-aminocaproato para formar un derivado de CoA mediante una CoA transferasa o CoA ligasa (Figura 13, Etapa M). El producto, 6-aminocaproil-CoA, puede ciclarse de manera espontánea, o convertirse en semialdehído 6-aminocaproico mediante una aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA formadora de aldehído (Figura 13, Etapa N). El semialdehído 6-aminocaproico se convierte en HMDA mediante una aminotransferasa o una oxidoreductasa de aminación (Figura 13, Etapa C).

Otras vías proceden de 6-acetamidohexanoato, el producto acetilado de 6-aminocaproato N-acetiltransferasa. El 6-acetamidohexanoato se convierte en 6-acetamidohexanal por diferentes vías (que se describirán más adelante). En las dos etapas finales de estas vías, en primer lugar se convierte 6-acetamidohexanal en 6-acetamidohexanamina mediante una aminotransferasa o una oxidoreductasa de aminación (Figura 13, Etapa G). Posteriormente, se convierte 6-acetamidohexanamina en HMDA mediante una amida hidrolasa o una N-acetiltransferasa (Figura 13, Etapa H).

En una vía, el 6-acetamidohexanoato es fosforilado por la 6-acetamidohexanoato cinasa (Figura 13, Etapa E). El producto, 6-AAHOP, es reducido para formar 6-acetamidohexanal (Figura 13, Etapa F), que luego se convierte en HMDA como se describió anteriormente.

En otra vía, se activa 6-acetamidohexanoato para formar 6-acetamidohexanoil-CoA mediante una CoA transferasa o CoA ligasa (Figura 13, Etapa I). Luego, el derivado de CoA se reduce a 6-acetamidohexanal mediante una oxidoreductasa dependiente de CoA formadora de aldehído (Figura 13, Etapa J). Luego se convierte 6-acetamidohexanal en HMDA como se describió anteriormente.

De manera alternativa, se fosforila 6-acetamidohexanoato para formar 6-AAHOP (Figura 13, Etapa E) y posteriormente se convierte en 6-acetamidohexanoil-CoA mediante una aciltransferasa (Figura 13, Etapa K). Luego se reduce la 6-acetamidohexanoil-CoA a HMDA como se describió anteriormente.

Ejemplo XXI

Sistema de clasificación de enzimas para la producción de ácido 6-aminocaproico y hexametilendiamina

Este ejemplo describe el sistema de clasificación de enzimas para los ejemplos de vías descritos en los Ejemplos XIX y XX para la producción de 6-aminocaproato o hexametilendiamina.

Todas las transformaciones que se ilustran en las Figuras 12 y 13 entran en las categorías generales de transformaciones que se muestran en la Tabla 9. A continuación, se describirá una cantidad de genes caracterizados bioquímicamente en cada categoría. Se enumeran específicamente genes que pueden aplicarse para catalizar las transformaciones adecuadas en las Figuras 12-13 cuando se clonan y expresan de manera adecuada.

La Tabla 9 muestra los tipos de enzimas útiles para convertir productos intermedios metabólicos centrales comunes en 6-aminocaproato y hexametilendiamina. Los primeros tres dígitos de cada etiqueta corresponden a los primeros tres números de la Comisión de Enzimas que indican el tipo general de transformación con independencia de la especificidad de sustratos.

Tabla 9

ETIQUETA	FUNCIÓN
1.2.1.b	Oxidoreductasa (de acil-CoA a aldehído)
1.2.1.c	Oxidoreductasa (de 2-cetoácido a acil-CoA)
1.2.1.d	Oxidoreductasa (de ácido fosfónico a aldehído)
1.3.1.a	Oxidoreductasa (de alqueno a alcano)
1.4.1.a	Oxidoreductasa (de cetona o aldehído a amino)
2.3.1.a	Aciltransferasa (transferencia de CoA a fosfo)
2.3.1.c	Aciltransferasa (N-acetiltransferasa)
2.3.1.d	Aciltransferasa (formiato C-aciltransferasa)
2.6.1.a	Aminotransferasa
2.7.2.a	Fosfotransferasa (carboxiaceptora)
2.8.3.a	Coenzima-A transferasa
3.5.1.a	Hidrolasa (que actúa en amidas lineales)
4.1.1.a	Carboxi-liasa
4.1.2.a	Aldehído-liasa
4.2.1.a	Hidro-liasa
6.2.1.a	Ácido-tiol ligasa

- 5 1.2.1.b Oxidoreductasa (de acil-CoA a aldehído). Las transformaciones de 6-acetamidohexanoil-CoA a 6-acetamidohexanal (Figura 13, Etapa J) y de 6-aminocaproil-CoA a semialdehído 6-aminocaproico (Figura 13, Etapa N) se catalizan mediante la enzima oxidoreductasa dependiente de CoA en la clase EC 1.2.1. La adipil-CoA se convierte en adipato semialdehído mediante adipil-CoA oxidoreductasa, una enzima con una funcionalidad similar (Figura 12, Etapa O). La semialdehído succínico deshidrogenasa, una enzima que forma el semialdehído succínico precursor de la Figura 12 a partir de succinil-CoA, también es una oxidoreductasa dependiente de CoA. Las oxidoreductasas en la clase EC 1.2.1. son capaces de reducir una acil-CoA a su aldehído correspondiente. Los ejemplos de genes que codifican esas enzimas incluyen el *acr1* de *Acinetobacter calcoaceticus* que codifica una acil-CoA reductasa grasa (Reiser y Somerville, Journal of Bacteriology 179:2969-2975 (1997)), la acil-CoA reductasa grasa de *Acinetobacter* sp. M-1 (Ishige et ál., Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195 (2002)), y una semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA y NADP codificada por el gen *sucD* en *Clostridium kluyveri* (Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996)). El *SucD* de *P. gingivalis* es otra semialdehído succínico deshidrogenasa (Takahashi et ál., J. Bacteriol. 182:4704-4710 (2000)). La acetaldehído deshidrogenasa de acilación en *Pseudomonas* sp, codificada por el *bphG*, es incluso otra candidata ya que se ha demostrado que oxida y acila acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, isobutiraldehído y formaldehído (Powlowski et ál., J. Bacteriol. 175:377-385 (1993)). Además de reducir acetil-CoA a etanol, se ha demostrado que la enzima codificada por *adhE* en *Leuconostoc mesenteroides* oxida el compuesto de cadena ramificada isobutiraldehído para formar isobutiril-CoA (Kazahaya et ál., J. Gen. Appl. Microbiol. 18:43-55 (1972); y Koo et ál., Biotechnol Lett. 27:505-510 (2005)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>acr1</i>	50086359	YP_047869.1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
<i>acr1</i>	1684886	AAC45217	<i>Acinetobacter baylyi</i>
<i>acr1</i>	18857901	BAB85476.1	<i>Acinetobacter</i> sp., cepa M-1
<i>sucD</i>	172046062	P38947.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>sucD</i>	34540484	NP_904963.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>bphG</i>	425213	BAA03892.1	<i>Pseudomonas</i> sp
<i>adhE</i>	55818563	AAV66076.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

Una enzima adicional que convierte acil-CoA en su aldehído correspondiente es la malonil-CoA reductasa que transforma malonil-CoA en semialdehído malónico. La malonil-CoA reductasa es una enzima fundamental en la fijación de carbono de carácter autotrófico a través del ciclo de 3-hidroxi- β -ketoacido en bacterias arqueales termoacidófilas (Berg et ál., Science 318:1782-1786 (2007); y Thauer, R. K., Science. 318:1732-1733 (2007)). La enzima utiliza NADPH como un cofactor y se ha caracterizado en *Metallosphaera* y *Sulfolobus* sp (Alber et ál., J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006); y Hugler et ál., J. Bacteriol. 184:2404-2410 (2002)). La enzima es codificada por *Msed_0709* en *Metallosphaera sedula* (Alber et ál., J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006); y Berg et ál., Science. 318:1782-1786 (2007)). Un gen que codifica una malonil-CoA reductasa de *Sulfolobus tokodaii* se clonó y expresó de manera heteróloga en *E. coli* (Alber et ál., J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006)). También se ha demostrado que esta enzima cataliza la conversión de metilmalonil-CoA en su aldehído correspondiente (solicitud de patente de la OMPI WO/2007/141208 Código Kind: A2). Si bien la funcionalidad de aldehído deshidrogenasa de estas enzimas es similar a la deshidrogenasa bifuncional de *Chloroflexus aurantiacus*, hay poca similitud de secuencia. Ambas enzimas candidatas de malonil-CoA reductasa tienen una similitud de secuencia alta con respecto a la aspartato-semi aldehído deshidrogenasa, una enzima que cataliza la reducción y desfosforilación simultánea de aspartil-4-fosfato a aspartato semialdehído. Se pueden encontrar candidatos génicos adicionales mediante la homología de secuencia con respecto a proteínas en otros organismos que incluyen *Sulfolobus solfataricus* y *Sulfolobus acidocaldarius* y se enumerarán más adelante. Incluso otro candidato para la aldehído deshidrogenasa de acilación de CoA es el gen *ald* de *Clostridium beijerinckii* (Toth et ál., Appl Environ Microbiol 65:4973-4980 (1999)). Se ha indicado que esta enzima reduce acetil-CoA y butiril-CoA a sus aldehídos correspondientes. Este gen es muy similar al *eutE* que codifica acetaldehído deshidrogenasa de *Salmonella typhimurium* y *E. coli* (Toth et ál., Appl Environ Microbiol 65:4973-4980 (1999)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>Msed_0709</i>	146303492	YP_001190808.1	<i>Metallosphaera sedula</i>
<i>mcr</i>	15922498	NP_378167.1	<i>Sulfolobus tokodaii</i>
<i>asd-2</i>	15898958	NP_343563.1	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
<i>Saci_2370</i>	70608071	YP_256941.1	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
<i>Ald</i>	49473535	AAT66436	<i>Clostridium beijerinckii</i>
<i>eutE</i>	687645	AAA80209	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>eutE</i>	2498347	P77445	<i>Escherichia coli</i>

1.2.1.c Oxidorreductasa (de 2-cetoácido a acil-CoA) Varias transformaciones en la Figura 12 requieren la conversión de un 2-cetoácido en una acil-CoA (Etapas L, P y Q) mediante una enzima en la clase EC 1.2.1. Esas reacciones

son catalizadas por complejos multienzimáticos que catalizan una serie de reacciones parciales que producen la descarboxilación oxidativa de acilación de 2-ceto-ácidos. Los ejemplos de enzimas incluyen 1) 2-ceto-ácido deshidrogenasa de cadena ramificada, 2) alfa-cetoglutarato deshidrogenasa y 3) el complejo multienzimático de piruvato deshidrogenasa (PDHC). Cada uno de los complejos de 2-ceto-ácido deshidrogenasa ocupa posiciones fundamentales en el metabolismo intermediario y normalmente la actividad enzimática es regulada de manera estricta (Fries et ál., Biochemistry 42:6996-7002 (2003)). Las enzimas comparten una estructura compleja pero común compuesta por múltiples copias de tres componentes catalíticos: alfa-cetoácido descarboxilasa (E1), dihidrolipoamida aciltransferasa (E2) y dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3). El componente E3 es compartido por todos los complejos de 2-ceto-ácido deshidrogenasa en un organismo, mientras que los componentes E1 y E2 son codificados por genes diferentes. Los componentes enzimáticos se encuentran presentes en numerosas copias en el complejo y utilizan múltiples cofactores para catalizar una secuencia dirigida de reacciones a través de la canalización de sustratos.

El tamaño total de estos complejos de deshidrogenasa es muy grande, con masas moleculares de entre 4 y 10 millones de Da (es decir, más grandes que un ribosoma)

La actividad de las enzimas en la familia de las 2-ceto-ácido deshidrogenasas es normalmente baja o limitada en condiciones anaerobias en *E. coli*. Un aumento en la producción de NADH (o NADPH) podría conducir a un desequilibrio de redox, y el NADH en sí mismo sirve como un inhibidor para la función enzimática. Los esfuerzos de modificación genética han aumentado la actividad anaerobia del complejo de piruvato deshidrogenasa de *E. coli* (Kim et ál., Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771 (2007); Kim et ál., J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008); y Zhou et ál., Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008)). Por ejemplo, el efecto inhibitor del NADH puede superarse mediante la modificación genética de una mutación H322Y en el componente E3 (Kim et ál., J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008)). Los estudios estructurales de componentes individuales y su funcionamiento conjunto en un complejo proporcionan una perspectiva sobre los mecanismos catalíticos y la arquitectura de las enzimas en esta familia (Aevvarsson et ál., Nat. Struct. Biol. 6:785-792 (1999); y Zhou et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 98:14802-14807 (2001)). La especificidad de sustratos de los complejos de deshidrogenasas varía en diferentes organismos, pero por lo general las ceto-ácido deshidrogenasas de cadena ramificada tienen la variedad más amplia de sustratos.

La alfa-cetoglutarato deshidrogenasa (AKGD) convierte alfa-cetoglutarato en succinil-CoA y es el sitio primario de control del flujo metabólico a través del ciclo de TCA (Hansford, Curr. Top. Bioenerg. 10:217-278 (1980)). Codificada por los genes *sucA*, *sucB* y *lpd* en la *E. coli*, la expresión génica de AKGD se regula negativamente en condiciones anaerobias y durante el desarrollo en glucosa (Park et ál., Mol. Microbiol. 15:473-482 (1995)). Si bien la variedad de sustratos de la AKGD es estrecha, los estudios estructurales del núcleo catalítico del componente E2 identifican residuos específicos responsables de la especificidad de sustrato (Knapp et ál., J. Mol. Biol. 280:655-668 (1998)). La AKGD de *Bacillus subtilis*, codificada por el *odhAB* (E1 y E2) y el *pdhD* (E3, dominio compartido), es regulada a nivel de la transcripción y depende de la fuente de carbono y la fase de desarrollo del organismo (Resnekov et ál., Mol. Gen. Genet. 234:285-296 (1992)). En la levadura, el gen *LPD1* que codifica el componente E3 es regulado a nivel de la transcripción por la glucosa (Roy y Dawes, J. Gen. Microbiol. 133:925-933 (1987)). El componente E1, codificado por el *KGD1*, también es regulado por la glucosa y activado por los productos de HAP2 y HAP3 (Repetto y Tzagoloff, Mol. Cell Biol. 9:2695-2705 (1989)). El complejo enzimático de AKGD, inhibido por los productos NADH y succinil-CoA, se encuentra bien estudiado en sistemas de mamíferos, dado que su funcionamiento obstaculizado se ha asociado a varias enfermedades neurológicas (Tretter y dam-Vizi, Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci. 360:2335-2345 (2005)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>sucA</i>	16128701	NP_415254.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>sucB</i>	16128702	NP_415255.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>lpd</i>	16128109	NP_414658.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>odhA</i>	51704265	P23129.2	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>odhB</i>	129041	P16263.1	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>pdhD</i>	118672	P21880.1	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>KGD1</i>	6322066	NP_012141.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>KGD2</i>	6320352	NP_010432.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>LPD1</i>	14318501	NP_116635.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

El complejo de 2-ceto-ácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BCKAD, por sus siglas en inglés), también conocido como 2-oxoisovalerato deshidrogenasa, participa en vías de degradación de aminoácidos de cadena ramificada, lo cual convierte los derivados 2-ceto ácidos de valina, leucina e isoleucina en sus derivados de acil-CoA y CO₂. El complejo se ha estudiado en muchos organismos que incluyen *Bacillus subtilis* (Wang et ál., Eur. J. Biochem. 213:1091-1099 (1993)), *Rattus norvegicus* (Namba et ál., J. Biol. Chem. 244:4437-4447 (1969)) y *Pseudomonas putida* (Sokatch et ál., J. Bacteriol. 148:647-652 (1981)). En *Bacillus subtilis*, la enzima es codificada por los genes *pdhD* (componente E3), *bfmBB* (componente E2), *bfmBAA* y *bfmBAB* (componente E1) (Wang et ál., Eur. J. Biochem. 213:1091-1099 (1993)). En los mamíferos, el complejo es regulado mediante fosforilación por fosfatasa y proteínas cinasas específicas. El complejo se ha estudiado en hepatocitos de ratas (Chicco et ál., J. Biol. Chem. 269:19427-19434 (1994)) y es codificado por los genes *Bckdha* (E1 alfa), *Bckdhb* (E1 beta), *Dbt* (E2) y *Dld* (E3). Los componentes E1 y E3 del complejo de BCKAD de *Pseudomonas putida* se han cristalizado (Aevarsson et ál., Nat. Struct. Biol. 6:785-792 (1999); y Mattevi et ál., Science. 255:1544-1550 (1992)) y se ha estudiado el complejo enzimático (Sokatch et ál., J. Bacteriol. 148:647-652 (1981)). La transcripción de los genes de BCKAD de *P. putida* es activada por el producto génico de *bkdR* (Hesslinger et ál., Mol. Microbiol. 27:477-492 (1998)). En algunos organismos que incluyen *Rattus norvegicus* (Paxton et ál., Biochem. J. 234:295-303 (1986)) y *Saccharomyces cerevisiae* (Sinclair et ál., Biochem. Mol. Biol. Int. 31:911-922 (1993)), se ha demostrado que este complejo tiene una amplia variedad de sustratos que incluye oxo-ácidos lineales tales como 2-oxobutanoato y alfa-cetoglutarato, además de los precursores de aminoácidos de cadena ramificada. El sitio activo de la BCKAD se modificó genéticamente para favorecer el sustrato alternativo acetil-CoA (Meng y Chuang, Biochemistry. 33:12879-12885 (1994)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>bfmBB</i>	16079459	NP_390283.1	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>bfmBAA</i>	16079461	NP_390285.1	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>bfmBAB</i>	16079460	NP_390284.1	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>pdhD</i>	118672	P21880.1	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>lpdV</i>	118677	P09063.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>bkdB</i>	129044	P09062.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>bkdA1</i>	26991090	NP_746515.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>bkdA2</i>	26991091	NP_746516.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Bckdha</i>	77736548	NP_036914.1	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Bckdhb</i>	158749538	NP_062140.1	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Dbt</i>	158749632	NP_445764.1	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Dld</i>	40786469	NP_955417.1	<i>Rattus norvegicus</i>

El complejo de piruvato deshidrogenasa, que cataliza la conversión de piruvato en acetil-CoA, también se ha estudiado extensamente. En la enzima de *E. coli*, residuos específicos en el componente E1 son responsables de la especificidad de sustratos (Bisswanger, J Biol Chem. 256:815-822 (1981); Bremer, Eur. J Biochem. 8:535-540 (1969); y Gong et ál., J Biol Chem. 275:13645-13653 (2000)). Como se mencionó anteriormente, los esfuerzos de modificación genética han mejorado la actividad enzimática de la PDH de *E. coli* en condiciones anaerobias (Kim et

ál., Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771 (2007); Kim et ál., J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008)); y Zhou et ál., Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008)). A diferencia de la PDH de *E. coli*, el complejo de *B. subtilis* se encuentra activo y es necesario para el desarrollo en condiciones anaerobias (Nakano et ál., J. Bacteriol. 179:6749-6755 (1997)). La PDH de *Klebsiella pneumoniae*, caracterizada durante el desarrollo en glicerol, también se encuentra activa en condiciones anaerobias (Menzel et ál., J. Biotechnol. 56:135-142 (1997)). Las estructuras cristalinas del complejo enzimático de riñones bovino (Zhou et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 98:14802-14807 (2001)) y el dominio catalítico E2 de *Azotobacter vinelandii* se encuentran disponibles (Mattevi et ál., Science. 255:1544-1550 (1992)). Algunos complejos enzimáticos de PDH de mamíferos pueden reaccionar en sustratos alternativos tales como 2-oxobutanoato, aunque la cinética comparativa de PDH y BCKAD de *Rattus norvegicus* indica que la BCKAD tiene una actividad más alta con el 2-oxobutanoato como sustrato (Paxton et ál., Biochem. J. 234:295-303 (1986)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>aceE</i>	16128107	NP_414656.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>aceF</i>	16128108	NP_414657.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>lpd</i>	16128109	NP_414658.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>pdhA</i>	3123238	P21881.1	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>pdhB</i>	129068	P21882.1	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>pdhC</i>	129054	P21883.2	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>pdhD</i>	118672	P21880.1	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>aceE</i>	152968699	YP_001333808.1	<i>Klebsiella pneumonia</i>
<i>aceF</i>	152968700	YP_001333809.1	<i>Klebsiella pneumonia</i>
<i>lpdA</i>	152968701	YP_001333810.1	<i>Klebsiella pneumonia</i>
<i>Pdha1</i>	124430510	NP_001004072.2	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Pdha2</i>	16758900	NP_446446.1	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Dlat</i>	78365255	NP_112287.1	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Dld</i>	40786469	NP_955417.1	<i>Rattus norvegicus</i>

Como alternativa a los complejos de 2-ceto-ácido deshidrogenasa multienzimáticos grandes descritos anteriormente, algunos organismos anaerobios utilizan enzimas en la familia de la 2-cetoácido oxidorreductasa (OFOR) para catalizar la descarboxilación oxidativa de acilación de 2-ceto-ácidos. A diferencia de los complejos de deshidrogenasas, estas enzimas contienen conglomerados de hierro-azufre, utilizan diferentes cofactores, y usan ferredoxina o flavodoxina como aceptores de electrones en lugar de NAD(P)H. Si bien la mayoría de las enzimas en esta familia son específicas del piruvato como sustrato (POR), se ha demostrado que algunas 2-ceto-ácido:ferredoxina oxidorreductasas aceptan una amplia variedad de 2-cetoácidos como sustratos, que incluyen el alfa-cetoglutarato y 2-oxobutanoato (Fukuda y Wakagi, Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002); y Zhang et ál., J. Biochem. 120:587-599 (1996)). Una enzima de ese tipo es OFOR de la arquea termoacidofílica *Sulfolobus tokodaii* 7, que contiene una subunidad alfa y beta codificada por el gen *ST2300* (Fukuda y Wakagi, Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002); y Zhang et ál., J. Biochem. 120:587-599 (1996)). Se ha desarrollado un sistema de expresión basado en plásmidos para expresar de manera eficiente esta proteína en la *E. coli* (Fukuda et ál., Eur. J. Biochem. 268:5639-5646 (2001)) y se determinaron los residuos involucrados en la especificidad de sustratos (Fukuda y Wakagi, Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002)). Dos OFOR de *Aeropyrum pernix* cepa K1 también se han clonado recientemente en la *E. coli*, caracterizado y descubierto que reaccionan con una amplia variedad de 2-oxoácidos (Nishizawa et ál., FEBS Lett. 579:2319-2322 (2005)). Se encuentran disponibles las secuencias genéticas de estos candidatos de OFOR, aunque hasta ahora no tienen identificadores de GenBank asignados. Hay pruebas

bioinformáticas de que se encuentran enzimas similares en todas las arqueas, algunas bacterias anaerobias y eucariotas sin mitocondria (Fukuda y Wakagi, *Biochim. Biophys. Acta* 1597:74-80 (2002)). Esta clase de enzima también es interesante desde un punto de vista energético, ya que la ferredoxina reducida podría usarse para generar NADH mediante ferredoxina-NAD reductasa (Petitdemange et ál., *Biochim. Biophys. Acta* 421:334-337 (1976)). Asimismo, dado que la mayoría de las enzimas están diseñadas para funcionar en condiciones anaerobias, se puede necesitar una menor modificación genética de enzimas con respecto a las enzimas en la familia del complejo de 2-ceto-ácido deshidrogenasa para lograr actividad en un entorno anaerobio.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
ST2300	15922633	NP_378302.1	<i>Sulfolobus tokodaii</i> 7

1.2.1.d Oxidorreductasa (de ácido fosfónico a aldehído). La reducción de un ácido fosfónico a su aldehído correspondiente es catalizada por una oxidorreductasa en la clase EC 1.2.1. Las Etapas B y F en la Figura 13 requieren una enzima de ese tipo para la reducción de 6-AHOP y 6-AAHOP a sus correspondientes aldehídos. Estas reacciones no son catalizadas por enzimas conocidas, pero una reacción similar es catalizada por la aspartato semialdehído deshidrogenasa (ASD, EC 1.2.1.11): la reducción dependiente de NADPH de 4-aspartil fosfato a aspartato-4-semialdehído. La ASD participa de la biosíntesis de aminoácidos y recientemente se ha estudiado como un objetivo antimicrobiano (Hadfield et ál., *Biochemistry* 40:14475-14483 (2001)). La estructura de la ASD de la *E. coli* se ha resuelto (Hadfield et ál., *J Mol. Biol.* 289:991-1002 (1999)) y se ha demostrado que la enzima acepta el sustrato alternativo beta-3-metilaspartil fosfato (Shames et ál., *J Biol. Chem.* 259:15331-15339 (1984)). La enzima de *Haemophilus influenzae* ha sido objeto de estudios de modificaciones genéticas enzimáticas para alterar las afinidades de unión a sustratos en el sitio activo (Blanco et ál., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60:1388-1395 (2004); y Blanco et ál., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60:1808-1815 (2004)). Otros candidatos de ASD se encuentran en la *Mycobacterium tuberculosis* (Shafiani et ál., *J Appl Microbiol* 98:832-838 (2005)), *Methanococcus jannaschii* (Faehnle et ál., *J Mol. Biol.* 353:1055-1068 (2005)), y los microorganismos infecciosos *Vibrio cholera* y *Helicobacter pylori* (Moore et ál., *Protein Expr. Purif.* 25:189-194 (2002)). Un candidato enzimático relacionado es la acetilglutamilfosfato reductasa (EC 1.2.1.38), una enzima que reduce de manera natural el acetilglutamilfosfato a acetilglutamato-5-semialdehído, que se encuentra en *S. cerevisiae* (Pauwels et ál., *Eur. J Biochem.* 270:1014-1024 (2003)), *B. subtilis* (O'Reilly y Devine, *Microbiology* 140 (Pt 5):1023-1025 (1994)) y otros organismos.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>Asd</i>	16131307	NP_417891.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>Asd</i>	68249223	YP_248335.1	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Asd</i>	1899206	AAB49996	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
VC2036	15642038	NP_231670	<i>Vibrio cholera</i>
<i>Asd</i>	210135348	YP_002301787.1	<i>Helicobacter pylori</i>
ARG5,6	6320913	NP_010992.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>argC</i>	16078184	NP_389001.1	<i>Bacillus subtilis</i>

1.3.1.a Oxidorreductasa (de alqueno a alcano) Varias transformaciones entran en la categoría de las oxidorreductasas que reducen un alqueno a un alcano (EC 1.3.1.-). Por ejemplo, las Etapas C, G, K y N en la Figura 12, catalizadas por la OHED reductasa, 6-OHE reductasa, 2-AHE reductasa y 2,3-deshidroadihil-CoA reductasa, respectivamente, entran en esta categoría. Las enzimas enona reductasa, alquenal reductasa y enoato reductasa son candidatos enzimáticos adecuados para catalizar las transformaciones de las Etapas C, G y K. Las enzimas enoil-CoA reductasa catalizan la conversión de 2,3-deshidroadihil-CoA en adihil-CoA (Etapa N).

Se han identificado enzimas con actividad de enona reductasa en procariotas, eucariotas y plantas (Shimoda et ál., *Bulletin of the chemical Society of Japan* 77:2269-2 (2004); y Wanner y Tressl, *Eur. J Biochem.* 255:271-278 (1998)). Dos enona reductasas de la fracción citosólica de *Saccharomyces cerevisiae* se purificaron y caracterizaron, y se descubrió que aceptan una variedad de alquenes (similares a 6-OHE) y enoil cetonas (similares a OHED) como sustratos (Wanner y Tressl, *Eur. J Biochem.* 255:271-278 (1998)). Hasta ahora, no se han identificado genes que

codifiquen estas enzimas. Los extractos celulares de la cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC7942 redujeron una variedad de sustratos de enona a sus correspondientes alquil cetonas (Shimoda et ál., Bulletin of the chemical Society of Japan 77:2269-2 (2004)). No se han asociado genes a esta actividad en este organismo. Las enona reductasas en otros organismos también pueden catalizar esta transformación.

- 5 Una enona reductasa dependiente de NADPH recombinante de *Nicotiana tabacum*, codificada por el *NtRed1*, se expresó funcionalmente y caracterizó en *E. coli* (Matsushima et ál., Bioorganic Chemistry 36:23-28 (2008)). Esta reductasa fue funcional en la enoil cetona pulegona exocíclica (Matsushima et ál., Bioorganic Chemistry 36:23-28 (2008)). Un candidato enzimático en *S. cerevisiae* en el locus *YML131W*, presenta un 30 % de identidad con respecto al *NtRed1* (valor $e = 1e-26$). La secuencia de aminoácidos del *NtRed1* comparte una homología significativa con la 2-alquenal reductasa de *Arabidopsis thaliana*, el homólogo zeta-cristalino de *A. thaliana*, la pulegona reductasa de *Menthe piperita* y la fenilpropenal alqueno reductasa de *Pinus taeda*. Se sabe que estas enzimas catalizan la reducción de los alquenos de aldehídos y cetonas con α,β -insaturación.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>NtRed1</i>	6692816	BAA89423	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>YML131W</i>	45269874	AAS56318.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>AtDBR1</i>	15237888	NP-197199	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>P2</i>	886430	CAA89262	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>PuIR</i>	34559418	AAQ75423	<i>Menthe piperita</i>
<i>PtPPDBR</i>	110816011	ABG91753	<i>Pinus taeda</i>

- 15 La 2-alquenal reductasa cataliza la reducción de enlaces dobles α,β -insaturados de aldehídos y cetonas. Se identificó una alquenal hidrogenasa de cebada ALH1 con actividad para una variedad de aldehídos y cetonas con α,β -insaturación que incluyen trans-2-nonenal, 2-hexenal, traumatina y 1-octeno-3-ona (Hambraeus y Nyberg, J Agric. Food Chem. 53:8714-8721 (2005)). El ADNc de ALH1 de *Hordeum vulgare* se expresó mediante clonación en *E. coli* (Hambraeus y Nyberg, J Agric. Food Chem. 53:8714-8721 (2005)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>ALH1</i>	62765876	AAX99161	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>ALH1</i>	195652571	ACG45753	<i>Zea mays</i>

- 20 Se sabe que las enzimas 2-enoato reductasas catalizan la reducción dependiente de NAD(P)H de una amplia variedad de aldehídos y ácidos carboxílicos α , β -insaturados (Rohdich et ál., J. Biol. Chem. 276:5779-5787 (2001)). En la secuencia genómica recientemente publicada de *C. kluyveri*, se indicaron 9 secuencias de codificación para las enoato reductasas, de las cuales se ha caracterizado una (Seedorf et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 105:2128-2133 (2008)). Los genes *enr* de la *C. tyrobutyricum* y *M. thermoaceticum* se han clonado y secuenciado y muestran un 59 % de identidad entre sí. También se descubrió que el primer gen tiene aproximadamente un 75 % de similitud con respecto al gen caracterizado en *C. kluyveri* (Giesel y Simon, Arch. Microbiol 135:51-57 (1983)). Se ha indicado en función de estos resultados de secuencias que el *enr* es muy similar a la dienol CoA reductasa en la *E. coli* (*fadH*) (Rohdich et ál., J. Biol. Chem. 276:5779-5787 (2001)). El gen *enr* de *C. thermoaceticum* se ha expresado también en una forma enzimáticamente activa en la *E. coli* (Rohdich et ál., J. Biol. Chem. 276:5779-5787 (2001)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>enr</i>	169405742	ACA54153.1	<i>Clostridium botulinum</i> A3 str
<i>enr</i>	2765041	CAA71086.1	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>enr</i>	3402834	CAA76083.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>enr</i>	83590886	YP_430895.1	<i>Moorella thermoacetica</i>
<i>fadH</i>	16130976	NP_417552.1	<i>Escherichia coli</i>

Otra enoato reductasa candidata es la 3-oxoadipato oxidorreductasa (maleilacetato reductasa), una enzima que cataliza la reducción de 2-maleilacetato (4-oxohex-2-enodioato) a 3-oxoadipato. La actividad enzimática se identificó y caracterizó en *Pseudomonas* sp., cepa B13 (Kaschabek y Reineke, J. Bacteriol. 177:320-325 (1995); y Kaschabek y Reineke, J. Bacteriol. 175:6075-6081 (1993)), y el gen de codificación se clonó y secuenció (Kasberg et ál., J. Bacteriol. 179:3801-3803 (1997)). Los genes candidatos para la 3-oxoadipato oxidorreductasa incluyen el gen *clcE* de *Pseudomonas* sp., cepa B13 (Kasberg et ál., J. Bacteriol. 179:3801-3803 (1997)), el gen *macA* de *Rhodococcus opacus* (Seibert et ál., J. Bacteriol. 180:3503-3508 (1998)) y el gen *macA* de *Ralstonia eutropha* (que también se conoce como *Cupriavidus necator*) (Seibert et ál., Microbiology 150:463-472 (2004)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>clcE</i>	3913241	030847,1	<i>Pseudomonas</i> sp. cepa B13
<i>macA</i>	7387876	084992,1	<i>Rhodococcus opacus</i>
<i>macA</i>	5916089	AAD55886	<i>Cupriavidus necator</i>

Las enzimas enoil-CoA reductasas son enzimas adecuadas para catalizar la reducción de 2,3-deshidroadiopil-CoA a adipil-CoA (Figura 12, Etapa N). Un ejemplo de enoil-CoA reductasa es el producto génico de *bcd* de *C. acetobutylicum* (Atsumi et ál., Metab Eng 10:305-311 (2008); y Boynton et ál., J. Bacteriol. 178:3015-3024 (1996)), que cataliza de manera natural la reducción de crotonil-CoA a butiril-CoA. La actividad de esta enzima puede mejorarse mediante la expresión de *bcd* junto con la expresión de los genes *etfAB* de *C. acetobutylicum*, 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 la *E. gracilis* (Hoffmeister et ál., J Biol. Chem. 280:4329-4338 (2005)). Una construcción derivada de esta secuencia luego de la remoción de su secuencia líder de direccionamiento mitocondrial se clonó en la *E. coli*, lo cual produjo una enzima activa (Hoffmeister et ál., J Biol. Chem. 280:4329-4338 (2005)). Esta estrategia es muy conocida por los expertos en la técnica de la expresión de genes eucariotas, particularmente aquellos con secuencias líderes que puedan dirigir el producto génico a un compartimento intracelular específico, en organismos procariotas. Un homólogo cercano de este gen, TDE0597, de la *Treponema denticola* procariota representa una tercera enoil-CoA reductasa que se ha clonado y expresado en la *E. coli* (Tucci y Martin, Febs Letters 581:1561-1566 (2007)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>bcd</i>	15895968	NP_349317.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>etfA</i>	15895966	NP_349315.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>etfB</i>	15895967	NP_349316.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
TER	62287512	Q5EU90.1	<i>Euglena gracilis</i>
TDE0597	42526113	NP_971211.1	<i>Treponema denticola</i>

Otros candidatos enzimáticos de enoil-CoA reductasa se encuentran en organismos que degradan compuestos

aromáticos. La *Rhodopseudomonas palustris*, un organismo modelo para la degradación de benzoato, tiene la capacidad enzimática de degradar el pimelato a través de la betaoxidación de pimeloil-CoA. Los genes adyacentes en el operón *pim*, *pimC* y *pimD*, presentan homología de secuencia con respecto al *bcd* de *C. acetobutylicum* y se predice que codificarán una pimeloil-CoA deshidrogenasa que contiene flavina (Harrison y Harwood, Microbiology 151:727-736 (2005)). El genoma del simbionte de soja con fijación de nitrógeno *Bradyrhizobium japonicum* también contiene un operón *a pim* compuesto por genes con una similitud de secuencia alta con respecto al *pimC* y *pimD* de *R. palustris* (Harrison y Harwood, Microbiology 151:727-736 (2005)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>pimC</i>	39650632	CAE29155	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
<i>pimD</i>	39650631	CAE29154	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
<i>pimC</i>	27356102	BAC53083	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>pimD</i>	27356101	BAC53082	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>

Un candidato adicional es la 2-metil-enoil de cadena ramificada-CoA reductasa (EC 1.3.1.52), una enzima que cataliza la reducción de sustratos de trans-enoil-CoA con impedimento estérico. Esta enzima participa de la síntesis de ácidos grasos de cadena ramificada en el nemátodo *Ascaris suum* y es capaz de reducir una variedad de sustratos de cadena lineal y ramificada que incluyen 2-metilbutanoil-CoA, 2-metilpentanoil-CoA, octanoil-CoA y pentanoil-CoA (Duran et ál., J Biol. Chem. 268:22391-22396 (1993)). Se han caracterizado dos isoformas de la enzima, codificadas por los genes *acad1* y *acad*.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>acad1</i>	2407655	AAC48316.1	<i>Ascaris suum</i>
<i>acad</i>	347404	AAA16096.1	<i>Ascaris suum</i>

1.4.1.a Oxidorreductasa (de cetona o aldehído a amino). Las oxidorreductasas en la clase EC 1.4.1 que convierten un aldehído o una cetona en su grupo amina correspondiente catalizan varias etapas biosintéticas en las vías descritas. En la Figura 12, las conversiones de OHED en 2-AHE (Etapa J), 2-OHD en 2-AHD (Etapa H) y adipato semialdehído en 6-aminocaproato (Etapa E) son catalizadas por la OHED oxidorreductasa de aminación, la 2-OHD oxidorreductasa de aminación y la adipato semialdehído oxidorreductasa de aminación. En la Figura 13, la conversión de 6-aminocaproato semialdehído en HMDA (Etapa H) y 6-acetamidohexanal en 6-acetamidohexamina (Etapa G) también es catalizada por oxidorreductasas de aminación.

La mayoría de las oxidorreductasas de aminación catalizan la desaminación oxidativa reversible de alfa-aminoácidos con NAD⁺ o NADP⁺ como aceptor, y las reacciones son normalmente reversibles. Los ejemplos de enzimas incluyen la glutamato deshidrogenasa (de desaminación), codificada por el *gdhA*, la leucina deshidrogenasa (de desaminación), codificada por el *ldh*, y la aspartato deshidrogenasa (de desaminación), codificada por el *nadX*. El producto génico *gdhA* de la *Escherichia coli* (Korber et ál., J Mol. Biol. 234:1270-1273 (1993); y McPherson et ál., Nucleic Acids Res. 11:5257-5266 (1983)), el *gdh* de *Thermotoga maritime* (Kort et ál., Extremophiles. 1:52-60 (1997); Lebbink et ál., J Mol. Biol. 280:287-296 (1998); y Lebbink et ál., J Mol. Biol. 289:357-369 (1999)), y el *gdhA1* de *Halobacterium salinarum* (Ingoldsby et ál., Gene 349:237-244 (2005)) catalizan la interconversión reversible de glutamato en 2-oxoglutarato y amoníaco, al tiempo que favorecen a NADP(H), NAD(H), o ambos, respectivamente. El gen *ldh* de *Bacillus cereus* codifica la proteína LeuDH que tiene una amplia variedad de sustratos que incluyen leucina, isoleucina, valina y 2-aminobutanoato (Ansorge y Kula, Biotechnol Bioeng 68:557-562 (2000); y Stoyan et ál., J Biotechnol. 54:77-80 (1997)). El gen *nadX* de la *Thermotoga maritime* que codifica la aspartato deshidrogenasa está involucrado en la biosíntesis de NAD (Yang et ál., J Biol. Chem. 278:8804-8808 (2003)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>gdhA</i>	118547	P00370	<i>Escherichia coli</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>gdh</i>	6226595	P96110.4	<i>Thermotoga maritima</i>
<i>gdhA1</i>	15789827	NP_279651.1	<i>Halobacterium salinarum</i>
<i>ldh</i>	61222614	P0A393	<i>Bacillus cereus</i>
<i>nadX</i>	15644391	NP_229443.1	<i>Thermotoga maritima</i>

La lisina 6-deshidrogenasa (de desaminación), codificada por el *lysDH*, cataliza la desamidación oxidativa del grupo 6-amino de L-lisina para formar 2-aminoadipato-6-semialdehído, que a su vez se cicla de manera no enzimática para formar Δ^1 -piperideina-6-carboxilato (Misono y Nagasaki, J. Bacteriol. 150:398-401 (1982)). Se pueden encontrar ejemplos de enzimas en *Geobacillus stearothermophilus* (Heydari et ál., Appl Environ. Microbiol 70:937-942 (2004)), *Agrobacterium tumefaciens* (Hashimoto et ál., J Biochem. 106:76-80 (1989); y Misono y Nagasaki, J. Bacteriol. 150:398-401 (1982)) y *Achromobacter denitrificans* (Ruldeekulthamrong et ál., BMB. Rep. 41:790-795 (2008)). Esas enzimas son candidatas particularmente buenas para convertir adipato semialdehído en 6-aminocaproato, dada la similitud estructural entre el adipato semialdehído y el 2-aminoadipato-6-semialdehído.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>lysDH</i>	13429872	BAB39707	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>lysDH</i>	15888285	NP_353966	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>lysDH</i>	74026644	AAZ94428	<i>Achromobacter denitrificans</i>

2.3.1.a Aciltransferasa (transferencia de CoA a fosfo). Las aciltransferasas que intercambian un resto de CoA por un fosfato se encuentran en la clase EC 2.3.1. Las transformaciones en esta categoría incluyen las conversiones de 6-AAHOP en 6-acetamidohexanoil-CoA (Figura 13, Etapa K) y de 6-AHOP en 6-aminocaproil-CoA (Figura 13, Etapa L). Los ejemplos de aciltransferasas que transfieren fosfato incluyen la fosfotransacetilasa (EC 2.3.1.8), codificada por el *pta*, y la fosfotransbutirilasa (EC 2.3.1.19), codificada por el *ptb*. El gen *pta* de la *E. coli* codifica una enzima que convierte de manera reversible acetyl-CoA en acetyl-fosfato (Suzuki, T., Biochim. Biophys. Acta 191:559-569 (1969)). Esta enzima también puede utilizar propionil-CoA como un sustrato, formándose propionato en el proceso (Hesslinger et ál., Mol. Microbiol 27:477-492 (1998)). De manera similar, el gen *ptb* de la *C. acetobutylicum* codifica la fosfato transbutirilasa, una enzima que convierte de manera reversible butiril-CoA en butiril-fosfato (Walter et ál., Gene 134:107-111 (1993); y Wiesenborn et ál., Appl Environ. Microbiol 55:317-322 (1989)). Se encuentran genes *ptb* adicionales en la bacteria productora de butirato L2-50 (Louis et ál., J. Bacteriol. 186:2099-2106 (2004)) y *Bacillus megaterium* (Vazquez et ál., Curr. Microbiol 42:345-349 (2001)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>Pta</i>	16130232	NP_416800.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>Ptb</i>	15896327	NP_349676	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>Ptb</i>	38425288	AAR19757.1	bacteria productora de butirato L2-50
<i>Ptb</i>	10046659	CAC07932.1	<i>Bacillus megaterium</i>

2.3.1.c Aciltransferasa (N-acetiltransferasa). Las n-acetiltransferasas transfieren un grupo acetilo a una amina, mediante lo cual se forma un grupo N-acetilo. La N-acetilación cumple con diversas funciones en sistemas biológicos que incluyen la regulación de la transcripción, la importación nuclear, el ensamblaje cromosómico y el remodelado

del nucleosoma (Kouzarides, EMBO J 19:1176-1179 (2000)). La N-acetilación de los productos intermedios metabólicos de las vías biosintéticas de arginina sirve para proteger productos intermedios reactivos contra la ciclación espontánea y también para secuestrar productos intermedios de vías de las vías en competencia (Caldovic y Tuchman, Biochem. J 372:279-290 (2003)). La acetilación del 6-ACA (Figura 13, etapa D) cumple con una función similar en la vía de biosíntesis de HMDA propuesta de la Figura 13, protegiendo a los productos intermedios reactivos contra la ciclación espontánea.

Una enzima candidata para acetilar el 6-ACA es la lisina N-acetiltransferasa (EC 2.3.1.32), una enzima que transfiere de manera selectiva el resto acetilo de acetil fosfato al grupo amino del extremo de L-lisina, beta-L-lisina o L-ornitina. Si bien hasta donde se sabe esta enzima no acetila el 6-ACA, este sustrato es similar desde el punto de vista estructural al sustrato natural. La lisina N-acetiltransferasa se ha caracterizado en *Bos taurus* (Paik. y Kim, Arch. Biochem. Biophys. 108:221-229, 1964) y *Methanosarcina mazei* (Pfluger et ál., Appl Environ. Microbiol 69:6047-6055 (2003)). También se predice que las arqueas metanogénicas *M. maripaludis*, *M. acetivorans*, *M. barkeri* y *M. jannaschii* codificarán enzimas con esta funcionalidad (Pfluger et ál., Appl Environ. Microbiol 69:6047-6055 (2003)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>ablB</i>	21227037	NP_632959.1	<i>Methanosarcina mazei</i>
<i>yodP</i>	44921183	CAF30418	<i>Methanococcus maripaludis</i>
<i>MA3978</i>	20092772	NP_618847.1	<i>Methanosarcina acetivorans</i>
<i>MJ0635</i>	15668816	NP_247619.1	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>
<i>Mbar_A0671</i>	73668215	YP_304230.1	<i>Methanosarcina barkeri</i>

De manera alternativa, la acetilación de 6-ACA puede ser catalizada por una enzima en la familia GNAT de N-acetiltransferasas. Esas enzimas transfieren un grupo acetilo de acetil-CoA a una amina primaria. La enzima espermidina N-acetiltransferasa (SSAT), también conocida como diamina N-acetiltransferasa (EC 2.3.1.57), es capaz de acetilar una variedad de sustratos de moléculas pequeñas. Las enzimas purificadas de *Ascaris suum* y *Onchocerca volvulus* presentan una amplia variedad de sustratos que incluye la HMDA (Davids et ál., Mol. Biochem. Parasitol. 64:341-344 (1994); y Wittich y Walter, Mol. Biochem. Parasitol. 38:13-17 (1990)), pero los genes asociados no se han identificado hasta ahora. Otras enzimas con esta funcionalidad se encuentran en *Bacillus subtilis* (Forouhar et ál., J Biol. Chem. 280:40328-40336 (2005)) y *Homo sapiens* (Casero y Pegg, FASEB J 7:653-661 (1993)). Una enzima relacionada estrechamente es la tialisina N-acetiltransferasa en *C. elegans*, una enzima que acepta una variedad de sustratos que incluyen lisina, ornitina, tialisina y otros (bo-Dalo et ál., Biochem. J 384:129-137 (2004)). Los residuos de aminoácidos involucrados en la unión a sustratos se identificaron en la tialisina N-acetiltransferasa de *Leishmania major* (Luersen, K., FEBS Lett. 579:5347-5352 (2005)). Un candidato adicional es la diaminobutirato acetiltransferasa (EC 2.3.1.178), una enzima que participa en la biosíntesis de ectoína en *Methylomicrobium alcaliphilum* (Reshetnikov et ál., Arch. Microbiol 184:286-297 (2006)) *C. salexigens* (anteriormente *Halomonas elongata*) (Canovas et ál., Syst. Appl Microbiol 21:487-497 (1998)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>paiA</i>	16080268	NP_391095.1	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>SSAT1</i>	114322	P21673	<i>Homo sapiens</i>
<i>D2023.4</i>	17559148	NP_505978.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>LmjF36.2750</i>	68129928	CAJ09234.1	<i>Leishmania major</i>
<i>ectA</i>	68366269	AAV96770.1	<i>Methylomicrobium alcaliphilum</i> 20Z
<i>ectA</i>	6685422	Q9ZEU8.1	<i>Chromohalobacter salexigens</i>

Un candidato enzimático adicional para acetilar el 6-ACA (Figura 13, Etapa D) y desacetilar la 6-acetamidohexanamina (Figura 13, Etapa H) es la ornitina acetiltransferasa (OAT, EC 2.3.1.35 y EC 2.3.1.1), una enzima bifuncional que cataliza dos etapas de la biosíntesis de arginina (Figura 14A). La primera etapa de la biosíntesis de arginina (Figura 14A, etapa 1) es la N-acetilación de glutamato, catalizada por la OAT con acetil-CoA como un donante de acetilo (O'Reilly y Devine, Microbiology 140 (Pt 5):1023-1025 (1994)). La OAT también cataliza la quinta etapa de la biosíntesis de arginina (Figura 14A, etapa 2), en la que se transfiere un grupo N-acetilo de N-acetil-L-oritina a L-glutamato, el primer metabolito en la vía de biosíntesis de arginina. Esta transformación sirve para reciclar el grupo acetilo y regenerar N-acetilglutamato, conservando energía y convirtiendo de ese modo a la vía lineal en una vía cíclica. Se puede emplear una estrategia similar en la biosíntesis de HMDA a partir de 6-aminocaproato, con una sola enzima que acetila 6-aminocaproato y desacetila 6-acetamidohexanamina para formar HMDA (Figura 14B). Los ejemplos de enzimas de OAT son codificados por el *argJ* en *Bacillus subtilis* (O'Reilly y Devine, Microbiology 140 (Pt 5):1023-1025 (1994); y Sakanyan et ál., Journal of General Microbiology 138:125-130 (1992)) y *ECM40* en *S. cerevisiae* (Abadjieva et ál., J Biol. Chem. 275:11361-11367 (2000); y Liu et ál., Eur. J Biochem. 228:291-296 (1995)). Se encuentran disponibles estructuras cristalinas de las enzimas de levadura (Maes et ál., Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. 62:1294-1297 (2006)) y *Mycobacterium tuberculosis* (Sankaranarayanan et ál., Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. 65:173-176 (2009)). Si bien son codificadas por un solo marco de lectura abierto, las enzimas OAT tienen distintos péptidos de subunidades alfa y beta (Liu et ál., Eur. J Biochem. 228:291-296 (1995)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>argJ</i>	16078185	NP_389002.1	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>ECM40 (ARG7)</i>	6323707	NP_013778.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Rv1653</i>	15608791	NP_216169.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

2.3.1.d Aciltransferasa (formiato C-aciltransferasa). La acilación de cetoácidos HODH, OHED y 2-OHD para formar sus correspondientes derivados de CoA (Figura 12, Etapas L, P y Q) y la liberación simultánea de formiato son catalizadas por las enzimas formiato C-aciltransferasas en la clase EC 2.3.1. Las enzimas en esta clase incluyen la piruvato formiato-liasa y la cetoácido formiato-liasa. La piruvato formiato-liasa (PFL, EC 2.3.1.54), codificada por el *pflB* en la *E. coli*, convierte piruvato en acetil-CoA y formiato. El sitio activo de PFL contiene un radical glicilo catalíticamente esencial que es activado después de la traducción en condiciones anaerobias por la enzima activadora de PFL (PFL-AE, EC 1.97.1.4) codificada por el *pflA* (Knappe et ál., Proc. Natl. Acad. Sci EUA 81:1332-1335 (1984); y Wong et ál., Biochemistry 32:14102-14110 (1993)). Una piruvato formiato-liasa de *Archaeoglobus fulgidus* codificada por el *pflD* se ha clonado, expresado en *E. coli* y caracterizado (Lehtio, L. y A. Goldman, Protein Ing Des Sel 17:545-552 (2004)). Las estructuras cristalinas de las enzimas de *A. fulgidus* y *E. coli* se han resuelto (Lehtio et ál., J Mol. Biol. 357:221-235 (2006)). Se encuentran candidatos de PFL y PFL-AE adicionales en *Clostridium pasteurianum* (Weidner y Sawers, J. Bacteriol. 178:2440-2444 (1996)) y la alga eucariota *Chlamydomonas reinhardtii* (Cary et ál., Appl. Environ. Microbiol 56:1576-1583 (1990)). La ceto-ácido formiato-liasa (EC 2.3.1.-), también conocida como 2-cetobutirato formiato-liasa (KFL) y piruvato formiato-liasa 4, es el producto génico del *tdcE* en la *E. coli*. Esta enzima cataliza la conversión de 2-cetobutirato en propionil-CoA y formiato durante la degradación de treonina anaerobia y también puede realizar una sustitución por la piruvato formiato-liasa en el catabolismo anaerobio (Simanshu et ál., J Biosci. 32:1195-1206 (2007)). La enzima es sensible al oxígeno y, al igual que PflB, necesita una modificación posterior a la traducción por parte de PFL-AE para activar un radical glicilo en el sitio activo (Hesslinger et ál., Mol. Microbiol 27:477-492 (1998)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>pflB</i>	16128870	NP_415423.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>pflA</i>	16128869	NP_415422.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>tdcE</i>	48994926	AAT48170.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>pflD</i>	11499044	NP_070278.1	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
<i>pfl</i>	2500058	Q46266.1	<i>Clostridium pasteurianum</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>act</i>	1072362	CAA63749.1	<i>Clostridium pasteurianum</i>
<i>pfl1</i>	159462978	XP_001689719.1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
<i>pfla1</i>	159485246	XP_001700657.1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>

2.6.1.a Aminotransferasa. Las Etapas E, II y J de la Figura 12 y las Etapas C y G de la Figura 13 necesitan la conversión de un aldehído o una cetona en un grupo amino. Esta transformación puede alcanzarse mediante una aminotransferasa (EC 2.6.1.-). La conversión de un aldehído en una amina del extremo (Figura 12, Etapa E; Figura 13, Etapas C y G) puede ser catalizada por la gamma-aminobutirato transaminasa (GABA transaminasa). Una GABA transaminasa de la *E. coli* es codificada por el *gabT* y transfiere un grupo amino de glutamato al aldehído del extremo del semialdehído succínico (Bartsch et ál., J. Bacteriol. 172:7035-7042 (1990)). Esta enzima presenta una amplia variedad de sustratos (Liu et ál., Biochemistry 43:10896-10905 (2004)). El producto génico de *puuE* codifica la otra 4-aminobutirato transaminasa en la *E. coli* (Kurihara et ál., J. Biol. Chem. 280:4602-4608 (2005)). Se ha demostrado que las GABA transaminasas en *Mus musculus*, *Pseudomonas fluorescens* y *Sus scrofa* reaccionan con el ácido 6-aminocaproico (Cooper, Methods Enzymol. 113:80-82 (1985); y Scott y Jakoby, J Biol. Chem. 234:932-936 (1959)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>gabT</i>	16130576	NP_417148.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>puuE</i>	16129263	NP_415818.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>abat</i>	37202121	NP_766549.2	<i>Mus musculus</i>
<i>gabT</i>	70733692	YP_257332.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>abat</i>	47523600	NP_999428.1	<i>Sus scrofa</i>

Otros candidatos enzimáticos incluyen putrescina aminotransferasas u otras diamina aminotransferasas. Esas enzimas se adaptan particularmente bien para llevar a cabo la conversión de 6-aminocaproato semialdehído en HMDA. La putrescina aminotransferasa de *E. coli* es codificada por el gen *ygjG* y la enzima purificada también fue capaz de transaminar cadaverina y espermidina (Samsonova et ál., BMC. Microbiol 3:2 (2003)). Además, se ha indicado la actividad de esta enzima sobre 1,7-diaminoheptano y con aminoaceptores que no son el 2-oxoglutarato (p. ej., piruvato, 2-oxobutanoato) (Kim, J Biol. Chem. 239:783-786 (1964); y Samsonova et ál., BMC. Microbiol 3:2 (2003)). Una putrescina aminotransferasa con una actividad más alta con piruvato como el aminoaceptor que el alfa-cetoglutarato es el gen *spuC* de la *Pseudomonas aeruginosa* (Lu et ál., J. Bacteriol. 184:3765-3773 (2002)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>ygjG</i>	145698310	NP_417544	<i>Escherichia coli</i>
<i>spuC</i>	9946143	AAG03688	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Otras enzimas candidatas incluyen beta-alanina/alfa-cetoglutarato aminotransferasas que producen semialdehído malónico a partir de beta-alanina (WO08027742). Se demostró que el producto génico de *SkPYD4* en la *Saccharomyces kluyveri* usa de manera preferencial beta-alanina como el donante de grupo amino (Andersen y Hansen, Gene 124:105-109 (1993)). El *SkUGA1* codifica un homólogo de la GABA aminotransferasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el *UGA1* (Ramos et ál., Eur. J. Biochem. 149:401-404 (1985)), mientras que el *SkPYD4* codifica una enzima involucrada en la transaminación de β -alanina y GABA (Andersen y Hansen, Gene 124:105-109 (1993)). La 3-amino-2-metilpropionato transaminasa cataliza la transformación de metilmalonato semialdehído en 3-amino-2-metilpropionato. La enzima se ha caracterizado en *Rattus norvegicus* y *Sus scrofa* y es codificada por *Abat*

1968 (Kakimoto et ál., Biochim. Biophys. Acta 156:374-380 (1968); y Tamaki et ál., Methods Enzymol. 324:376-389 (2000)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>SkyPYD4</i>	98626772	ABF58893.1	<i>Saccharomyces kluyveri</i>
<i>SkUGA1</i>	98626792	ABF58894.1	<i>Saccharomyces kluyveri</i>
<i>UGA1</i>	6321456	NP_011533.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Abat</i>	122065191	P50554.3	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Abat</i>	120968	P80147.2	<i>Sus scrofa</i>

Las Etapas J y H de la Figura 12 son catalizadas por aminotransferasas que transforman aminoácidos en oxo-ácidos. En la Etapa J, se transamina OHED para formar 2-AHE mediante OHED aminotransferasa. La transaminación de 2-OHD a 2-AHD por parte de la 2-OHD aminotransferasa (Etapa H) es una reacción similar. Un ejemplo de candidato enzimático para catalizar estas reacciones es la aspartato aminotransferasa, una enzima que transfiere de manera natural un grupo oxo de oxaloacetato a glutamato, formando alfa-cetoglutarato y aspartato. El aspartato es similar en estructura a OHED y 2-AHD. La actividad de la aspartato aminotransferasa es catalizada, por ejemplo, por los productos génicos del *aspC* de la *Escherichia coli* (Yagi et ál., FEBS Lett. 100:81-84, (1979); y Yagi et ál., Methods Enzymol. 113:83-89 (1985)), *AAT2* de *Saccharomyces cerevisiae* (Yagi et ál., J Biochem. 92:35-43 (1982)) y *ASP5* de *Arabidopsis thaliana* (de la Torre et ál., Plant J 46:414-425 (2006); Kwok y Hanson, J Exp. Bot. 55:595-604 (2004); y Wilkie y Warren, Protein Expr. Purif. 12:381-389 (1998)). Se ha demostrado que la enzima de *Rattus norvegicus* transamina sustratos alternativos tales como ácido 2-aminohexanedioico y ácido 2,4-diaminobutírico (Recasens et ál., Biochemistry 19:4583-4589 (1980)). Las aminotransferasas que funcionan en otros sustratos de aminoácidos pueden catalizar esta transformación. La valina aminotransferasa cataliza la conversión de valina y piruvato en 2-cetoisovalerato y alanina. El gen de *E. coli*, *avtA*, codifica una enzima de ese tipo (Whalen y Berg, C. J. Bacteriol. 150:739-746 (1982)). Este producto génico también cataliza la transaminación de α -cetobutirato para generar α -aminobutirato, aunque no se ha identificado el donante de amina en esta reacción (Whalen y Berg, J. Bacteriol. 158:571-574 (1984)). El producto génico del *serC* de *E. coli* cataliza dos reacciones, fosfoserina aminotransferasa y fosfohidroxitreonina aminotransferasa (Lam y Winkler, J. Bacteriol. 172:6518-6528 (1990)), y no se pudo detectar actividad en sustratos no fosforilados (Drewke et ál., FEBS. Lett. 390:179-182 (1996)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>aspC</i>	16128895	NP_415448.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>AAT2</i>	1703040	P23542.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ASP5</i>	20532373	P46248.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Got2</i>	112987	P00507	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>avtA</i>	49176374	YP_026231.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>serC</i>	16128874	NP_415427.1	<i>Escherichia coli</i>

2.7.2.a Fosfotransferasa (carboxiaceptora). Las enzimas fosfotransferasas en la clase EC 2.7.2 transforman ácidos carboxílicos en ácidos fosfónicos con la hidrólisis simultánea de un ATP. Las Etapas A y E en la Figura 13 necesitan una fosfotransferasa para activar los grupos carboxilo de 6-ACA (Etapa A) y 6-acetamidohexanoato (Etapa E) para formar sus correspondientes ácidos fosfónicos. La butirato cinasa lleva a cabo la conversión reversible de butiril-fosfato en butirato durante la acidogénesis en *C. acetobutylicum* (Cary et ál., Appl. Environ. Microbiol. 56:1576-1583 (1990)). Esta enzima es codificada por cualquiera de los dos productos génicos *buk* (Huang et ál., J Mol. Microbiol. Biotechnol. 2:33-38 (2000)). La enzima isobutirato cinasa relacionada de *Thermotoga maritima* también se ha expresado en la *E. coli* y cristalizado (Diao et ál., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 59:1100-1102 (2003); y Diao et

- 5 Illasson, J. Bacteriol. 191:2521-2529 (2009)). La aspartato cinasa cataliza la fosforilación dependiente de ATP del aspartato y participa de la síntesis de varios aminoácidos. La enzima aspartocinasa III en la *E. coli*, codificada por el *lysC*, tiene una amplia variedad de sustratos y se han elucidado los residuos catalíticos involucrados en la especificidad de sustrato (Keng y Viola, Arch. Biochem. Biophys. 335:73-81 (1996)). Dos cinasas adicionales en la *E. coli* también son candidatas adecuadas: la acetato cinasa y gamma-glutamil cinasa. La acetato cinasa de *E. coli*, codificada por el *ackA* (Skarstedt y Silverstein, J. Biol. Chem. 251:6775-6783 (1976)), fosforila el propionato además del acetato (Hesslinger et ál., Mol. Microbiol. 27:477-492 (1998)). La gamma-glutamil cinasa de *E. coli*, codificada por el *proB* (Smith et ál., J. Bacteriol. 157:545-551 (1984)), fosforila el grupo de ácido gamma carbónico del glutamato.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>buk1</i>	15896326	NP_349675	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>buk2</i>	20137415	Q97II1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>buk2</i>	6685256	Q9X278.1	<i>Thermotoga maritima</i>
<i>lysC</i>	16131850	NP_418448.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>ackA</i>	16130231	NP_416799.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>proB</i>	16128228	NP_414777.1	<i>Escherichia coli</i>

- 10 La acetilglutamato cinasa fosforila el glutamato acetilado durante la biosíntesis de arginina y es una candidata adecuada para fosforilar el 6-acetamidohexanoato (Figura 13, Etapa E). Hasta donde se sabe, esta enzima no acepta sustratos alternativos; sin embargo, se han elucidado varios residuos de la enzima de *E. coli* que participan de la unión a sustratos y la fosforilación mediante mutagénesis dirigida al sitio (Marco-Martin et ál., J Mol. Biol. 334:459-476 (2003); y Ramon-Maiques et ál., Structure. 10:329-342 (2002)). La enzima es codificada por el *argB* en *Bacillus subtilis* y *E. coli* (Parsot et ál., Gene 68:275-283 (1988)), y ARG5,6 en *S. cerevisiae* (Pauwels et ál., Eur. J Biochem. 270:1014-1024 (2003)). El gen ARG5,6 de *S. cerevisiae* codifica un precursor poliproteico que madura en la matriz mitocondrial para convertirse en acetilglutamato cinasa y acetilglutamilfosfato reductasa, un candidato enzimático para la reducción de 6-AAHOP (Figura 13, Etapa F).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>argB</i>	145698337	NP_418394.3	<i>Escherichia coli</i>
<i>argB</i>	16078186	NP_389003.1	<i>Bacillus subtilis</i>
ARG5,6	6320913	NP_010992.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

- 20 2.8.3.a Coenzima-A transferasa. Las Coenzima-A (CoA) transferasas catalizan la transferencia reversible de un resto de CoA de una molécula a otra. En la Etapa M de la Figura 13, la 3-aminocaproil-CoA está formada por la transferencia de un grupo CoA de acetil-CoA, succinil-CoA u otro donante de CoA. Una transformación similar es catalizada por la 6-acetamidohexanoato CoA-transferasa, que se muestra en la Etapa I de la Figura 13. Ejemplos de candidatos de CoA transferasa son catalizados por los productos génicos de *cat1*, *cat2*, y *cat3* de *Clostridium kluyveri*, que se ha demostrado que presentan actividad de succinil-CoA, 4-hidroxibutiril-CoA y butiril-CoA transferasa, respectivamente (Seedorf et ál., Proc. Natl. Acad. Sci EUA 105:2128-2133 (2008); y Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996)). Actividades de CoA transferasa similares también se encuentran presentes en *Trichomonas vaginalis* (van Grinsven et ál., J. Biol. Chem. 283:1411-1418 (2008)) y *Trypanosoma brucei* (Riviere et ál., J. Biol. Chem. 279:45337-45346 (2004)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>cat1</i>	729048	P38946.1	<i>Clostridium kluyveri</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>cat2</i>	172046066	P38942.2	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>cat3</i>	146349050	EDK35586.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>TVAG_395550</i>	123975034	XP_001330176	<i>Trichomonas vaginalis</i> G3
<i>Tb11.02.0290</i>	71754875	XP_828352	<i>Trypanosoma brucei</i>

Una CoA transferasa que puede utilizar acetil-CoA como el donante de CoA es la acetoacetil-CoA transferasa, codificada por los genes *atoA* (subunidad alfa) y *atoD* de *E. Coli* (subunidad beta) (Vanderwinkel et ál., Biochem. Biophys. Res. Commun. D. Biol. Crystallogr. 58:2116-2121 (2002); y Vanderwinkel et ál., Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902-908 (1968)). Esta enzima tiene una amplia variedad de sustratos (Sramek y Freman, Arch. Biochem. Biophys. 171:14-26 (1975)) y se ha demostrado que transfiere el resto de CoA a acetato a partir de una variedad de sustratos de acil-CoA ramificados y lineales, que incluyen isobutirato (Matthies y Schink, Appl. Environ. Microbiol. 58:1435-1439 (1992)), valerato (Vanderwinkel et ál., Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902-908 (1968)) y butanoato (Vanderwinkel et ál., Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902-908 (1968)). Esta enzima se induce a nivel de la transcripción mediante acetoacetato, por lo que la modificación del control de regulación puede ser necesaria para modificar genéticamente esta enzima en una vía (Pauli y Overath, Eur. J. Biochem. 29:553-562 (1972)). Existen enzimas similares en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Duncan et ál., Appl. Environ. Microbiol. 68:5186-5190 (2002)), *Clostridium acetobutylicum* (Cary et ál., Appl. Environ. Microbiol. 56:1576-1583 (1990); y Wiesenborn et ál., Appl. Environ. Microbiol. 55:323-329 (1989)) y *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kosaka et ál., Biosci. Biotechnol. Biochem. 71:58-68 (2007)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>AtoA</i>	2492994	NP_416726	<i>Escherichia coli</i> K12
<i>AtoD</i>	2492990	NP_416725	<i>Escherichia coli</i> K12
<i>actA</i>	62391407	YP_226809.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032
<i>cg0592</i>	62389399	YP_224801.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032
<i>ctfA</i>	15004866	NP_149326.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>ctfB</i>	15004867	NP_149327.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>ctfA</i>	31075384	AAP42564.1	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>ctfB</i>	31075385	AAP42565.1	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>

La enzima glutaconil-CoA-transferasa (EC 2.8.3.12) de la bacteria anaerobia *Acidaminococcus fermentans* reacciona con glutaconil-CoA y 3-butenil-CoA (Mack et ál., Eur. J. Biochem. 226:41-51 (1994)). Los genes que codifican esta enzima son el *gctA* y *gctB*. Esta enzima tiene una actividad reducida pero detectable con otros derivados de CoA que incluyen glutaril-CoA, 2-hidroxiglutaril-CoA, adipil-CoA y acrilil-CoA (Buckel et ál., Eur. J. Biochem. 118:315-321 (1981)). La enzima se ha clonado y expresado en la *E. coli* (Mack et ál., Eur. J. Biochem. 226:41-51 (1994)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>gctA</i>	559392	CAA57199.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>gctB</i>	559393	CAA57200.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>

Incluso otra CoA transferasa es la succinil-CoA:3:oxoácido-CoA transferasa de dos unidades codificada por el *pcaI* y *pcaJ* en *Pseudomonas putida* (Kaschabek et ál., J. Bacteriol. 184:207-215 (2002)). Existen enzimas similares basadas en la homología en *Acinetobacter* sp. ADP1 (Kowalchuk et ál., Gene 146:23-30 (1994)). Se encuentran ejemplos adicionales de succinil-CoA:3:oxoácido-CoA transferasas en *Helicobacter pylori* (Corthesy-Theulaz et ál., J. Biol. Chem. 272:25659-25667 (1997)) y *Bacillus subtilis* (Stols et ál., Protein Expr. Purif. 53:396-403 (2007)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>pcaI</i>	24985644	AAN69545.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>pcaJ</i>	26990657	NP_746082.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>pcaI</i>	50084858	YP_046368.1	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1
<i>pcaJ</i>	141776	AAC37147.1	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1
<i>pcaI</i>	21224997	NP_630776.1	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>pcaJ</i>	21224996	NP_630775.1	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>HPAG1_0676</i>	108563101	YP_627417	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>HPAG1_0677</i>	108563102	YP_627418	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>ScoA</i>	16080950	NP_391778	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>ScoB</i>	16080949	NP_391777	<i>Bacillus subtilis</i>

3.5.1.a Hidrolasa (que actúa en amidas lineales). La desacetilación de acetamidas lineales es catalizada por una amidohidrolasa en la familia 3.5.1 de enzimas. Una enzima de ese tipo es necesaria para la desacetilación de la 6-acetamidohexanamina en HMDA (Figura 13, Etapa H). Una enzima que cataliza una transformación similar es la 4-acetamidobutirato desacetilasa (EC 3.5.1.63), que desacetila de manera natural 4-acetamidobutirato. Se ha demostrado que la enzima, estudiada por su función en la degradación de la putrescina en *Candida boidinii* (Gillyon et ál., Journal of General Microbiology 133:2477-2485 (1987)), desacetila una variedad de sustratos que incluyen el 6-acetamidohexanoato (Haywood y Large, Journal of General Microbiology 132:7-14 (1986)). Si bien el 6-acetamidohexanoato es similar en estructura al sustrato deseado, la desacetilación de este compuesto (Figura 13, etapa D, reacción inversa) puede obstaculizar la producción eficiente de HMDA. La evolución dirigida o modificación genética de proteínas puede ser necesaria para mejorar la especificidad con respecto a la 6-acetamidohexanamina. No se ha identificado hasta ahora el gen asociado a esta actividad.

La acetilpoliamina amidohidrolasa (EC 3.5.1.62) es otra enzima candidata que forma las diaminas putrescina y cadaverina a partir de sus precursores acetilados. La acetilpoliamina desacetilasa (AphA) de *Mycoplana ramosa* se ha clonado en la *E. coli* y caracterizado (Sakurada et ál., J. Bacteriol. 178:5781-5786 (1996)) y una estructura cristalina se encuentra disponible (Fujishiro et ál., Biochem. Biophys. Res. Commun. 157:1169-1174 (1988)). Esta enzima también se ha estudiado en la *Micrococcus luteus*, pero el gen asociado no se ha identificado hasta ahora (Suzuki et ál., Biochim. Biophys. Acta 882:140-142 (1986)). Una proteína de la superfamilia de la histona desacetilasa con una similitud de secuencia alta con respecto a AphA se identificó en el genoma de *M. luteus* (valor $e = 1e-18$, 37 % de identidad). La N-acetil-L-ornitina desacetilasa de *E. coli* es otra amidohidrolasa candidata (EC 3.5.1.16). La enzima de *E. coli*, codificada por el gen *argE* (McGregor et ál., J Am. Chem. Soc. 127:14100-14107 (2005); y Meinnel et ál., J. Bacteriol. 174:2323-2331 (1992)), remueve grupos N-acetilo de una variedad de sustratos que incluyen ornitina, lisina, glutamina y otros aminoácidos (Javid-Majd y Blanchard, Biochemistry 39:1285-1293 (2000)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>aphA</i>	3023317	Q48935.1	<i>Mycoplana ramosa</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
MlutDRAFT_1143	172071524	EDT57566.1	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>argE</i>	16131795	NP_418392.1	<i>Escherichia coli</i>

4.1.1.a Carboxi-liasa. Las Etapas D y F en la Figura 12 son catalizadas por enzimas 2-cetoácido descarboxilasas que generan 6-OHE y adipato semialdehído a partir de OHED (Etapa F) y 2-OHD (Etapa D). Además, el alfa-cetoglutarato se descarboxila para formar el precursor de la vía semialdehído succínico mediante alfa-cetoglutarato descarboxilasa, una cetó-ácido descarboxilasa. La descarboxilación de cetó-ácidos es catalizada por una variedad de enzimas con especificidades de sustratos variadas, que incluyen la piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1), benzoilformiato descarboxilasa (EC 4.1.1.7), alfa-cetoglutarato descarboxilasa y alfa-cetó-ácido descarboxilasa de cadena ramificada. La piruvato descarboxilasa (PDC), también denominada «cetó-ácido descarboxilasa», es una enzima fundamental en la fermentación alcohólica, que cataliza la descarboxilación de piruvato para formar acetaldehído. La enzima de *Saccharomyces cerevisiae* tiene una amplia variedad de sustratos para 2-ceto ácidos alifáticos que incluyen 2-cetobutirato, 2-cetovalerato, 3-hidroxipiruvato y 2-fenilpiruvato (22). Esta enzima se ha estudiado extensamente, modificado genéticamente para obtener una actividad alterada y expresado funcionalmente en la *E. coli* (Killenberg-Jabs et ál., Eur. J. Biochem. 268:1698-1704 (2001); Li, H. y F. Jordan, Biochemistry. 38:10004-10012 (1999); y ter Schure et ál., Appl. Environ. Microbiol. 64:1303-1307 (1998)). La PDC de *Zymomonas mobilis*, codificada por el *pdc*, también tiene una amplia variedad de sustrato y se ha sometido a estudios de modificación genética dirigida a alterar la afinidad con respecto a diferentes sustratos (Siegert et ál., Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005)). La estructura cristalina de esta enzima se encuentra disponible (Killenberg-Jabs et ál., Eur. J. Biochem. 268:1698-1704 (2001)). Otros candidatos de PDC bien caracterizados incluyen las enzimas de *Acetobacter pasteurians* (Chandra et ál., Arch. Microbiol. 176:443-451 (2001)) y *Kluyveromyces lactis* (Krieger et ál., Eur. J. Biochem. 269:3256-3263 (2002)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>pdc</i>	118391	P06672.1	<i>Zymomonas mobilis</i>
<i>pdc1</i>	30923172	P06169	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>pdc</i>	20385191	Q8L388	<i>Acetobacter pasteurians</i>
<i>pdc1</i>	52788279	Q12629	<i>Kluyveromyces lactis</i>

Al igual que la PDC, la benzoilformiato descarboxilasa (EC 4.1.1.7) tiene una amplia variedad de sustratos y ha sido objeto de estudios de modificación genética de enzimas. La enzima de *Pseudomonas putida* se ha estudiado extensamente y se encuentran disponibles estructuras cristalinas de esta enzima (Hasson et ál., Biochemistry 37:9918-9930 (1998); y Polovnikova et ál., Biochemistry 42:1820-1830 (2003)). La mutagénesis dirigida al sitio de dos residuos en el sitio activo de la enzima de *Pseudomonas putida* alteró la afinidad (Km) de sustratos de origen no natural y no natural (Siegert et ál., Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005)). Las propiedades de esta enzima se han modificado de manera adicional mediante modificación genética dirigida (Lingen et ál., Protein Eng 15:585-593 (2002); y Lingen et ál., Chembiochem. 4:721-726 (2003)). La enzima de *Pseudomonas aeruginosa*, codificada por el *mdlC*, también se ha caracterizado de manera experimental (Barrowman et ál., FEMS Microbiology Letters 34:57-60 (1986)). Otros candidatos génicos de *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens* y otros organismos pueden deducirse a partir de la homología de secuencia o identificarse mediante el uso de un sistema de selección de desarrollo que se desarrolló en *Pseudomonas putida* (Henning et ál., Appl. Environ. Microbiol. 72:7510-7517 (2006)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>mdlC</i>	3915757	P20906.2	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>mdlC</i>	81539678	Q9HUR2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>dpgB</i>	126202187	ABN80423.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>ilvB-1</i>	70730840	YP_260581.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Una tercera enzima capaz de descarboxilar 2-oxoácidos es la alfa-cetoglutarato descarboxilasa (KGD). Hasta ahora no se ha estudiado la variedad de sustratos de esta clase de enzimas. La KDC de *Mycobacterium tuberculosis* (Tian et ál., Proc Natl Acad Sci EUA 102:10670-10675 (2005)) se ha clonado y expresado de manera funcional en otros proyectos internos en Genomática. Sin embargo, no representa un candidato ideal para la modificación genética de la cepa debido a su gran tamaño (~130 kD) y riqueza de GC. Se ha detectado la actividad enzimática de la KDC en varias especies de rizobios que incluyen *Bradyrhizobium japonicum* y *Mesorhizobium loti* (Green et ál., J. Bacteriol. 182:2838-2844 (2000)). Si bien el o los genes de codificación de KDC no se han aislado en estos organismos, las secuencias genómicas se encuentran disponibles y varios genes en cada genoma se registran como KDC putativas. Una KDC de *Euglena gracilis* también se ha caracterizado, pero el gen asociado a esta actividad no se ha identificado hasta ahora (Shigeoka y Nakano, Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28 (1991)). Se secuenciaron los primeros veinte aminoácidos desde el extremo N MTYKAPVKDVKFLLDKVFKV (SEQ ID NO:) (Shigeoka y Nakano, Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28 (1991)). El gen puede identificarse mediante la evaluación de genes candidatos que contengan esta secuencia del extremo N para la actividad de KDC.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>kgd</i>	160395583	050463,4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>kgd</i>	27375563	NP_767092.1	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>kgd</i>	13473636	NP_105204.1	<i>Mesorhizobium loti</i>

Una cuarta enzima candidata para catalizar esta etapa es la alfa-cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada (BCKA, por sus siglas en inglés). Se ha demostrado que esta clase de enzima funciona en una variedad de compuestos que varían en longitud de cadena de 3 a 6 carbonos (Oku y Kaneda, J Biol Chem. 263:18386-18396 (1988); y Smit et ál., Appl Environ Microbiol. 71:303-311 (2005)). La enzima en *Lactococcus lactis* se ha caracterizado en una variedad de sustratos ramificados y lineales que incluyen 2-oxobutanoato, 2-oxohexanoato, 2-oxopentanoato, 3-metil-2-oxobutanoato, 4-metil-2-oxobutanoato e isocaproato (Smit et ál., Appl Environ Microbiol. 71:303-311 (2005)). La enzima se ha caracterizado estructuralmente (Berg et ál., Science. 318:1782-1786 (2007)). Las alineaciones de secuencias entre la enzima de *Lactococcus lactis* y la piruvato descarboxilasa de *Zymomonas mobilis* indican que los residuos de reconocimiento de sustratos y catalíticos son casi idénticos (Siegert et ál., Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005)), por lo que esta enzima sería una candidata auspiciosa para la modificación genética dirigida. La descarboxilación del alfa-cetoglutarato por parte de una BCKA se detectó en *Bacillus subtilis*; sin embargo, esta actividad fue baja (5 %) con respecto a la actividad en otros sustratos de cadena ramificada (Oku y Kaneda, J Biol Chem. 263:18386-18396 (1988)) y el gen que codifica esta enzima no se ha identificado hasta ahora. Se pueden identificar candidatos génicos de BCKA adicionales mediante la homología con respecto a la secuencia de proteínas de *Lactococcus lactis*. Muchas de las coincidencias de BLASTp de puntuación alta con esta enzima se registran como indolpiruvato descarboxilasas (EC 4.1.1.74). La indolpiruvato descarboxilasa (IPDA) es una enzima que cataliza la descarboxilación de indolpiruvato para formar indolacetaldehído en plantas y bacterias de plantas.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>kdcA</i>	44921617	AAS49166.1	<i>Lactococcus lactis</i>

Enzimas alfa-ceto ácido descarboxilasas de cadena ramificada recombinantes derivadas de las subunidades E1 del complejo de ceto ácido deshidrogenasa de cadena ramificada mitocondrial de *Homo sapiens* y *Bos taurus* se han clonado y expresado de manera funcional en la *E. coli* (Davie et ál., J. Biol. Chem. 267:16601-16606 (1992); Wynn et ál., J. Biol. Chem. 267:1881-1887 (1992); y Wynn et ál., J. Biol. Chem. 267:12400-12403 (1992)). En estos estudios, los autores descubrieron que la expresión conjunta de las chaperoninas GroEL y GroES mejoró 500 veces la

actividad específica de la descarboxilasa (Wynn et ál., J. Biol. Chem. 267:12400-12403 (1992)). Estas enzimas están compuestas por dos subunidades alfa y dos beta.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>BCKDHB</i>	34101272	NP_898871.1	<i>Homo sapiens</i>
<i>BCKDHA</i>	11386135	NP_000700.1	<i>Homo sapiens</i>
<i>BCKDHB</i>	115502434	P21839	<i>Bos taurus</i>
<i>BCKDHA</i>	129030	P11178	<i>Bos taurus</i>

La descarboxilación de 2-AHD para formar 6-aminocaproato (Figura 12, Etapa I) es catalizada por una aminoácido descarboxilasa tal como la aspartato descarboxilasa. La aspartato descarboxilasa participa de la biosíntesis de pantotenato y es codificada por el gen *panD* en la *Escherichia coli* (Dusch et ál., Appl. Environ. Microbiol 65:1530-1539 (1999); Merke y Nichols, FEMS Microbiol Lett. 143:247-252 (1996); Ramjee et ál., Biochem. J 323 (Pt 3):661-669 (1997); y Schmitzberger et ál., EMBO J 22:6193-6204 (2003)). Enzimas similares de *Mycobacterium tuberculosis* (Chopra et ál., Protein Expr. Purif. 25:533-540 (2002)) y *Corynebacterium glutamicum* (Dusch et ál., Appl. Environ. Microbiol 65:1530-1539 (1999)) se han expresado y caracterizado en la *E. coli*.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>panD</i>	67470411	P0A790	<i>Escherichia coli</i> K12
<i>panD</i>	18203593	Q9X4N0	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>panD</i>	54041701	P65660.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

4.1.2.a Aldehído-liasa. La HOHD aldolasa, también conocida como «HHED aldolasa», cataliza la conversión de 4-hidroxi-2-oxo-heptano-1,7-dioato (HOHD) en piruvato y semialdehído succínico (Figura 12, Etapa A). La enzima es una aldolasa de clase II dependiente de ion metálico divalente, que cataliza la etapa final de la degradación de ácido 4-hidroxifenilacético en *E. coli* C, *E. coli* W, y otros organismos. En el contexto natural, la enzima funciona en la dirección de degradación. La reacción inversa (de condensación) es desfavorable desde el punto de vista termodinámico; sin embargo, el equilibrio puede desplazarse a través del acoplamiento de la HODH aldolasa a enzimas de vías posteriores que funcionen de manera eficiente en productos de reacción. Esas estrategias han sido eficaces para desplazar el equilibrio de otras aldolasas en la dirección de condensación (Nagata et ál., Appl Microbiol Biotechnol 44:432-438 (1995); y Pollard et ál., Appl Environ. Microbiol 64:4093-4094 (1998)). La enzima de *E. coli* C, codificada por el *hpcH*, se ha estudiado extensamente y recientemente se ha cristalizado (Rea et ál., J Mol. Biol. 373:866-876 (2007); y Stringfellow et ál., Gene 166:73-76 (1995)). La enzima de *E. coli* W es codificada por el *hpaI* (Prieto et ál., J. Bacteriol. 178:111-120 (1996)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>hpcH</i>	633197	CAA87759.1	<i>Escherichia coli</i> C
<i>hpaI</i>	38112625	AAR11360.1	<i>Escherichia coli</i> W

4.2.1.a Hidro-liasa. La enzima OHED hidratasa participa de la degradación de ácido 4-hidroxifenilacético, donde convierte 2-oxo-hept-4-eno-1,7-dioato (OHED) en 2-oxo-4-hidroxi-hepta-1,7-dioato (IIODII) mediante el uso de magnesio como un cofactor (Burks et ál., J. Am. Chem. Soc. 120 (1998)) (Figura 12, Etapa B). Los candidatos enzimáticos de OHED hidratasa se han identificado y caracterizado en *E. coli* C (Izumi et ál., J Mol. Biol. 370:899-911 (2007); y Roper et ál., Gene 156:47-51 (1995)) y *E. coli* W (Prieto et ál., J. Bacteriol. 178:111-120 (1996)). La comparación de secuencias revela homólogos en una variedad de bacterias, plantas y animales. Enzimas con secuencias muy similares se encuentran contenidas en *Klebsiella pneumonia* (91 % de identidad, valor e = 2e-138) y *Salmonella enterica* (91 % de identidad, valor e = 4e-138), entre otras.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>hpcG</i>	556840	CAA57202.1	<i>Escherichia coli C</i>
<i>hpaH</i>	757830	CAA86044.1	<i>Escherichia coli W</i>
<i>hpaH</i>	150958100	ABR80130.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Sari_01896</i>	160865156	ABX21779.1	<i>Salmonella enterica</i>

La deshidratación de 3-hidroxiadipil-CoA para formar 2,3-deshidroadipil-CoA (Figura 12, Etapa M) es catalizada por una enzima con actividad de enoil-CoA hidratasa. La 3-hidroxiubutiril-CoA deshidratasa (EC 4.2.1.55), también denominada «crotonasa», deshidrata la 3-hidroxiisobutiril-CoA para formar crotonoil-CoA (Figura 14, etapa 2). Las enzimas crotonasas son necesarias para la formación de n-butanol en algunos organismos, particularmente la especie *Clostridial*, y también comprenden una etapa del ciclo 3-hidroxiisobutirato/4-hidroxiisobutirato en las arqueas termoacidófilas de los géneros *Sulfolobus*, *Acidianus* y *Metallosphaera*. Pueden encontrarse ejemplos de genes que codifican enzimas crotonasas en *C. acetobutylicum* (Atsumi et ál., Metab Eng 10:305-311 (2008); y Boynton et ál., J. Bacteriol. 178:3015-3024 (1996)), *C. kluyveri* (Hillmer y Gottschalk, FEBS Lett. 21:351-354 (1972)), y *Metallosphaera sedula* (Berg et ál., Science. 318:1782-1786 (2007)) aunque la secuencia de este último gen no se conoce.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>crt</i>	15895969	NP_349318.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>crt1</i>	153953091	YP_001393856.1	<i>Clostridium kluyveri</i>

Las enoil-CoA hidratasas (EC 4.2.1.17) también catalizan la deshidratación de sustratos de 3-hidroxiacil-CoA (Agnihotri y Liu., J. Bacteriol. 188:8551-8559(2003); Conrad et ál., J. Bacteriol. 118:103-111 (1974); y Roberts et ál., Arch. Microbiol 117:99-108 (1978)). La enoil-CoA hidratasa de *Pseudomonas putida*, codificada por el *ech*, cataliza la conversión de 3-hidroxiubutiril-CoA en crotonoil-CoA (Roberts et ál., Arch. Microbiol 117:99-108 (1978)). Otros candidatos de enoil-CoA hidratasa son el *phaA* y *phaB*, de *P. putida*, y *paaA* y *paaB* de *P. fluorescens* (Olivera et ál., Proc. Natl. Acad. Sci EUA 95:6419-6424 (1998)). Se prevé que el producto génico de *pimF* en *Rhodopseudomonas palustris* codifique una enoil-CoA hidratasa que participe de la degradación de pimeloil-CoA (Harrison y Harwood, Microbiology 151:727-736 (2005)). Por último, se ha demostrado que una cantidad de genes de *Escherichia coli* muestran funcionalidad de enoil-CoA hidratasa, lo cual incluye *maoC* (Park y Lee, J. Bacteriol. 185:5391-5397 (2003)), *paaF* (Ismail et ál., J Biochem. 270:3047-3054 (2003); Park y Lee, Appl. Biochem. Biotechnol 113-116:335-346 (2004); y Park y Yup, Biotechnol Bioeng 86:681-686 (2004)) y *paaG* (Ismail et ál., J Biochem. 270:3047-3054(2003); Park y Lee, Appl. Biochem. Biotechnol 113-116:335-346 (2004); y Park y Yup, Biotechnol Bioeng 86:681-686 (2004)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>ech</i>	26990073	NP_745498.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaA</i>	26990002	NP_745427.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaB</i>	26990001	NP_745426.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>phaA</i>	106636093	ABF82233.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>phaB</i>	106636094	ABF82234.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>pimF</i>	39650635	CAE29158	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>maoC</i>	16129348	NP_415905.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaF</i>	16129354	NP_415911.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaG</i>	16129355	NP_415912.1	<i>Escherichia coli</i>

De manera alternativa, los productos génicos de *E. coli* del *fadA* y *fadB* codifican un complejo multienzimático involucrado en la oxidación de ácidos grasos que presenta actividad de enoil-CoA hidratasa (Nakahigashi e Inokuchi, Nucleic Acids Res. 18:4937 (1990); Yang, J. Bacteriol. 173:7405-7406 (1991); y Yang et ál., Biochemistry 30:6788-6795 (1991)). La inactivación de un regulador negativo codificado por el *fadR* puede utilizarse para activar el producto génico *fadB* (Sato et ál., J Biosci. Bioeng 103:38-44 (2007)). Los genes *fadI* y *fadJ* codifican funciones similares y se expresan de manera natural en condiciones anaerobias (Campbell et ál., Mol. Microbiol 47:793-805 (2003)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>fadA</i>	49176430	YP_026272.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadB</i>	16131692	NP_418288.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadI</i>	16130275	NP_416844.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadJ</i>	16130274	NP_416843.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadR</i>	16129150	NP_415705.1	<i>Escherichia coli</i>

6.2.1.a Ácido-tiol ligasa (también denominada «CoA sintetasa»). Las Etapas I y M de la Figura 13 necesitan la funcionalidad de ácido-tiol ligasa o CoA sintetasa para transformar 6-ACA y 6-acetamidohexanoato en sus correspondientes derivados de CoA (los términos «ligasa», «sintetasa» y «sintasa» se usan de manera intercambiable en la presente memoria y hacen referencia a la misma clase de enzimas). Las enzimas que catalizan estas transformaciones exactas no se han caracterizado hasta ahora; sin embargo, se han descrito varias enzimas con especificidades de sustratos amplias en la bibliografía. La acetil-CoA sintetasa formadora de ADP (ACD, EC 6.2.1.13) es una enzima que acopla la conversión de ésteres de acil-CoA en sus correspondientes ácidos con la síntesis concomitante de ATP. Se demostró que la ACD I de *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por AF1211, funciona en una variedad de sustratos de cadena lineal y ramificada que incluyen el isobutirato, isopentanoato y fumarato (Musfeldt y Schönheit, J. Bacteriol. 184:636-644 (2002)). También se demostró que una segunda ACD reversible en *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por AF1983, tiene una amplia variedad de sustratos con actividad alta en los compuestos cíclicos fenilacetato e indolacetato (Musfeldt y Schönheit, J. Bacteriol. 184:636-644 (2002)). La enzima de *Haloarcula marismortui* (mencionada como una succinil-CoA sintetasa) acepta propionato, butirato y ácidos de cadena ramificada (isovalerato e isobutirato) como sustratos y se demostró que funciona en la dirección directa e inversa (Brasen y Schönheit, Arch. Microbiol 182:277-287 (2004)). La ACD codificada por PAE3250 de la crenarquea hipertermofílica *Pyrobaculum aerophilum* mostró la variedad de sustrato más amplia de todas las ACD caracterizadas, y reaccionó con acetil-CoA, isobutiril-CoA (sustrato preferido) y fenilacetil-CoA (Brasen y Schönheit, Arch. Microbiol 182:277-287 (2004)). Se puede usar la modificación genética o evolución dirigida para modificar esta enzima para que funcione a la temperatura fisiológica del organismo hospedador. Las enzimas de *A. fulgidus*, *H. marismortui* y *P. aerophilum* se han clonado, expresado funcionalmente y caracterizado en *E. coli* (Brasen y Schönheit, Arch. Microbiol 182:277-287 (2004); y Musfeldt y Schönheit, J. Bacteriol. 184:636-644 (2002)). Un candidato adicional es la enzima codificada por el *sucCD* en *E. coli*, que cataliza de manera natural la formación de succinil-CoA a partir de succinato con el consumo concomitante de un ATP, una reacción que es reversible *in vivo* (Buck et ál., Biochemistry 24:6245-6252 (1985)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>AF1211</i>	11498810	NP_070039.1	<i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 4304

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>AF1983</i>	11499565	NP_070807.1	<i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 4304
<i>SCS</i>	55377722	YP_135572.1	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049
<i>PAE3250</i>	18313937	NP_560604.1	<i>Pyrobaculum aerophilum</i> cepa IM2
<i>sucC</i>	16128703	NP_415256.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>sucD</i>	1786949	AAC73823.1	<i>Escherichia coli</i>

Otra enzima candidata para esta etapa es la 6-carboxihexanoato-CoA ligasa, también conocida como «pimeloil-CoA ligasa» (EC 6.2.1.14), que activa de manera natural el pimelato para formar pimeloil-CoA durante la biosíntesis de biotina en bacterias grampositivas. Se demostró que la enzima de *Pseudomonas mendocina*, clonada en *E. coli*, acepta los sustratos alternativos hexanodioato y nonanodioato (Binieda et ál., Biochem. J 340 (Pt 3):793-801 (1999)). Otros candidatos se encuentran en *Bacillus subtilis* (Bower et ál., J. Bacteriol. 178:4122-4130 (1996)) y *Lysinibacillus sphaericus* (anteriormente *Bacillus sphaericus*) (Ploux et ál., Biochem. J 287 (Pt 3):685-690 (1992)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>pauA</i>	15596214	NP_249708.1	<i>Pseudomonas mendocina</i>
<i>bioW</i>	50812281	NP_390902.2	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>bioW</i>	115012	P22822.1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>

Otras CoA-ligasas incluyen la dicarboxilato-CoA ligasa de ratas, para la cual la secuencia todavía no se ha caracterizado (Vamecq et ál., Biochem. J 230:683-693 (1985)), cualquiera de las dos fenilacetato-CoA ligasas caracterizadas de *P. chrysogenum* (Lamas-Maceiras et ál., Biochem. J 395:147-155 (2006); y Wang et ál., Biochem. Biophys. Res. Commun. 360:453-458 (2007)) y la fenilacetato-CoA ligasa de *Pseudomonas putida* (Martínez-Blanco et ál., J Biol. Chem. 265:7084-7090 (1990)). Otras enzimas candidatas son las acetoacetil-CoA sintetasas de *Mus musculus* (Hasegawa et ál., Biochim. Biophys. Acta 1779:414-419 (2008)) y *Homo sapiens* (Ohgami et ál., Biochem. Pharmacol. 65:989-994 (2003)) que catalizan de manera natural la conversión dependiente de ATP del acetoacetato en acetoacetil-CoA.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>phI</i>	77019264	CAJ15517.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>phIB</i>	152002983	ABS19624.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>paaF</i>	22711873	AAC24333.2	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>AACS</i>	21313520	NP_084486.1	<i>Mus musculus</i>
<i>AACS</i>	31982927	NP_076417.2	<i>Homo sapiens</i>

Ejemplo XXII

Demostración de la tolerancia de la *Escherichia coli* al 6-aminocaproato

Se realizaron ensayos con *E. coli* para determinar su tolerancia, actividad metabólica y desarrollo durante la exposición a diversas concentraciones de 6-aminocaproato (6-ACA). En condiciones aerobias, los cultivos fueron

capaces de desarrollar medios con hasta un 10 % de 6-ACA, mientras que los cultivos anaerobios pudieron desarrollarse en medios con aproximadamente 6 % de 6-ACA (Figura 15). Dado que la vía para producir 6-ACA podría necesitar condiciones anaerobias, todas las demás evaluaciones se realizaron en condiciones anaerobias. Para realizar ensayos de tolerancia, los cultivos se desarrollaron en condiciones anaerobias hasta la fase logarítmica media (OD de 0,3) y estacionaria temprana (OD de 0,6), las células se centrifugaron y se volvieron a suspender en medio que contenía diversas concentraciones de 6-ACA. Los cultivos se desarrollaron en tubos de microcentrífuga con tapas, se mantuvieron durante la noche y se determinaron mediante ensayos las OD de los cultivos (Figura 16). En estas condiciones, los cultivos fueron capaces de desarrollarse (duplicarse al menos 1 vez) en hasta un 10 % de 6-ACA. La tolerancia adicional podría haber provenido de la glucosa adicional a partir de la resuspensión de los cultivos en medio M9-glucosa recién preparado o a partir del oxígeno limitado presente en el tubo de microcentrífuga con tapa. Para determinar si las células presentaban actividad metabólica en presencia de 6-ACA, se extrajeron muestras y se sometieron a ensayos para determinar la producción de etanol (Figura 17). La producción de etanol (y, por lo tanto, la actividad metabólica) se relaciona estrechamente con la OD, lo cual sugiere que, si hay células presentes, probablemente estas presenten actividad metabólica. Es útil comprender esto ya que sugiere que, aunque el desarrollo de las células puede ser inhibido por la acumulación de un producto, estas pueden seguir produciendo el producto.

En concentraciones altas (> 65 g/L) la osmolaridad del 6-ACA es de ~0,5 M, lo cual puede provocar estrés osmótico. Para determinar el estrés osmótico como la base para la inhibición del desarrollo de 6-ACA, se desarrollaron cultivos en diversas concentraciones de 6-ACA con y sin la glicina betaína osmoprotectora. Como se observa en la Figura 18, se puede lograr un desarrollo anaerobio en medio con hasta 10-12 % de 6-ACA si se encuentra presente glicina betaína, pero solamente 4-6 % sin glicina betaína. Por lo tanto, gran parte de la toxicidad del 6-ACA probablemente se debe al estrés osmótico. Sin embargo, cabe destacar que el 6-ACA es similar al aminoácido lisina y podría tener un mayor efecto tóxico en el citoplasma celular con respecto al exterior de la célula.

Ejemplo XXIII

25 Demostración de actividad enzimática para condensar succinil-CoA y acetil-CoA para formar β -cetoadipil-CoA

Se ha demostrado que varias enzimas β -cetotilasas descomponen β -cetoadipil-CoA en acetil-CoA y succinil-CoA. Por ejemplo, los productos génicos codificados por el *pcaF* en *Pseudomonas* cepa B13 (Kaschabek et ál., J. Bacteriol., 184(1): 207-15 (2002)), *phaD* en *Pseudomonas putida* U (Olivera et ál., Proc Natl Acad Sci EUA, 95(11), 6419-24 (1998)), *paaE* en *Pseudomonas fluorescens* ST (Di Gennaro et ál., Arch Microbiol., 188(2), 117-25 (2007)), y *paaJ* de *E. coli* (Nogales et ál., Microbiology, 153(Pt 2), 357-65 (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. Para confirmar que las enzimas β -cetotilasas presentaran actividad de condensación, varias tiolasas (Tabla 10; SEQ ID NOS: , respectivamente) se clonaron en un derivado de pZE13 (Lutz et ál., Nucleic Acids Res, 29(18), 3873-81 (2001)), lo cual conduce a que los clones tengan una etiqueta 6xHis de extremo carboxi.

35 Tabla 10: Tiolasas clonadas

Enzima	Plantilla de especie	Gen	Longitud	CEBADOR 5'	CEBADOR 3'	SEQ DE ORF
beta-cetotilasa	<i>Ralstonia eutropha</i> H16	bktB	1185	ATGACGCGTG AAGTGGTAGT GGTAAG	GATACGCTCGA AGATGGCGG	atgacgctgaagtggtagtgtaagcgggtgctccgaccgcatcgggacatttgccg gcagcctgaaggatgtgacacggcgagctggcgcaactggtgtgcgcgagggc gctggcgccgcgcaggtgtcggcgacgatgtcggccacgtgtatttcggcaactg gatccagaccgagccgcgcacatgtatctggcgccgtcgcggcgtcaacggcg gggtgacgatcaacccccgcgctgaccgtgaaccgctgtgcggctgggcttgc aggccattgtcagcgccgcgcagaccatcctgtggtggcgataccgacgtccatcg gcggcgccgcggaagcatgagccgcgcacccgtacctggcgccgcagcgctg ggcgccacgcatggcgacgcccgtgtgacatgatgtgtgtgcgtgcacg atccctccatcgcacacatggcggtgacggcgagaatgtcgccaaaggaaataga catctcgcgcgcgcagcagacgagccgcgctggaatgcaccgcgcgcttgcg cagcgatcaaggccgctacttcaaggaccagatctcccggtgtgagcaaggcc gcaaggcgacgtgaccttgacacgacgacgacgtgcgcatgacgccaccatc gacgacatgaccaagctcagcgccgtcttctcgaaggaaacgcacggtcacgccc ggcaatgctcgggctgaacgacgcccgcgggtgtgtgatgtggcgccgc cgaagccgagcgccgctgaagccgctgcccgcctgtgtgtacggccatg ccggcggtgaccgaaggccatggcgtcggccggtgcgcgcgacgaagatgc gctggagcgccggcctgcaggtgtcggacctgacgtgatcgaaggccaagaag cccttggccacagcgctgcggcgtgacaaaggcgtcgtgtgacccggccaagg ttaaccggaacgctggcgtcgtcgtggccaccgcatcggcgccaccggtgccc tgatcacggtgaaggcgctgatgactgaaccgctgcaaggccgctacgcgtgg tgacgatgtcatcgcgccggcgaggcattggcccatcttcagagctatctga

Enzima	Plantilla de especie	Gen	Longitud	CEBADOR 5'	CEBADOR 3'	SEQ DE ORF
2-metilacetoac etil-CoA tiolasa (¿cadena ramificada?)	<i>Mus musculus</i>	ACA T1	1215	ATGGAAGTAA GATGCCTGGA ACGAAG	CAGCTTCTCAAT CAGCAGGGC	atggaagtaagatgcctggaacgaagttatgcatccaaaccactttgaatgaagtgggt atagtaagtgcataaagaacccattggatctctctggcgagcccttgcctctagccg gccactaaacttggactgctgcaattcaggagccattgagaaaggcagggttccaaa agaagaagtgaaagagctacatggcgaatgcatccaaggggggaaggacagg ccctaccaggcgaagcaacactggcgaggtttaccatttccactccatgcaccaca gtaaacagggtttgcttcaggaatgaaagccatcatgagcccttcaaatgtctatgt gtggacatcaggatgtggtggcgagcgaggatggagagcatgtccaatgtccata cgtaatgagcagaggagcaacacatattgggtgtaaaacttgaagacctgattgla aaagacgggctaactgatgctacataaaatctatgggttaactgtgctgagaatact gcaagaagatgaatctcagcgaggaacagagatacgtacgtctcagctctacac cagaagtaaaagagcggtggcagcgaggaaggtttgccagtgagattaccctacc atctcagtgaaaggtaaaccagatgtggtggtgaaagagatgaaagaatacagcgtg ttgactttagtaaaagtccaaagctcaagaccgtgttcagaaagaaaatgcacaala acagctgccaatgccacacatgaacatggagcagctgctctgttctcatgactgc agaggcagccagagctcaatgttaagccattggcacgaattgcagcatttgcgatg ctgccgtagacccattgtttccacttgcgcctgcatatgccgtaccataagggtctaaa tatgcaggactgaaaaagaaacattgccattgtgggaagtaaatgaagcattcagtg
						ggttgtgctagccaacatlaaaatgctggagattgaccccaaaaagtaaatccacg gaggagctgttctctggccatccaattgggatgtctggagcccgattgtttcatat ggctcagccctgaagccaggagagcttggctggtgctgatttgcacaggaggaga gggtctccgcccgtgattgagaagctgtag
2-metilacetoac etil-CoA tiolasa (¿cadena ramificada?)	<i>Pseudomonas putida</i> (KT2440)	fadA x	1194	ATGACCCTCG CCAATGACCC	GTACAGGCATTC AACAGCCATGG	atgaccctgccaatgacccatgcttattgctagegccgtgcgcagcccatggcg ggttgcaggcgacctaagagcctgactgcgccgaactggcgagcgccccattc gtgctgccgtggaacggccgcatcgatgccgccgtgtcagcaggtaactgttcg gtcgtgctgcccggccgagggcagcgaccggcagccagcccgctggg cgccgggctggacaagcacaccactgcaccacctgaacaaagatgtcggtctgg gtatgcaagcccgatcatggcccatgacctgtgctgcccggcaccgcagacgtgg tagtggcggtggcatggaagcatgacaaagcgccgtacctgctgacaaagccc gtggcgctaccgcatggccacggcaagatcatgaccacatgttcatgacgggtct cgaagacgctcagacaaaggccgctgatgggtaccttggcaggactgtgccca ggccaatgccttcagcgcgaggccaggaccagttcgccatcgctcgtgacccg agcgaggaagccatcagcagcgccgttttgcggccgagatcgtccgggtggaagt caccgaggcgaaagaaaagcgctcatcaaggatgacgagcagccccaaggcg cgctggacaagattgcgagctcaaacggcggtttcgtgaaaggcgacgtgacg gggccaacgccatttcgatttccgacggcgctggcgctggtactgatggcgct ccgaggccgacaaacgtgctcaagccattggccgtcatccagggccacggcgct ttgccgacaccccgcgctgttcccgaccgcccgaicggcgcgatcgacaaactgat gaaacgacccgctggaacctggccgaagtcgacctgttcgagatcaacagagccct cgccgtgttccacctggcgccatgaaacacctgcacctgccaacgacaaagggtcaa tatccacggcgcgctgcgcccgtggtcaccgacggcgcttctggcgacgtatt ctggtcacccgtgttctggccttgcggagaacaatctgcgtcgggtgtggcgccat ctgcatcgcggtggcgagggccagccatggctgttgaatgctgtactga

Enzima	Plantilla de especie	Gen	Longitud	CEBADOR 5'	CEBADOR 3'	SEQ DE ORF
beta-cetotiolasa	<i>Caenorhabditis elegans</i>	kat-1	1167	ATGAACAAAC ATGCTTTCATC GTCG	TAATTTCTGGAT AACCATTCCACT TGAGC	atgaacaaacatgctttcatgctcgagccgccgtacacctattggatcattgcttctc tctctctcggttaactgctccagagctcgctcggttgcatacaagcagcattggagcg tggagcagtggaagccgagttcaatcaggaggtgttcttggcgaagctgtcaagcaa atgctggtcaagctccgctcgtcaagcagcttggagccggactcgalcttctggtt ctgttaccaccgtcaataaagtgtgctctcttgggtgaaagcaatcatttctgctccca gcaaatlcaaacgggtcatcaagatttgcattggcgagggaatggagagcatgtcac aagtaccattttatgttcaagagagagatcccatatgttggatttcaagtgattgatgg aatcgtcaagagcagcgtaccgatgtttatgataaagttcacatgggaaactgcggag agaagacttcaaaagaatgggaattacacgtaaaagccaaagacgaatgtctatcaa cagctacaaaagtcagctaaagcgtgggagaatggaaatcggaccagaaagtgtgt gccagtgaacgtcaataaagaaggagtcacgattgtgataaagatgaagagtica caaaagtcaatttcgaagattcacctcgctgagaactgtttccagaaagcggaaacta tcactgctgctaattgttcaacattgaacgacgggtgcagctgctgtattgttgcctaca ggaaagctgttccgagcaagcttaagcccttggcccgaaatttggcttatggagatgc cgccacgacccactcgtttcgtctagcacaacttggatgtcccaaaatcttga agagcaggagtgaaagcaatcagatgttgcataatggaaagttaataagccttctcatgt gttcccttgccttcaaaaaactagagctgacatcccttgaacccacatgcagag gagctgttcaattgtcaccctcgaatgcccagccgcctcatcactcatctgt gcacacactcaaaagtggccaatcggagtgtgctgccattgcaatggaggtgtggct caagtgaatggtatccagaattataa
beta-cetotiolasa NP_415915. 1	<i>Escherichia coli</i>	paaJ	1206	ATGCGTGAAG CCTTTATTGT GACG	AACACGCTCCA GAATCATGGCG	atgcgtgaagccttatttgcaggaattcgtacgccaattgctcgtacggcgggca ttatcaagtgtlccggcgtgatgtatcgttgccttgcgggaactgctggtgcgaa accgcgctcgtatgcggagtgtatcgtatgtatccttgcctgtgtatcaatcagcg ggagaaataaccgttaacgtagccgggtggcacttactggcgggctgcgcag agtgttccggcacaacatcaccgttgtgtgtlccgggctgacgcactgggtt gccgcacggcgatttaagcggcgatggcgatttgcgtatccgggtggctggag tcaatgtcacggcaccgttttattggcgaagcagccagtcttctgtcagcgt gagatgttcgatacactattggtggcgatttgaacccgctcatgctcagcaattt gaactgacagcatccggaaacgcagagaatgtagctgaactgttaaaatcagc agaagatcaagatatttgcgtacgacgtcagcaacgtacggcaaaagcgaatcc tcaaggcattctgctgaggaagtgttccggtgtgttgaaaaacaagaagggtgtga acaagaatacaacatgatgacatctgcgccggaaacgacgctggaacagtacgtg ggttaaaagcaccatttgcgcaatgggtgattaccgagcgaatgttccgggtg aatgacggagccgctgcgttatttggcagtgaaacagtgacgacgcaagga ctgacaccgcggcgctatcgtgacgtgcaacccgccgggtggaacccgcgct gatgggcttgcgggtgcctgcaactgcggcggtgctggaacgcgacgggtgag tattcacgatatggagtgattgaactgaacgaagcgttcgcgccagggcgttgggtg tactacggaattggcgctgctgatgtgccccacatgttaaccccaacggagcgct atcgcttagccatccgttgggaatgagtggtgcccgccgtgcatgctgtccagcc
						atgagctgcatcggcgtaacgctgttacgattgtgcacatgtgcatcgtgtcggtc agggcatcccatgattctggagcgtgttga
beta-cetotiolasa AAN68887.1	<i>Pseudomonas putida</i> (KT2440)	phaD	1221	ATGAATGAAC CGACCCACGC C	GAGGCGCTCGA TGATCATGG	atgaatgaaccgacccacgccgatgecttgatcagcagccgtgcgcgacgccattg gccgctatgcccggggccctgagcagcgtgcgcgccgacgacctgcccgcacccg ctcaaaagccttgatccagcgtaccccgaaactgactggaagccattgatgacttatt cttcggctgtgccaaccaggctggcgaaacacaccgcaacgtgcccacatggcgga gectgctggcggcgtgccactcgaagtaccagggaacacgatcaaccgctgtgcg gttccggctcgtgagocacggtaalgcgccacgtgccccgcgctgcggtaagcggg gctcatgctgcccgggtgtgtgagtgccatgtcgcgtgcaactgttggatggtaagt cgagcaggcatcggcgctgcccgaagctgttcgacaccacacatggcgtggcgttt cgtcaaccgctgatgaaggccctacgcatcgtattgatgccggaacggcgtga aaactgtggcgaacagttcggcatctgcgcgccgaccaggatgctttgccctgcgc agccagcacaaaagccgacagctcaggcccgccgctgcccgggaaatcgt tgcgggtcgaatcccgcaacgaagggcccaaggaagtgtgagcatgacgag caccgcgcggcagacagccctggagcagctgctcggctcggagcggcgttctgt gaaggcggcagcgtaacggcggttaatgctctccggcgtgaatgacggcgttgcgc cctgctgctgcccagcagccgcgcccgcccgcatgggtgaaggcccgccggc gcaticgtcgcatggcgttggccgggttgaagccaggctgatggcattgtccgg tgcctgcgaccgaaaggtgctgctgcacggcctgcaactggctgacctggaatgt catgaactcaatgaggccttggcgcccaaggcgtgcgctgttgcgcagctggc ctggcgacgacgacccgcgagtcacccgcaacggcgcgccatcgccctgggccc atccctgggcatgagcggttgcgggttggtagccactgcttgcagagcttgaaga aacggccggccgtacgccccgtgacacatgtgcatcggcgtaggccaaggcattgc catgatcagcagcctctga

Enzima	Plantilla de especie	Gen	Longitud	CEBADOR 5'	CEBADOR 3'	SEQ DE ORF
beta-cetotiolasa NP_349476.1	<i>Clostridium acetobutylicu</i> mATCC 824	thiA	1179	ATGAAAGAAG TTGTAATAGCT AGTGCAGTAA GAAC	GCACTTTTCTAG CAATATTGCTGT TCC	atgaaaagagttgtaatagtagtcagtaagaacagcgattggatcttatgaaaagctct cttaaggatgtaccagcagtagatttaggcagctacagctataaaggagcagttaaaaa agcaggataaaacacagagatgtaataagtcattttggaatgttccaagcagg tttaggacagaatccagcaagacaggcatcttttaagcaggattacagttgaaatcc agctatgactattaataaggtttgtgttcaggacttaaacagtagcttagcagcaca attataaagcaggagatgctgacgtaataatagcaggtgtgtatggaaaatagctaga getccttacttagcgaataacgctagatgggatafagaatgggaacgctaaattgtt gatgaaatgacactgacggatgtggatgcatthaafgattaccacatgggaataaca gcagaaaacatagctgagagatggaacattcaaggagaacacaaatgagttgtcct tgcatacaaaaaaagctgaaagaagctataaaatcaggtcaatttaagatgaatagt tcctgtagtaattaaaggcagaaaggagaacgtgtgtgatacagatgagcacccta gattggatcaactatagaaggacttgcataaataaaacctgccttcaaaaaagatggaa cagttacagctgglaatgcaicaggattaaatgactgtgcagcagtagcttgaatcatgag tgcagaaaaagctaaagagcttggagtaaaaccactgctaaatgttcttatgtgttca gcaggagttgacccagcaataatggatagggaccttttctatgcaacaaaagcagctatt gaaaaagcaggttgcacagttgatgaattagatttaatagaatcaaatgaagctttgcag ctcaaaatttagcagtagcaaaagatttaaaattgatafagaataaagtaaatgtaaatgg agagcctattgccctgtgcatccaaftggagcagagtgcaagaatactgttactctt gtacacgcaatgcataaaagagatgcataaaaggcttgcacactttatgtataggtgg cggacaaggacacgaatattgctagaaaagtgctag
beta-cetotiolasa NP_149242.1	<i>Clostridium acetobutylicu</i> mATCC 824	thiB	1179	ATGAGAGATG TAGTAATAGT AAGTGCTGTA AGAACTG	GTCTCTTTCAAC TACGAGAGCTGT TCCC	atgagagatgtagtaatagttaagctgtgaagaactgcataaggagcatatggaaaaac attaaaaggatgacctgcacagagtttaggcagctatagtaataaaggagctgtgaagaa gagctaatataatccaaatgagattaatgaattatttttgaatgtacttcaagctgga ttaggccaaaacccagcaagacagcagcagtaaaagcaggattacctttagaanaac ctgcgtttacaaatataaggtttgtgttcaggttlaagatctataagtttagcagctcaaa ttataaagctggagatgctgataccattgtagtgggtgtatggaaaatagctagatc accatatttgattaaacatcagagatgggtgcataaagaatggagatagtgaaattagtga tgaatgataaagatggtttgtggatgcatthaatgatacatatggagtaactgca gaaaatattgcagaacaaatggaaataaacaagagagcagagaaatgttactttag tcacaacaaaagctgaaaaagccattaaaatggagaatttgaagatgaatattgtcct gtatttaataaagcctaaaaaagggtgaaatagctcttgcataagatgaatttctagattcgg aaacactattgaagcattaaagaaacttaacctatttcaaggaaaaatgttactgttaca gcaggtaatgcacccggattaaatgatggagctgcagcactagtaataatgagcgtgga taaaagtaacgctcctggataaaaccactgctaaattacttctacgatacatggg gtagatccatcaataatggagatgagcgtttttatgcaactaaagctccttagataaaat taatttaaacctgaaagacttagatttaattgaagcgaacgagcatatgcttcaaaagta tagcagtaactagagatttaatttagatagatgaatgaatgaatgaatgggagctata gcacttggacatccaatagggtgcatctgtgtgcacgtatttttagtaacttactatagctat gcataaaagagattcaaaaaaggcttgcactctatgtattgtggaggtcaggga
						cagctctcgtagttgaaaagagactaa
3-oxoadipil-CoA tiolasa	<i>Candida albicans</i> SC5314	POT 9 8	1182	ATGTTCAAGA AATCAGCTAA TGATATTGTTG	CTCGTTAGCAAA CAAGGCAGCG	atgttcaagaatcagctaatgatattgtgttattgcagcaaaagagaactccaatcacc agtcattaaagggtgggttgagtagattatttccctgaggaataattatcaagtggttaag ggtagctgatacagatcacaagttgatttaaacgtgattgatgatggttagtgcgtgagctg ttgcaacttttaggggacagcaaaagctagtgcccttgccattaaaaagattggattccca attaaagaccacgggttaaacgggtcaatgctaatgtgctagctgtgctcaagcgattactta tcaagcaggtagtttgcgtagtggggagaatcaatttgcattgctgctggagtagaag tatgactcatgattatttctcctatcgtgggattcccaagaatttctgaatcatttttagctg atgcacccgatgaagcctaaaacgtctgtatgccaatgggataaccagtgaaaatggt gccactaaatggaatttctgtaaacacaagatgatttgccttaatttctcatttgaa agcagacaaggctcacaacacgggtcattttgcaaaaagaatcattcttcaacaac ggatgaaaaaaccaacacgtttcaataaaccagagatgggtataggggaagtgtcaa caattgaaaaagttgggtgcttaaacctgtgttcaaggatgagggactactactgtg gtaattctcgcataatttcagatggaggtctgtgtgatttaactactctcaaaatgct gagaaatcgggagataaagccaatagctagatttattgttctgtagtgcgtgtgttccct cgggactttagggaaattggtccatcgctgtatttcccaattgtgtcagattaaatgtt gacacgaagacatgattattttgaattgaacgaggtcattgcatcccaactgattatg tatgaaaaattgggtctgtattgataaagtcacatattggtagctatagccttgg gacatccattaggccactggcgcaagagttacgcaacgttgccttaatgattaaaa gatcagaataaagagttgggtgtcctcctaatgtgcacatccacaggctcaagatagc tgccctgtttgcaacgagtag

[illegible]

Enzima	Plantilla de especie	Gen	Longitud	CEBADOR 5'	CEBADOR 3'	SEQ DE ORF
beta-cetoadipil CoA tiolasa pcaF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA O1	pcaF	1206	ATGAGCCGCG AGGTATTCAT CTG	GACCCGCTCGAT GGCCAG	atgagccgcgaggtattatctatctgcatgccgtgacacgccgacggccgtttcggcg geagtccttcgcgggtgcgcgcgacgacctgcggcggtgccgtgaagccctgg tcgagcgcaaccgggggtcgaatggcgttgacgaggtgttctcggctggc ccaaccaggccggcgaggaacaacgtaacgtggcgccgcatggcgctgctgctggc ggtttgcggagagcgtgcccggcgacacctcaaccgctctgcgctcgggagtg gacgccatcgccacggcgttcgcgcacgcctgcggcgagatggagctggccatc gccggcggtcgtgagtcgatgtcgcgcgcgcctacgtgatgggcaaggccgatag cgcttcgtcgcggccagaagatcgaaggacaccaccatggctggcgcttcgtcaat ccgctgatgaaggagcagtgacgcatcgaccgatgccgagaccggcgacaacgt cgccgacgactatcggtcgtgcgtgacacagatgcttcgcccgtgcgagcca gcagcgccggcgaggcgaggcgccgtttcttcgccgaggaatcgtcccgg tgacgaltcggcgcgcaaggcgacacctggtcgacacgacgacatccgctg cccgaaccaccctggaggcgctggccggctcaagccggcgaacggcgaggaga agaccgtcaccggcgcaacggcggcggtcgaacgacggcgccggcgctggt cctggcctccggcgaggcagtggaagacgacggcctgactccgcgcggggtgc tgggcatggccagcgccggcgctcccacgcatcatggcgtcggccgggtgcg gggtgcgcaagctgctgcggcgctggacctggcgatcgacgcttcgacgtgatc gaactaacgaagccttcgccagcaggcgctggcctgctgcggaactggcggtg gccgacgacagtgagagtgtaacccgaacggcggtgacatcgccctggccaacc gctggcgatgagcggtgcgcggctgctcaccgcgctcatcaactgagaagag cgggcgccggcgcgccctggcgaccatgtcgtagcggtcggccaaaggcctggcg ctggcatcgagcggtctga
acil-CoA tiolasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA O1	bkt	1206	ATGCTCGATG CCTATATCTAC GCC	TCGGCAGCGCTC GATCAC	atgctcgatgcttatctacggcgctgcgtacgcttcggcgccgatggcgtg actctcgacgtggtcgcggacgacctggccggcctgctgaggcgctcgggga aacctccgggttcggcgcgacgacctgagagatggaactcgggttgcaccaacag gcggcggaagacagcccgcaacctggcgcgcaacgcgctctcgcaaccgctgc cgcgcggtcgtcccgcgagacggtcaacgcttgtgtgccagggactgtcgcg gtgatcgacggcgcgcgatcagttgcggtagggcgccgtgtaacctggcg cgcgccggaagcatgtcccggcgccgttcgtcatggcgaaaggcgagagcgct tcagccgacgctgaggtcttcgacagcaccatcgcgcgcgcttcgccaacc ggctggtcgaagcgtatggcaacgacagcatgccggagaccggcgacaacgtggc cgcgcttcggcatcgccggaagacgcgacgcttcgctcttctccagggcg gtaccaggctgcgctggagagggctttcttcggcgatcctccgggtggaggt gcgtgcccggacgaaggcgagagcgcggtggtggagcgacgacatccgg accgagggcgacgtggcgccctgcgcgcttgcggcggtgttcggcggtgggt agtgaaccggtaatgcgtctggatcaacgacggcgcgggtagtgcgtggg cgatcgcgatcgcgagcgagggcatccggcggttggcgatcctcgcca gcgccagcgctcgcgctgagccccggttgatggcgatcgcccgacgagcgatc ctccgcgcgtgcaacgcggcgcatcgacctggacgaggtcgccctgacgagatc
						aacgaagccttcgcggcgaggctcgtggcctgcctgaagttgctcgccgtgactacg aggaccgcgggtcaatcccatggcgccgacgttgcctcggccatcgctcgcg cctccgtgcggcctggtgctacgcggccggcggtcgcaacgacatcgagcg cgctacggcggtgctagcctgtgctggcgctcgccaggcggtggcgatgtgatc gagcgctgcccgtga

Enzima	Plantilla de especie	Gen	Longitud	CEBADOR 5'	CEBADOR 3'	SEQ DE ORF
3-oxoadipil-CoA tiolasa	<i>Pseudomonas putida</i> (KT2440)	pcaF	1203	ATGCACGACG TATTCATCTGT GACG	AACCCGCTCGAT GGCCAAC	atgcacgacgtattcatctgtgacgccatccgtaccccgatcgccgcttcggcgccgc cctggccagcgtgcccggccgacgacctgccgcgtgcccgtgaaggcgtgatcg agcgcaacccfggcgtagtgggaccaggtgagcgaagtgttcttggctgccc accaggccgggtgaagacaaccgcaacgtggcccgcacgtgctgctggccgc ctggcgaaagcatcccggcggtcacctgaaccgtctgtgcccgtcgccatggat gccgtcgccaccggttccggccatcgccagcgccgagatggagctgtgattgcc gggtggcgtagcgtgatgcccgcgcctcggttcgtatgggcaaggctgaagcgc tattcgcccaacatgaagctggagacaccacctggctggcgtttcatcaaccgct gatgaagacagctacgggtgtgattccatgccgaaaccgcccagacatgtggcga cgactalcaggttgcgtgtgatcaggacgtttcgccctgcgcagccagcagaag gtgcccgtgcgcaggtgcccgttcttggcgaagaatcgtccggtgctgatcg ctcacaagaaggcggaatcgtcgtgaacgtgacgaacacctggcccggaaacca cgctggagcggtgaccaaagctcaaacgtgcaacggcccggacaagacgttacc ggcggaacgctcggcggtgaacgacgggtgctggccgatgctgctggcctggc cgacgggtgaagaacacggcctgactcgcgtgcccgcgttctggcgtgcccag cgcgcggtgtgcccacgtgcatgggcattggcccgggtggcggtgctgcaaaact gaaccgagcgtctgggatacggtatgatttcgacgtgatcgagcttaacgaagcg ttggccagcaaggcctggcggtgctgctgagctgggtgctgacgtacgtgccc aggtlaaacctlaattggcggtgcccattggccctgggcccacccctggcaltgacggg cacgctggtactgactgctgacacagctggagaagaaggcggtgcgaaggcc tggcgacctgtgtgtgggtgctggccaaggtctggcgttggccatcgagcgggttllg a
3-oxoadipil-CoA tiolasa	<i>Burkholderia ambifaria</i> AM MD	bkt	1203	ATGACCGACG CCTACATCTGC G	CACGCGTTTCGAT CGCGATC	atgaccgacgcctacatctgcgatgcgattcgacacccatcgccgctacggcg gccctgaagacgttctgcccagcatctggcggttgcgctcaaggcgctgaltc gaacgcaaccggaaacgtcgtgctggcgatcgacgacgtgaltatggctggcg aaccaaggccggcgaaagacaaccgcaacgtcgccgatgctggcggtgctggcg cttggcgaccgctggcgggcagacgacgtgaaccgggtatgctggcgtggcgatgga cgccgtggcgacggccgcccgcgcgcatcaaggcgggcggaaggacgcttgatgac gcggcgggcgctgaaagcatgacgcgcgcgcccgttctgtatggcgcaaggccgca gcgcatlccgcccagggctgcatgttgcacacgacgacgtggcgttcttaltatc cgctgatgaacagcaatcgccgtcgatcgtgcccagagcgccgagaacgtcg cgctcgactacaacatcagccgcccagacaggtatctatcgccgtgcgagccagc agaaggccgcccgtgcccagcagacggcagcgtcgcgccgaatctcccctgctc acgattgcccagaaaaagcgacgcgctcgtgctgacgctcgcagcagcatccgcgc gaaacatcgctcgaagcgtcgcgaagctgaaggcgctgctgctcccagcgcgtcg gtcacggccgcaacgcgtcagcgctcaacgacggcgcatggcactgctgctgc caacgcgggaagccgccgataatggcgctgcgccgcgcgctgtgctgctgcat ggcgagcggcgctcgaagccgctgattggtatcgcccggcgccggccacg cagaactgttggccagcgtcgcatgacgacgacgacgtgacgtgacgtgacgtga acgaagcgttcgctcgcaaggctcgcgtgctgcgcatgctgctgctgcccagc acgatccgcgctgaaccccaacggcggtgacgtgcgctggccatccgctggc gcatcggtgctgcgctgtgacacggcgcttcaccaactgagcgtacggcg ccgcttggcgtctgtacgatgtgcatcgccgtcgccagggcagcgcgacgtgcgac gaacgcgtgtaa
beta-cetotiolasa	<i>Ascaris suum</i>	bkt	1242	ATGGCCACCT CAAGACTTGT CTGC	CAATTCTCGAT GACCATTCACC	gtgatggccacctcaagactgtctgcagcaatthaagcaatgctttacgatctgt cacgtgctgtagcccaattaccgatgtgtatctgtgggtgcccgcagcaaccggtc ggatcgttctgctcttgccttccactgttccagccactgtctcggagctgaggtat gggtgcaacttaaacatgccaaactaaacccctcaaaagtgcaagaggtgttcttggcgtg tgtcttccatccaactgtgacaagtctcgtcccgtcaagcgacactgtgagctggatg gcatccttgacaatctgttacaactcaataaattgtgcccctgggaatgaagtcgatt gcttggccgctcactttgcaactgtgtctcaagaagggttaccgttgggtggcggtagg agagcatgagctttagtggcgtacatcttgaacgtggtgaacacttattgttggaaatga agctcaltcagcgtatcccaagagatgtccgactgacatagtagtaactatagg gtgcatggcgtgataatgtgctaaacgattcaacatcccggtgaggaacagataaaa ttcgtattgaaagctataaacgatctgctgcatgggagagtgagcatgcaaaagct gaaagtatttcttattgaagtacaaaaggcgaagaaacataactgtcacaagagatga ggaaatcatcaaaagcaacttcgaagcttcccaaaactgaacccgcttcttgaag acggaaacatcacggcgtggcaatgcttcaacactgaacgatgtgctggcgagttgt gatgacgactgcaaggagcgaataaacggtgtgaacacattggcccgttgc tcatatggtgatggcgcaacaaatccagctgattttgtattgacacatcaatggtatccc aaaggtacttaaatgctaactcagatcaaggatattgattgtgggaatcaacagag
						gcttccgctgttggcccttcatcattgaagacactcggtatcgatcactgaaagtga acattcatgggtggcggtatctcttggacatctattggaaatgctggagctcgaattatc gttcatctgattcatcggttgaacgtggccagaaagcgtcgctgcaatctgcaatggt ggcggtggcgctgtggaaatgtcatcgagaattgtaa

Los genes se expresaron en *E. coli* y las proteínas purificadas mediante el uso de columnas de agitación Ni-NTA y se cuantificaron. Para realizar ensayos sobre la actividad enzimática *in vitro*, se preparó una mezcla 5X CoA:DTNB (reactivo de Ellman o 5, 5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico)). La mezcla consistió en succinil-CoA 10 mM, acetil-CoA 5 mM, DTNB 30 mM en solución amortiguadora Tris 100 mM, con un pH 7,4. Se añadieron cinco µL de la mezcla CoA:DTNB a enzima tiolasa purificada 0,5 µM en solución amortiguadora Tris 100 mM, con un pH 7,8 en un volumen final de 50 µL. La reacción se incubó a 30 °C durante 30 minutos, luego se inactivó con 2,5 µL de ácido fórmico al 10 % y las muestras se congelaron a -20 °C hasta que estuvieran listas para el análisis mediante LC/MS. Debido a que muchas tiolases pueden condensar dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA, se examinó la producción de acetoacetil-CoA. La Figura 19 muestra que 3 tiolases mostraron actividad de tiolasa que produjo la formación de acetoacetil-CoA. Estas fueron *fadAx* de *Pseudomonas putida*, *thiA* de *Clostridium acetobutylicum* y *thiB* también de *Clostridium acetobutylicum*. Cuando se examinan ensayos de enzimas para la condensación de succinil-CoA y acetil-CoA en β-cetoadipil-CoA, varias candidatas mostraron la actividad deseada, *paaJ* de *Escherichia coli* (Nogales et ál., Microbiol. 153:357-365 (2007)), *phaD* de *Pseudomonas putida* (Olivera et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 95:6419-6424 (1998)), *bkt* de *Burkholderia ambifaria* AMMD, *pcaF* de *Pseudomonas putida* KT2440 (Harwood et ál., J. Bacteriol. 176:6479-6488 (1994)) y *pcaF* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Hubo una excelente especificidad entre las tiolases. Aquellas que generaron cantidades significativas de β-cetoadipil-CoA no produjeron cantidades significativas de acetoacetil-CoA y, de la misma manera, aquellas que generaron acetoacetil-CoA no generaron cantidades detectables de β-cetoadipil-CoA.

Ejemplo XXIV

Vías para la producción de hexametilendiamina a partir de glutamato, glutaril-CoA o piruvato y 4-aminobutanol

Este ejemplo describe ejemplos de vías para la producción de hexametilendiamina (HMDA) a partir de glutamato, glutaril-CoA, piruvato y 4-aminobutanol, o 2-amino-7-oxosubarato a través de homolisina, el análogo de siete carbonos de la lisina. La homolisina es un precursor atractivo de la HMDA. Si bien la homolisina es un precursor posiblemente valioso, no es un producto intermedio metabólico conocido de ningún organismo. La homolisina puede formarse mediante biocatálisis a partir de los precursores metabólicos centrales glutamato, glutaril-CoA o piruvato y 4-aminobutanol. La descarboxilación posterior de la homolisina por parte de una enzima análoga a la lisina descarboxilasa proporciona HMDA.

Este ejemplo describe vías adicionales que proceden de 2-amino-7-oxosubarato, o piruvato y 4-aminobutanol a través del producto intermedio 6-aminoheptanal. El 6-aminoheptanal puede convertirse fácilmente en HMDA mediante una aminotransferasa o una oxidorreductasa de aminación.

El rendimiento teórico máximo de HMDA es de 0,71 moles por mol de glucosa utilizado (0,46 g/g). Las vías descritas en las Figuras 20-22 y 26 logran un rendimiento de HMDA máximo de 0,67 mol/mol (0,43 g/g).



En la presente memoria, se describen vías novedosas para producir hexametilendiamina (HMDA) y productos relacionados. Las enzimas candidatas y los riesgos de implementación asociados se describirán en el Ejemplo XXVI más adelante.

La invención se dirige, en parte, a microorganismos de origen no natural que expresan genes que codifican enzimas que catalizan la producción de HMDA. La modificación genética exitosa de estas vías implica identificar un conjunto adecuado de enzimas con una actividad y especificidad suficientes, clonar sus genes correspondientes en un hospedador de producción, optimizar la expresión de estos genes en el hospedador de producción, optimizar condiciones de fermentación y realizar ensayos para determinar la formación de productos luego de la fermentación.

Se puede producir HMDA a partir de glutamato a través de glutaril-CoA en ocho etapas enzimáticas, que se muestran en la Figura 20. En esta vía, el glutamato se acila para formar glutamil-CoA mediante una CoA transferasa o ligasa (Etapa A de la Figura 20). Se une glutamil-CoA y acetil-CoA mediante una beta-cetotiolasa para formar el compuesto C7 3-oxo-6-aminopimeloil-CoA (Etapa B de la Figura 20). El grupo 3-oxo de este producto luego se reduce y deshidrata, lo cual produce 6-amino-7-carboxihept-2-enoil-CoA (Etapas C y D de la Figura 20). Una enoil-CoA reductasa reduce el enlace doble, mediante lo cual se forma 6-aminopimeloil-CoA (Etapa E de la Figura 20). Luego, se convierte 6-aminopimeloil-CoA en 2-amino-7-oxoheptanoato mediante un aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA (Etapa F). La transaminación del aldehído para formar una amina proporciona homolisina (Etapa G de la Figura 20). Finalmente, se forma HMDA como el producto de descarboxilación de homolisina (Etapa H de la Figura 20). El rendimiento teórico máximo de HMDA para esta vía es de 0,67 moles de HMDA por mol de glucosa utilizado. Los cálculos de rendimiento son bajo el supuesto de condiciones aerobias y la utilización de una CoA transferasa en la Etapa A.

También se puede producir HMDA a partir de glutaril-CoA mediante varias vías. Se muestran ejemplos de vías para la producción de HMDA en la Figura 21. La glutaril-CoA es un producto intermedio metabólico común en organismos que metabolizan compuestos aromáticos. En las vías descritas para la HMDA, en primer lugar se condensa glutaril-

CoA con acetil-CoA mediante una beta-cetotiolasa para formar 3-oxopimeloyl-CoA (Etapa A de la Figura 21). El resto de CoA de la 3-oxopimeloyl-CoA se remueve mediante una CoA hidrolasa, transferasa y ligasa (Etapa B de la Figura 21). Varias vías alternativas para convertir 3-oxopimelato en HMDA se delinean en la Figura 21 y describen en la presente memoria. La etapa final de todas las vías para la HMDA implica la descarboxilación de homolisina (Etapa S de la Figura 21).

Una vía implica la conversión de 3-oxopimelato en 3-oxo-1-carboxiheptanal. Esta conversión puede ser catalizada por una enzima dependiente de ATP y NAD(P)H con actividad de 3-oxopimelato reductasa (Etapa C de la Figura 21), o puede producirse de manera alternativa a través de los productos intermedios activados 5-oxopimeloyl-CoA (Etapas H, I de la Figura 21) o 5-oxopimeloyl-fosfonato (Etapas F, G de la Figura 21). Una vez que se forma, el 3-oxo-1-carboxiheptanal se transamina en la posición 3 (Etapa AB de la Figura 21) o posición 7 (Etapa D de la Figura 21). La transaminación posterior de 3-oxo-7-aminoheptanoato (Etapa E de la Figura 21) o 3-amino-7-oxoheptanoato (Etapa Z de la Figura 21) proporciona 3,7-diaminoheptanoato. Una enzima con actividad de 3,7-diaminoheptanoato 2,3-aminomutasa luego forma homolisina (Etapa R de la Figura 21), que se descarboxila para formar HMDA (Etapa S de la Figura 21).

En una vía alternativa, se transamina 3-oxopimelato para formar 3-aminopimelato (Etapa J de la Figura 21). Luego se convierte 3-aminopimelato en 3-amino-7-oxoheptanoato de manera directa (Etapa O de la Figura 21) o a través de un producto intermedio de CoA (Etapas K, L de la Figura 21) o ácido fosfónico (Etapas M, N de la Figura 21). Posteriormente, se convierte 3-amino-7-oxoheptanoato en 2-amino-7-oxoheptanoato mediante una 2,3-aminomutasa (Etapa P de la Figura 21). El 2-amino-7-oxoheptanoato es convertido en homolisina por una aminotransferasa u oxidoreductasa de aminación. De manera alternativa, en primer lugar se transamina 3-amino-7-oxoheptanoato (Etapa Z de la Figura 21) y luego se convierte en homolisina mediante una aminomutasa (Etapa R de la Figura 21).

Se puede convertir 3-aminopimelato en 2-aminopimelato mediante una enzima 2,3-aminomutasa (Etapa T de la Figura 21). Una vía de HMDA que involucra este producto intermedio necesita la reducción del ácido 7-carboxílico a un aldehído. Esta reducción es catalizada por una reductasa bifuncional (Etapa W de la Figura 21) o por dos enzimas que proceden a través de un producto intermedio de CoA (Etapas V, Y de la Figura 21) o ácido fosfónico (Etapas U, X de la Figura 21). El producto 2-amino-7-oxoheptanoato se convierte en HMDA como se describió anteriormente.

Se muestran dos vías para producir HMDA a partir de piruvato y 4-aminobutanal en la Figura 22. Las vías logran un rendimiento máximo de 0,67 moles de HMDA por mol de glucosa utilizado (0,43 g/g) en condiciones anaerobias y aerobias. El 4-aminobutanal se obtiene naturalmente a partir de ornitina mediante descarboxilación a putrescina y la posterior transaminación. El 4-aminobutanal también puede originarse a partir de 4-aminobutanoato. En una vía, se une 4-aminobutanal y piruvato mediante condensación de aldol para formar 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato (Etapa A de la Figura 22). Posteriormente, el producto de condensación se deshidrata (Etapa B de la Figura 22) y reduce (Etapa C de la Figura 22). La transaminación de 2-oxo-7-aminoheptanoato proporciona homolisina (Etapa D de la Figura 22). La HMDA es el producto de descarboxilación de homolisina descarboxilasa (Etapa E de la Figura 22). De manera alternativa, el producto intermedio de la vía 2-oxo-7-aminoheptanoato se descarboxila para formar 6-aminohexanal (Etapa F de la Figura 22). Posteriormente, se convierte 6-aminohexanal en HMDA mediante una aminotransferasa u oxidoreductasa de aminación (Etapa G de la Figura 22).

Se muestran varias vías para producir HMDA a partir de 2-amino-7-oxosubarato en la Figura 26. Hasta donde se sabe, el 2-amino-7-oxosubarato no es un metabolito de origen natural. Un ejemplo de vía para sintetizar 2-amino-7-oxosubarato se muestra en la Figura 27. La vía se origina con glutamato-5-semialdehído, un metabolito formado de manera natural durante la biosíntesis de ornitina. Luego se sintetiza 2-amino-7-oxosubarato en tres etapas enzimáticas. En la primera etapa, se condensa glutamato-5-semialdehído con piruvato mediante una aldolasa (Figura 27, Etapa A). Posteriormente, el producto 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato se deshidrata y el alqueno resultante se reduce para formar 2-amino-7-oxosubarato (Figura 27, Etapas B/C). En una vía propuesta para la HMDA a partir de 2-amino-7-oxosubarato, en primer lugar se descarboxila el 2-oxo ácido para formar 2-amino-7-oxoheptanoato (Etapa A de la Figura 26). Este producto se descarboxila nuevamente, formando 6-aminohexanal (Etapa B de la Figura 26). Finalmente, se convierte 6-aminohexanal en HMDA mediante una aminotransferasa u oxidoreductasa de aminación (Etapa C de la Figura 26).

De manera alternativa, en primer lugar se convierte el producto intermedio 2-amino-7-oxoheptanoato en homolisina mediante una aminotransferasa u oxidoreductasa de aminación (Etapa M de la Figura 26). Se descarboxila la homolisina para formar HMDA como se describió anteriormente (Etapa H de la Figura 26).

En incluso otra vía, el grupo 2-aminoácido de 2-amino-7-oxosubarato se descarboxila, mediante lo cual se proporciona 2-oxo-7-aminoheptanoato (Etapa I de la Figura 26). Luego este producto se descarboxila de manera adicional para formar 6-aminohexanal (Etapa G de la Figura 26) o se transamina para formar homolisina (Etapa J de la Figura 26). Luego se convierte 6-aminohexanal en HMDA como se describió anteriormente.

En incluso otra vía, el grupo 2-oxo de 2-amino-7-oxosubarato se convierte en un grupo amino, mediante lo cual se forma 2,7-diaminosubarato (Etapa K de la Figura 26). Dos descarboxilaciones posteriores proporcionan HMDA (Etapas L, H de la Figura 26).

En la presente memoria, se describe la generación de un organismo microbiano que se ha modificado genéticamente para producir HMDA a partir de piruvato y 4-aminobutanol, como se muestra en la Figura 22 (Etapas A-E). Este ejemplo también indica un método para modificar genéticamente una cepa que sobreproduzca HMDA.

La *Escherichia coli* se usa como un organismo objetivo para modificar genéticamente una vía de producción de HMDA como se muestra en la Figura 22. La *E. coli* proporciona un buen hospedador para generar un microorganismo de origen no natural capaz de producir HMDA. La *E. coli* es pasible de manipulaciones genéticas y se sabe que es capaz de producir diversos productos, tales como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, de manera eficaz en condiciones anaerobias, microaerobias o aerobias.

Una cepa de *E. coli* se modifica genéticamente para que produzca HMDA a partir de 4-aminobutanol a través de la vía delineada en la Figura 22. Para la primera etapa de construcción de la vía, se ensamblan en vectores genes que codifican enzimas para transformar 4-aminobutanol y piruvato en homolisina (Figura 3, Etapas A-D). En particular, los genes *hpcH* (CAA87759), *hpcG* (CAA57202), *enr* (YP_430895) y *lysN* () que codifican 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato aldolasa, 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato deshidratasa, 2-oxo-7-aminohept-3-enoato reductasa y 2-oxo-7-aminoheptanoato aminotransferasa, respectivamente, se clonan en el vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania), bajo el control del promotor PA1/lacO. El plásmido se transforma en la *E. coli*, cepa MG1655, para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la síntesis de HMDA a partir de 4-aminobutanol. La *E. coli* codifica naturalmente dos enzimas lisina descarboxilasas que convierten homolisina en HMDA.

El organismo modificado genéticamente resultante se cultiva en medio que contiene glucosa siguiendo procedimientos muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et ál., *supra*, 2001). La expresión de genes de la vía de HMDA se corrobora mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica para determinar la expresión de polipéptidos o la actividad enzimática, que incluyen, por ejemplo, transferencias Northern, amplificación por PCR de ARNm e inmunotransferencias. Las actividades enzimáticas de las enzimas expresadas se confirman mediante el uso de ensayos específicos para las actividades individuales. La capacidad de la cepa de *E. coli* modificada genéticamente de producir HMDA a través de esta vía mediante el uso de HPLC, cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS) o cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS).

Las cepas microbianas modificadas genéticamente para que tengan una vía de síntesis de HMDA funcional a partir de 4-aminobutanol se aumentan de manera adicional mediante optimización para la utilización eficiente de la vía. En resumen, la cepa modificada genéticamente se evalúa para determinar si se expresa cualquiera de los genes exógenos en un nivel de limitación de la tasa. La expresión aumenta para cualquier enzima expresada en niveles bajos que pueda limitar el flujo a través de la vía mediante, por ejemplo, la introducción de cantidades de copias de genes adicionales.

Después de la demostración exitosa de la producción de HMDA mejorada a través de las actividades de las enzimas exógenas, los genes que codifican estas enzimas se insertan en el cromosoma de un hospedador de *E. coli* de tipo salvaje mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Esos métodos incluyen, por ejemplo, el cruzamiento único secuencial (Gay et ál., *J. Bacteriol.* 3:153 (1983)). y métodos de Red/ET de GeneBridges (Zhang et ál., solicitud de patente europea n.º 01117 (2001)). La inserción cromosómica proporciona varias ventajas con respecto a un sistema basado en plásmidos, que incluyen una mayor estabilidad y la capacidad de colocalizar la expresión de los genes de la vía.

Para generar mejores productores, se utiliza el modelado metabólico para optimizar las condiciones de cultivo. También se usa el modelado para diseñar inactivaciones génicas que optimicen de manera adicional la utilización de la vía (véase, por ejemplo, las publicaciones de patentes de EE. UU. 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 EE. UU. n.º 7,127,379). El análisis de modelado permite predicciones confiables de los efectos sobre el desarrollo celular del cambio del metabolismo hacia una producción más eficiente de HMDA. Un método de modelado es la estrategia de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard et ál., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar inactivaciones de genes que de manera colectiva tengan como resultado una mejor producción de HMDA. También se puede usar la evolución adaptativa para generar mejores productores de, por ejemplo, el producto intermedio de 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato o el producto de HMDA. La evolución adaptativa se realiza para mejorar las características de desarrollo y producción (Fong y Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et ál., *Science* 314:1565-1568 (2006)). En función de los resultados, se pueden aplicar rondas sucesivas de modelado, modificación genética y evolución adaptativa al productor de HMDA para aumentar de manera adicional la producción.

Para la producción a gran escala de HMDA, el organismo que contiene la vía de HMDA anterior se cultiva en un fermentador mediante el uso de un medio conocido en la técnica para respaldar el desarrollo del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan por lotes, por lotes alimentados o de manera continua. Las condiciones anaerobias se mantienen al rociar en primer lugar el medio con nitrógeno y luego sellar el recipiente de cultivo (p. ej., los matraces pueden sellarse con un tabique y una tapa con sello). También se pueden utilizar condiciones microaerobias mediante el suministro de un pequeño orificio para una ventilación limitada. El pH del medio se mantiene en un pH de 7 mediante la adición de un ácido, tal como H₂SO₄. La tasa de desarrollo se determina mediante la medición de la densidad óptica mediante el uso de un espectrofotómetro (600 nm), y la tasa

de absorción de glucosa mediante la supervisión de la eliminación de fuentes de carbono con el transcurso del tiempo. Los subproductos tales como alcoholes no convenientes, ácidos orgánicos y glucosa residual pueden cuantificarse mediante HPLC (Shimadzu), con una columna HPX-087 (BioRad), mediante el uso de un detector del índice de refracción para la glucosa y los alcoholes y un detector UV para los ácidos orgánicos, Lin et ál., *Biotechnol. Bioeng.*, 775-779 (2005).

Ejemplo XXV

Vías para la producción de 6-aminocaproato a partir de glutamato, glutaril-CoA, homolisina o 2-amino-7-oxosubarato

En la presente memoria, se describen vías novedosas para producir 6-aminocaproato (6-ACA) y productos relacionados. Las enzimas candidatas y los riesgos de implementación asociados se describirán en el Ejemplo XXVI más adelante.

Se describen microorganismos de origen no natural que expresan genes que codifican enzimas que catalizan la producción de 6-ACA. La modificación genética exitosa de estas vías implica identificar un conjunto adecuado de enzimas con una actividad y especificidad suficientes, clonar sus genes correspondientes en un hospedador de producción, optimizar la expresión de estos genes en el hospedador de producción, optimizar condiciones de fermentación y realizar ensayos para determinar la formación de productos luego de la fermentación.

Se puede producir 6-ACA a partir de glutamato como molécula inicial. El glutamato se transforma en 6-aminopimeloil-CoA como se describió anteriormente (Figura 20, Etapas A-E). La remoción del resto de CoA de la 6-aminopimeloil-CoA mediante una CoA hidrolasa, transferasa o ligasa proporciona 2-aminopimelato (Etapa I de la Figura 20). La descarboxilación de este producto proporciona 6-ACA (Etapa J de la Figura 20).

También se puede producir 6-ACA a partir de glutaril-CoA como molécula inicial. En la vía descrita para el 6-ACA, de manera similar a la vía de HMDA descrita anteriormente, en primer lugar se condensa glutaril-CoA con acetil-CoA mediante una beta-cetotiolasa para formar 3-oxopimeloil-CoA (Etapa A de la Figura 21). El resto de CoA de la 3-oxopimeloil-CoA se remueve mediante una CoA hidrolasa, transferasa y ligasa (Etapa B de la Figura 21). Luego se transamina 3-oxopimelato para formar 3-aminopimelato (Etapa J de la Figura 21). Se puede convertir 3-aminopimelato en 2-aminopimelato mediante una enzima 2,3-aminomutasa (Etapa T de la Figura 21). Luego se puede descarboxilar el aminopimelato para formar ácido 6-aminocaproico (Etapa AA de la Figura 21).

La homolisina es también un precursor atractivo para la producción de 6-aminocaproato (6-ACA). Si bien la homolisina es un precursor posiblemente valioso, no es un producto intermedio metabólico conocido de ningún organismo. En condiciones aerobias, la oxidación de homolisina mediante una lisina 2-monooxigenasa proporciona 6-aminohexanamida, que se puede hidrolizar fácilmente para formar 6-ACA en solución de carácter básico o ácido en dilución (Figura 23).

También se puede producir 6-ACA a partir de 2-amino-7-oxosubarato como molécula inicial (Figura 26). Hasta donde se sabe, el 2-amino-7-oxosubarato no es un metabolito de origen natural. Un ejemplo de vía para sintetizar 2-amino-7-oxosubarato se muestra en la Figura 27. La vía se origina con glutamato-5-semialdehído, un metabolito formado de manera natural durante la biosíntesis de ornitina. Luego se sintetiza 2-amino-7-oxosubarato en tres etapas enzimáticas. En la primera etapa, se condensa glutamato-5-semialdehído con piruvato mediante una aldolasa (Figura 27, Etapa A). Posteriormente, el producto 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato se deshidrata y el alqueno resultante se reduce para formar 2-amino-7-oxosubarato (Figura 27, Etapas B/C). En una vía propuesta, el 2-amino-7-oxosubarato se descarboxila para formar 2-amino-7-oxoheptanoato (Etapa A de la Figura 26). El aldehído del 2-amino-7-oxoheptanoato se oxida mediante una oxidorreductasa para formar 2-aminopimelato (Etapa D de la Figura 26). El 6-ACA es el producto de descarboxilación del 2-aminopimelato (Etapa E de la Figura 26). De manera alternativa, el producto intermedio de 2-amino-7-oxoheptanoato se descarboxila para formar 6-aminohexanal (Etapa B de la Figura 26), que se transamina para formar 6-ACA (Etapa F de la Figura 26). En una tercera vía propuesta, el grupo 2-aminoácido de 2-amino-7-oxosubarato se descarboxila, mediante lo cual se proporciona 2-oxo-7-aminohexanoato (Etapa I de la Figura 26). Luego este producto se descarboxila de manera adicional para formar 6-aminohexanal (Etapa G de la Figura 26). Finalmente, se transamina 6-aminohexanal para formar 6-ACA (Etapa F de la Figura 26).

Ejemplo XXVI

Sistema de clasificación de enzimas para la producción de hexametilendiamina y ácido 6-aminocaproico

Este ejemplo describe el sistema de clasificación de enzimas para los ejemplos de vías descritos en los Ejemplos XXIV y XXV para la producción de hexametilendiamina o 6-aminocaproato.

Todas las transformaciones que se ilustran en las Figuras 20-23 y 26 entran en las categorías generales de transformaciones que se muestran en la Tabla 11. A continuación, se describirá una cantidad de genes caracterizados bioquímicamente en cada categoría. Se enumeran específicamente genes que pueden aplicarse para catalizar las transformaciones adecuadas en las Figuras 20-23 y 26 cuando se clonan y expresan de manera adecuada.

La Tabla 11 muestra los tipos de enzimas útiles para convertir productos intermedios metabólicos centrales comunes en 6-aminocaproato y hexametildiamina. Los primeros tres dígitos de cada etiqueta corresponden a los primeros tres números de la Comisión de Enzimas que indican el tipo general de transformación con independencia de la especificidad de sustrato.

5 **Tabla 11**

ETIQUETA	FUNCIÓN
1.1.1.a	Oxidoreductasa (de oxo a alcohol)
1.13.12.a	Monooxigenasa (que incorpora O ₂)
1.2.1.a	Oxidoreductasa (de aldehído a ácido)
1.2.1.b	Oxidoreductasa (de acil-CoA a aldehído)
1.2.1.d	Oxidoreductasa (fosfonato reductasa)
1.2.1.e	Reductasa ácida
1.3.1.a	Oxidoreductasa (de alqueno a alcano)
1.4.1.a	Oxidoreductase (de aminación)
2.3.1.b	Aciltransferasa (beta-cetotilasa)
2.6.1.a	Aminotransferasa
2.7.2.a	Fosfotransferasa (carboxiaceptora)
2.8.3.a	Coenzima-A transferasa
3.1.2.a	CoA hidrolasa
4.1.1.a	Carboxi-liasa
4.1.2.a	Aldehído-liasa
4.2.1.a	Hidro-liasa
5.4.3.a	Aminomutasa
6.2.1.a	Ácido-tiol ligasa

1.1.1.a

Oxidoreductasa (de oxo a alcohol) - La reducción de 3-oxo-6-aminopimeloil-CoA a 3-hidroxi-6-aminopimeloil-CoA es catalizada por una 3-oxoacil-CoA deshidrogenasa (Figura 20, Etapa C). Esas enzimas convierten moléculas de 3-oxoacil-CoA en moléculas de 3-hidroxiacil-CoA y a menudo están involucradas en la betaoxidación de ácidos grasos o el catabolismo de fenilacetato. Por ejemplo, las subunidades de dos complejos de oxidación de ácidos grasos en la *E. coli*, codificadas por el *fadB* y *fadJ*, funcionan como 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasas (Binstock et ál., Methods Enzymol. 71 Pt C:403-411 (1981)). Además, los productos génicos codificados por el *phaC* en *Pseudomonas putida* U (Olivera et ál., Proc Natl. Acad. Sci EUA 95:6419-6424 (1998)) y *paaC* en *Pseudomonas fluorescens* ST (Di Arch et ál., Microbiol 188:117-125 (2007)) catalizan la reacción inversa de la etapa B en la Figura 10, es decir, la oxidación de 3-hidroxiadipil-CoA para formar 3-oxoadipil-CoA, durante el catabolismo de fenilacetato o estireno. Cabe destacar que las reacciones catalizadas por esas enzimas son reversibles. Además, dada la proximidad en la

E. coli del *paaH* con respecto a otros genes en el operón de degradación de fenilacetato (Nogales et ál., Microbiology 153:357-365 (2007)) y el hecho de que los mutantes de *paaH* no pueden desarrollarse en fenilacetato (Ismail et ál., Eur. J Biochem. 270:3047-3054 (2003)), se espera que el gen *paaH* de *E. coli* codifique una 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>fadB</i>	119811	P21177.2	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadJ</i>	3334437	P77399.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaH</i>	16129356	NP_415913.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>phaC</i>	26990000	NP_745425.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaC</i>	106636095	ABF82235.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

5

Otros ejemplos de oxidorreductasas capaces de convertir moléculas de 3-oxoacil-CoA en sus correspondientes moléculas de 3-hidroxiacil-CoA incluyen 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasas. La enzima de *Clostridium acetobutylicum*, codificada por el *hbd*, se ha clonado y expresado funcionalmente en la *E. coli* (Youngleson et ál., J Bacteriol. 171:6800-6807 (1989)). Otros candidatos génicos incluyen *Hbd1* (dominio de extremo C) y *Hbd2* (dominio de extremo N) en *Clostridium kluyveri* (Hillmer et ál., FEBS Lett. 21:351-354 (1972)) y *HSD17B10* en *Bos taurus* (Wakil et ál., J Biol. Chem. 207:631-638 (1954)). Incluso otros candidatos génicos que han demostrado reducir acetoacetil-CoA a 3-hidroxiacil-CoA son el *phbB* de *Zoogloea ramigera* (Ploux et ál., Eur. J Biochem. 174:177-182 (1988)) y el *phaB* de *Rhodobacter sphaeroides* (Alber et ál., Mol. Microbiol. 61:297-309 (2006)). El primero de estos candidatos génicos depende de NADPH, se ha determinado su secuencia de nucleótidos (Peoples et ál., Mol. Microbiol. 3:349-357 (1989)) y el gen se ha expresado en la *E. coli*. Los estudios de especificidad de sustratos en el gen conducen a la conclusión de que podría aceptar 3-oxopropionil-CoA como un sustrato alternativo ((Peoples et al., Mol. Microbiol. 3:349-357 (1989)).

10

15

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>hbd</i>	18266893	P52041.2	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>Hbd2</i>	146348271	EDK34807.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>Hbd1</i>	146345976	EDK32512.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>HSD17B10</i>	3183024	O02691.3	<i>Bos taurus</i>
<i>phaB</i>	77464321	YP_353825.1	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
<i>phbB</i>	130017	P23238.1	<i>Zoogloea ramigera</i>

20

Se ha descubierto una cantidad de enzimas similares en otras especies de *Clostridia* y en la *Metallosphaera sedula* (Berg et ál., Science. 318:1782-1786 (2007)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>hbd</i>	15895965	NP_349314.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>hbd</i>	20162442	AAM14586.1	<i>Clostridium beijerinckii</i>
<i>Msed_1423</i>	146304189	YP_001191505	<i>Metallosphaera sedula</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>Msed_0399</i>	146303184	YP_001190500	<i>Metallosphaera sedula</i>
<i>Msed_0389</i>	146303174	YP_001190490	<i>Metallosphaera sedula</i>
<i>Msed_1993</i>	146304741	YP_001192057	<i>Metallosphaera sedula</i>

1.13.12.a Monooxigenasa (que incorpora O₂) - Una monooxigenasa que incorpora O₂ es necesaria para convertir homolisina en 6-aminohexanamida (Etapa A de la Figura 23). La lisina 2-monooxigenasa (EC 1.13.12.2) de *Pseudomonas fluorescens* reacciona con la homolisina como sustrato (Nakazawa et ál., J Biol. Chem. 247:3439-3444 (1972)). La enzima de *P. putida* se ha caracterizado bioquímicamente y el gen se ha identificado (Karyakin et ál., Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya 27:825-832 (1991)). Los genes que codifican enzimas lisina 2-monooxigenasas en *P. fluorescens* (val e = 0,0, 90 % de identidad), *Streptomyces coelicolor* (val e = 0,0, 58 % de identidad), *Rhodococcus jostii* (val e = 0,0, 56 % de identidad) y otros se identificaron mediante homología de secuencia de proteínas con respecto a la enzima *P. putida*.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>davB</i>	193805882	BAG54787.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>pfl_5670</i>	68347255	AAY94861.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>SCO1454</i>	7209214	CAB76876.1	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>RHA1_ro03531</i>	110820050	ABG95334.1	<i>Rhodococcus jostii</i>

1.2.1.a Oxidorreductasa (de aldehído a ácido) - Dos transformaciones en la Figura 26 requieren la conversión de un aldehído en un ácido: la conversión de 2-amino-7-oxoheptanoato en 2-aminopimelato (Etapa D) y 6-aminohexanal en 6-aminocaproato (Etapa F). Esas reacciones son catalizadas por oxidorreductasas dependientes de NAD(P)⁺ que convierten aldehídos en ácidos en la clase EC 1.2.1. Una enzima candidata es la aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (EC 1.2.1.3). Dos aldehído deshidrogenasas que se encuentran en el hígado humano, ALDH-1 y ALDH-2, tienen amplias variedades de sustratos para una variedad de aldehídos alifáticos, aromáticos y policíclicos (Klyosov et ál., Biochemistry 35:4457-4467 (1996)). La ALDH-2 activa se ha expresado de manera eficiente en la *E. coli* mediante el uso de proteínas GroEL como chaperoninas (Lee et ál., Biochem. Biophys. Res. Commun. 298:216-224 (2002)). La aldehído deshidrogenasa mitocondrial de ratas también tiene una amplia variedad de sustratos que incluye el enoil-aldehído crotonaldehído (Siew et ál., Arch. Biochem. Biophys. 176:638-649 (1976)). El gen *astD* de *E. coli* también codifica una aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ que convierte semialdehído succínico en succinato (Kuznetsova et ál., FEMS Microbiol Rev 29:263-279 (2005)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>ALDH-2</i>	118504	P05091.2	<i>Homo sapiens</i>
<i>ALDH-2</i>	14192933	NP_115792.1	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>astD</i>	3913108	P76217.1	<i>Escherichia coli</i>

1.2.1.b Oxidorreductasa (de acil-CoA a aldehído) - La desacilación reductiva de 3-oxopimeloil-CoA (Figura 21, Etapa I), 5-aminopimeloil-CoA (Figura 21, Etapa L) y 6-aminopimeloil-CoA (Figura 21, Etapa Y) para formar sus correspondientes aldehídos es catalizada por enzimas en la clase EC 1.2.1. Los ejemplos de acil-CoA deshidrogenasas reducen una acil-CoA a su correspondiente aldehído incluyen las enzimas de acil-CoA reductasa de ácidos grasos de *Acinetobacter calcoaceticus* (Reiser et ál., Journal of Bacteriology 179:2969-2975 (1997)) y *Acinetobacter sp. M-1* (Ishige et ál., Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195 (2002)), y una succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA y NADP codificada por el gen *sucD* en *Clostridium kluyveri* (Sohling et ál., J

Bacteriol. 178:871-880 (1996); y Sohling et ál., J Bacteriol 178:871-80 (1996)). El SucD de *P. gingivalis* es otra succinato semialdehído deshidrogenasa (Takahashi et ál., J. Bacteriol. 182:4704-4710 (2000)). La enzima acetaldehído deshidrogenasa de acilación en *Pseudomonas* sp, codificada por el *bphG*, es incluso otra ya que se ha demostrado que oxida y acila acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, isobutiraldehído y formaldehído (Powlowski et ál., J Bacteriol. 175:377-385 (1993)). Además de reducir acetil-CoA a etanol, se ha demostrado que la enzima codificada por *adhE* en *Leuconostoc mesenteroides* oxida el compuesto de cadena ramificada isobutiraldehído para formar isobutiril-CoA (Koo et ál., Biotechnol Lett. 27:505-510 (2005)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>acr1</i>	50086359	YP_047869.1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
<i>acr1</i>	1684886	AAC45217	<i>Acinetobacter baylyi</i>
<i>acr1</i>	18857901	BAB85476.1	<i>Acinetobacter</i> sp., cepa M-1
<i>sucD</i>	172046062	P38947.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>sucD</i>	34540484	NP_904963.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>bphG</i>	425213	BAA03892.1	<i>Pseudomonas</i> sp

Un tipo de enzima adicional que convierte una acil-CoA en su aldehído correspondiente es la malonil-CoA reductasa que transforma malonil-CoA en semialdehído malónico. La malonil-CoA reductasa es una enzima fundamental en la fijación de carbono de carácter autotrófico a través del ciclo de 3-hidroxipropionato en bacterias arqueales termoacidófilicas (Berg et ál., Science. 318:1782-1786 (2007); y Thauer et ál., Science. 318:1732-1733 (2007)). La enzima utiliza NADPH como un cofactor y se ha caracterizado en *Metallosphaera* y *Sulfolobus* spp (Alber et ál., J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006); y Hugler et ál., J. Bacteriol. 184:2404-2410 (2002)). La enzima es codificada por *Msed_0709* en *Metallosphaera sedula* (Alber et ál., J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006); y Berg et ál., Science. 318:1782-1786 (2007)). Un gen que codifica una malonil-CoA reductasa de *Sulfolobus tokodaii* se clonó y expresó de manera heteróloga en *E. coli* (Alber et ál., J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006)). También se ha demostrado que esta enzima cataliza la conversión de metilmalonil-CoA en su aldehído correspondiente (WO/2007/141208). Si bien la funcionalidad de aldehído deshidrogenasa de estas enzimas es similar a la deshidrogenasa funcional de *Chloroflexus aurantiacus*, hay poca similitud de secuencia. Ambas enzimas candidatas de malonil-CoA reductasa tienen una similitud de secuencia alta con respecto a la aspartato-semialdehído deshidrogenasa, una enzima que cataliza la reducción y desfosforilación simultánea de aspartil-4-fosfato a aspartato semialdehído. Se pueden encontrar candidatos génicos adicionales mediante la homología de secuencia con respecto a proteínas en otros organismos que incluyen *Sulfolobus solfataricus* y *Sulfolobus acidocaldarius*. Incluso otro candidato para la aldehído deshidrogenasa de acilación de CoA es el gen *ald* de *Clostridium beijerinckii* (Toth et ál., Appl Environ. Microbiol 65:4973-4980 (1999)). Se ha indicado que esta enzima reduce acetil-CoA y butiril-CoA a sus aldehídos correspondientes. Este gen es muy similar al *eutE* que codifica acetaldehído deshidrogenasa de *Salmonella typhimurium* y *E. coli* (Toth et ál., Appl Environ. Microbiol 65:4973-4980 (1999)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>Msed_0709</i>	146303492	YP_001190808.1	<i>Metallosphaera sedula</i>
<i>mcr</i>	15922498	NP_378167.1	<i>Sulfolobus tokodaii</i>
<i>asd-2</i>	15898958	NP_343563.1	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
<i>Saci_2370</i>	70608071	YP_256941.1	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
<i>Ald</i>	49473535	AAT66436	<i>Clostridium beijerinckii</i>
<i>eutE</i>	687645	AAA80209	<i>Salmonella typhimurium</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>eutE</i>	2498347	P77445	<i>Escherichia coli</i>

1.2.1.d Oxidorreductasa (fosfonato reductasa) - La reducción de un ácido fosfónico a su aldehído correspondiente es catalizada por una oxidorreductasa en la clase EC 1.2.1. Las Etapas G, N y X en la Figura 21 requieren una enzima de ese tipo para la reducción de 5-oxopimeloil-fosfonato, 5-aminopimeloilfosfonato y 6-aminopimeloilfosfonato a sus correspondientes aldehídos. Estas reacciones no son catalizadas por enzimas conocidas. Una reacción similar es catalizada por la aspartato semialdehído deshidrogenasa (ASD, EC 1.2.1.11): la reducción dependiente de NADPH de 4-aspartil fosfato a aspartato-4-semialdehído. La ASD participa de la biosíntesis de aminoácidos y recientemente se ha estudiado como un objetivo antimicrobiano (Hadfield et ál., *Biochemistry* 40:14475-14483 (2001)). La estructura de la ASD de la *E. coli* se ha resuelto (Hadfield et ál., *J Mol. Biol.* 289:991-1002 (1999)) y se ha demostrado que la enzima acepta el sustrato alternativo beta-3-metilaspartil fosfato (Shames, et ál., *J Biol. Chem.* 259:15331-15339 (1984)). La enzima de *Haemophilus influenzae* ha sido objeto de estudios de modificaciones genéticas enzimáticas para alterar las afinidades de unión a sustratos en el sitio activo (Blanco et ál., *Crystallogr.* 60:1388-1395 (2004)). Otros candidatos de ASD se encuentran en la *Mycobacterium tuberculosis* (Shafiani et ál., *J Appl Microbiol* 98:832-838 (2005)), *Methanococcus jannaschii* (Faehnle et ál., *J Mol. J Mol.* 353:1055-1068 (2005)) y los microorganismos infecciosos *Vibrio cholera* y *Helicobacter pylori* (Moore et ál., *Protein Expr. Purif.* 25:189-194 (2002)). La acetilglutamilfosfato reductasa (EC 1.2.1.38) es una enzima relacionada que reduce de manera natural el acetilglutamilfosfato a acetilglutamato-5-semialdehído. Se encuentran genes que codifican esta enzima en *S. cerevisiae* (Pauwels et ál., *Eur. J Biochem.* 270:1014-1024 (2003)), *B. subtilis* (O'Reilly et ál., *Microbiology* 140 (Pt 5):1023-1025 (1994)) y otros organismos.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>asd</i>	16131307	NP_417891.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>asd</i>	68249223	YP_248335.1	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>asd</i>	1899206	AAB49996	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>VC2036</i>	15642038	NP_231670	<i>Vibrio cholera</i>
<i>asd</i>	210135348	YP_002301787.1	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>ARG5,6</i>	6320913	NP_010992.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>argC</i>	16078184	NP_389001.1	<i>Bacillus subtilis</i>

Otros ejemplos de enzimas fosfonato reductasas incluyen la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa que convierte gliceraldehído-3-fosfato en D-glicerato 1,3-bisfosfato (p ej., *E. coli gapA* (Branlant et ál., *Eur. J. Biochem.* 150:61-66 (1985)).23)), la N-acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa que convierte N-acetil-L-glutamato-5-semialdehído en N-acetil-L-glutamil-5-fosfato (p. ej., *argC* de *E. coli* (Parsot et ál., *Gene.* 68:275-283 (1988)), y la glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa que convierte L-glutamato-5-semialdehído en L-glutamil-5-fosfato (p ej., *proA* de *E. coli* (Smith et ál., *J. Bacteriol.* 157:545-551 (1984))). Los genes que codifican enzimas glutamato-5-semialdehído deshidrogenasas de *Salmonella typhimurium* (Mahan et ál., *J Bacteriol.* 156:1249-1262 (1983)) y *Campylobacter jejuni* (Louie et ál., *Mol. Gen. Genet.* 240:29-35 (1993)) se clonaron y expresaron en la *E. coli*.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>gapA</i>	71159358	P0A9B2.2	<i>Escherichia coli</i>
<i>argC</i>	16131796	NP_418393.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>proA</i>	16128229	NP_414778.1	<i>Escherichia coli</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>proA</i>	16763704	NP_459319.1	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>proA</i>	9087222	P53000.2	<i>Campylobacter jejuni</i>

1.2.1.e Reductasa ácida - Varias transformaciones en la Figura 21 necesitan la conversión de un ácido en un aldehído (Figura 21, Etapas C, O, W). Una transformación de ese tipo es desfavorable desde el punto de vista termodinámico y normalmente requiere cofactores ricos en energía y múltiples etapas enzimáticas. Por ejemplo, en la conversión para la biosíntesis de butanol de butirato en butiraldehído es catalizada por la activación de butirato para obtener su correspondiente acil-CoA mediante una CoA transferasa o ligasa, seguida por la reducción a butiraldehído mediante una aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA. De manera alternativa, se puede activar un ácido para formar un acil-fosfato y posteriormente se puede reducir mediante una fosfato reductasa. La conversión directa del ácido en aldehído mediante una sola enzima es catalizada por una enzima en la familia 1.2.1. Los ejemplos de enzimas que catalizan estas transformaciones incluyen la ácido carboxílico reductasa, alfa-aminoadipato reductasa y ácido retinoico reductasa.

La ácido carboxílico reductasa, que se encuentra en *Nocardia iowensis*, cataliza la reducción dependiente de magnesio, ATP y NADPH de ácidos carboxílicos a sus correspondientes aldehídos (Venkitasubramanian et ál., J Biol. Chem. 282:478-485 (2007)). Esta enzima, codificada por el *car*, se clonó y expresó de manera funcional en *E. coli* (Venkitasubramanian et ál., J Biol. Chem. 282:478-485 (2007)). La expresión del producto génico *npt* mejoró la actividad de la enzima a través de la modificación posterior a la transcripción. El gen *npt* codifica una fosfopanteteína transferasa (PPTasa) específica que convierte la apo-enzima inactiva en la holo-enzima activa. El sustrato natural de esta enzima es ácido vanílico y la enzima presenta una amplia aceptación de sustratos aromáticos y alifáticos (Venkitasubramanian et ál. «Biocatalytic Reduction of Carboxylic Acids: Mechanism and Applications», capítulo 15, en Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries, ed. R.N. Patel, CRC Press LLC, Boca Ratón, FL. (2006)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>car</i>	40796035	AAR91681.1	<i>Nocardia iowensis</i> (sp. NRRL 5646)
<i>npt</i>	114848891	ABI83656.1	<i>Nocardia iowensis</i> (sp. NRRL 5646)

Una enzima con características similares, la alfa-aminoadipato reductasa (AAR, EC 1.2.1.31), participa de las vías de biosíntesis de lisina en algunas especies fúngicas. Esta enzima reduce de manera natural el alfa-aminoadipato a alfa-aminoadipato semialdehído. El grupo carboxilo se activa en primer lugar a través de la formación dependiente de ATP de un aldehído que luego se reduce mediante NAD(P)H para proporcionar el aldehído y AMP. Al igual que la CAR, esta enzima utiliza magnesio y necesita activación por parte de una PPTasa. Los candidatos enzimáticos para la AAR y su correspondiente PPTasa se encuentran en *Saccharomyces cerevisiae* (Morris et ál., Gene 98:141-145 (1991)), *Candida albicans* (Guo et ál., Mol. Genet. Genomics 269:271-279 (2003)), y *Schizosaccharomyces pombe* (Ford et ál., Curr. Genet. 28:131-137 (1995)). La AAR de *S. pombe* presentó una actividad significativa cuando se expresó en la *E. coli* (Guo et ál., Yeast 21:1279-1288 (2004)). La AAR de *Penicillium chrysogenum* acepta la S-carboximetil-L-cisteína como un sustrato alternativo, pero no reaccionó con adipato, L-glutamato o diaminopimelato (Hijarrubia et ál., J Biol. Chem 278:8250-8256 (2003)). El gen que codifica la PPTasa de *P. chrysogenum* no se ha identificado hasta ahora y no se identificaron coincidencias de alta confianza mediante búsqueda comparativa de homología de secuencia. Se pueden necesitar métodos de modificación genética enzimática o evolución dirigida para mejorar la reactividad con los sustratos en la Figura 21.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>LYS2</i>	171867	AAA34747.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>LYS5</i>	1708896	P50113.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>LYS2</i>	2853226	AAC02241.1	<i>Candida albicans</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>LYS5</i>	28136195	AAO26020.1	<i>Candida albicans</i>
<i>Lys1p</i>	13124791	P40976.3	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Lys7p</i>	1723561	Q10474.1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Lys2</i>	3282044	CAA74300.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>

1.3.1.a Oxidorreductasa (de alqueno a alcanos) - Tres transformaciones entran en la categoría de las oxidorreductasas que reducen un alqueno a un alcano (EC 1.3.1.-). La conversión de 6-amino-7-carboxi-hept-2-enoil-CoA en 6-aminopimeloil-CoA (Figura 20, Etapa E), de 2-oxo-7-aminohept-3-onoato en 2-oxo-7-aminoheptanoato (Figura 22, Etapa C) y de 2-amino-5-eno-7-oxosubarato en 2-amino-7-oxosubarato (Figura 27, Etapa C) es catalizada por una 2-enoato reductasa. Se sabe que las enzimas 2-enoato reductasas catalizan la reducción dependiente de NAD(P)H de una amplia variedad de aldehídos y ácidos carboxílicos α , β -insaturados (Rohdich et ál., J Biol. Chem. 276:5779-5787 (2001)). En la secuencia genómica recientemente publicada de *C. kluyveri*, se indicaron 9 secuencias de codificación para las enoato reductasas, de las cuales se ha caracterizado una (Seedorf et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 105:2128-2133 (2008)). Los genes *enr* de la *C. tyrobutyricum* y *M. thermoacetica* se han clonado y secuenciado y muestran un 59 % de identidad entre sí. También se descubrió que el primero de estos genes tiene aproximadamente un 75 % de similitud con respecto al gen caracterizado en *C. kluyveri* (Giesel et ál., Arch. Microbiol 135:51-57 (1983)). Se ha indicado en función de estos resultados de secuencias que el *enr* es muy similar a la dienol CoA reductasa en la *E. coli* (*fadH*) (Rohdich et ál., J Biol. Chem. 276:5779-5787 (2001)). El gen *enr* de *Moorella thermoacetica* (anteriormente *C. thermoacetica*) se ha expresado también en una forma catalíticamente activa en la *E. coli* (Ohdich et ál., J Biol. Chem. 276:5779-5787 (2001)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>enr</i>	169405742	ACA54153.1	<i>Clostridium botulinum</i> A3 str
<i>enr</i>	2765041	CAA71086.1	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>
<i>enr</i>	3402834	CAA76083.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>enr</i>	83590886	YP_430895.1	<i>Moorella thermoacetica</i>
<i>fadH</i>	16130976	NP_417552.1	<i>Escherichia coli</i>

Otra 2-enoato reductasa candidata es la maleilacetato reductasa (MAR), una enzima que cataliza la reducción de 2-maleilacetato (4-oxohex-2-enodioato) a 3-oxoadipato. Las enzimas MAR participan de manera natural en vías de degradación aromáticas (Camara et ál., J Bacteriol. (2009); Huang et ál., Appl Environ. Microbiol 72:7238-7245 (2006)); Kaschabek et ál., J Bacteriol. 177:320-325 (1995) y Kaschabek et ál., J Bacteriol. 175:6075-6081 (1993)). La actividad enzimática se identificó y caracterizó en la *Pseudomonas* sp., cepa B13 (Kaschabek et ál., J Bacteriol 177:320-325 (1995); y Kaschabek et ál., J Bacteriol 175:6075-6081 (1993)), y el gen de codificación se clonó y secuenció (Kasberg et ál., J Bacteriol. 179:3801-3803 (1997)). Otros candidatos génicos de MAR incluyen el gen *clcE* de *Pseudomonas* sp., cepa B13 (Kasberg et ál., J Bacteriol. 179:3801-3803 (1997)), el gen *macA* de *Rhodococcus opacus* (Seibert et ál., J Bacteriol 180:3503-3508 (1998)), el gen *macA* de *Ralstonia eutropha* (que también se conoce como *Cupriavidus necator*) (Seibert et ál., Microbiology 150:463-472 (2004)), *tfdII* de *Ralstonia eutropha* (Seibert et ál., J Bacteriol. 175:6745-6754 (1993)) y *NCgl1112* en *Corynebacterium glutamicum* (Huang et ál., Appl Environ. Microbiol 72:7238-7245 (2006)). Una MAR en *Pseudomonas reinekei* MT1, codificada por el *ccaD*, se identificó recientemente y la secuencia de nucleótidos se encuentra disponible con el número de registro en DBJ/EMBL GenBank EF159980 (Camara et ál., J Bacteriol. (2009)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>clcE</i>	3913241	O30847.1	<i>Pseudomonas</i> sp. cepa B13
<i>macA</i>	7387876	O84992.1	<i>Rhodococcus opacus</i>
<i>macA</i>	5916089	AAD55886	<i>Cupriavidus necator</i>
<i>tfdFII</i>	1747424	AAC44727.1	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134
<i>NCgl1112</i>	19552383	NP_600385	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>ccaD</i>	134133940	ABO61029.1	<i>Pseudomonas reinekei</i> MT1

Las enzimas enoil-CoA reductasas son enzimas adecuadas para catalizar la reducción de 6-amino-7-carboxiheptil-2-enoil-CoA a 6-aminopimeloil-CoA (Figura 20, Etapa E). Un ejemplo de enoil-CoA reductasa es el producto génico de *bcd* de *C. acetobutylicum* (Atsumi et ál., Metab Eng. 10:305-311 (2008)); y Boynton et ál., J. Bacteriol. 178:3015-3024 (1996)), que cataliza de manera natural la reducción de crotonil-CoA a butiril-CoA. La actividad de esta enzima puede mejorarse mediante la expresión de *bcd* junto con la expresión de los genes *etfAB* de *C. acetobutylicum*, 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 la *E. gracilis* (Hoffmeister et ál., J Biol. Chem. 280:4329-4338 (2005)). Una construcción derivada de esta secuencia luego de la remoción de su secuencia líder de direccionamiento mitocondrial se clonó en la *E. coli*, lo cual produjo una enzima activa (Hoffmeister et ál., J Biol. Chem. 280:4329-4338 (2005)). Esta estrategia es muy conocida por los expertos en la técnica de la expresión de genes eucariotas, particularmente aquellos con secuencias líderes que puedan dirigir el producto génico a un compartimento intracelular específico, en organismos procariotas. Un homólogo cercano de este gen, TDE0597, de la *Treponema denticola*, procariota representa una tercera enoil-CoA reductasa que se ha clonado y expresado en la *E. coli* (Tucci et ál., FEBS Letters 581:1561-1566 (2007)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>bcd</i>	15895968	NP_349317.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>etfA</i>	15895966	NP_349315.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>etfB</i>	15895967	NP_349316.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
TER	62287512	Q5EU90.1	<i>Euglena gracilis</i>
TDE0597	42526113	NP_971211.1	<i>Treponema denticola</i>

Otros candidatos enzimáticos de enoil-CoA reductasa se encuentran en organismos que degradan compuestos aromáticos. La *Rhodopseudomonas palustris*, un organismo modelo para la degradación de benzoato, tiene la capacidad enzimática de degradar el pimelato a través de la betaoxidación de pimeloil-CoA. Los genes adyacentes en el operón *pim*, *pimC* y *pimD*, presentan homología de secuencia con respecto al *bcd* de *C. acetobutylicum* y se predice que codificarán una pimeloil-CoA deshidrogenasa que contenga flavina (Harrison et ál., Microbiology 151:727-736 (2005)). El genoma del simbionte de soja con fijación de nitrógeno *Bradyrhizobium japonicum* también contiene un operón *pim* compuesto por genes con una similitud de secuencia alta con respecto al *pimC* y *pimD* de *R. palustris* (Harrison et ál., Microbiology 151:727-736 (2005)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>pimC</i>	39650632	CAE29155	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
<i>pimD</i>	39650631	CAE29154	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>pimC</i>	27356102	BAC53083	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>pimD</i>	27356101	BAC53082	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>

Un candidato adicional es la 2-metil-enoil de cadena ramificada-CoA reductasa (EC 1.3.1.52), una enzima que cataliza la reducción de sustratos de trans-enoil-CoA con impedimento estérico. Esta enzima participa de la síntesis de ácidos grasos de cadena ramificada en el nemátodo *Ascaris suum* y es capaz de reducir una variedad de sustratos de cadena lineal y ramificada que incluyen 2-metilbutanoil-CoA, 2-metilpentanoil-CoA, octanoil-CoA y pentanoil-CoA (Duran et ál., J Biol. Chem. 268:22391-22396 (1993)). Se han caracterizado dos isoformas de la enzima, codificadas por los genes *acad1* y *acad*.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>acad1</i>	2407655	AAC48316.1	<i>Ascaris suum</i>
<i>Acad</i>	347404	AAA16096.1	<i>Ascaris suum</i>

1.4.1.a Oxidorreductasa (de aminación) - Varias reacciones en las Figuras 20-23 necesitan la conversión de cetonas o aldehídos en grupos amina. Una transformación de ese tipo puede alcanzarse mediante oxidorreductasas de aminación en la clase EC 1.4.1. Las enzimas en esta clase EC catalizan la desaminación oxidativa de grupos amino con NAD⁺ o NADP⁺ como aceptor, y normalmente las reacciones son reversibles.

En la Etapa D de la Figura 22, el 2-oxoácido 2-oxo-7-aminoheptanoato se convierte en homolisina, una molécula que se parece a un aminoácido (Figura 22, Etapa D; Figura 26, Etapa J). La conversión de 2-amino-7-oxosubarato en 2,7-diaminosubarato (Etapa K de la Figura 26) es una transformación similar. Los ejemplos de enzimas para catalizar estas reacciones incluyen la glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.2), leucina deshidrogenasa (EC 1.4.1.9) y aspartato deshidrogenasa (EC 1.4.1.21). El producto génico *gdhA* de la *Escherichia coli* (Korber, et ál., J Mol. Biol. 234:1270-1273. (1993)), el *gdh* de *Thermotoga maritima* (Kort et ál., Extremophiles 1:52-60. 1997); Lebbink et ál., J Mol. Biol. 280:287-296 (1998) y Lebbink et ál., J Mol. Biol. 289:357-369 (1999)), y el *gdhA1* de *Halobacterium salinarum* (Ingoldsby et ál., Gene 349:237-244 (2005)) catalizan la conversión reversible de glutamato en 2-oxoglutarato y amoniaco, al tiempo que favorecen a NADP(H), NAD(H), o ambos, respectivamente. El gen *ldh* de *Bacillus cereus* codifica la proteína LeuDH que tiene una amplia variedad de sustratos que incluyen leucina, isoleucina, valina y 2-aminobutanoato (Ansorge et ál., Biotechnol Bioeng. 68:557-562 (2000)); y Stoyan et ál., J Biotechnol 54:77-80 (1997)). El gen *nadX* de la *Thermotoga maritima* que codifica la aspartato deshidrogenasa está involucrado en la biosíntesis de NAD (Yang et ál., J Biol. Chem. 278:8804-8808 (2003)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>gdhA</i>	118547	P00370	<i>Escherichia coli</i>
<i>gdh</i>	6226595	P96110.4	<i>Thermotoga maritima</i>
<i>gdhA1</i>	15789827	NP_279651.1	<i>Halobacterium salinarum</i>
<i>ldh</i>	61222614	P0A393	<i>Bacillus cereus</i>
<i>nadX</i>	15644391	NP_229443.1	<i>Thermotoga maritima</i>

Dos reacciones implican la conversión de 3-oxoácidos en 3-aminoácidos: 3-oxo-7-aminoheptanoato en 3,7-diaminoheptanoato (Figura 21, Etapa E), 3-oxopimelato en 3-aminopimelato (Figura 21, Etapa J) y 3-oxo-1-carboxiheptanal en 3-amino-7-oxoheptanoato (Figura 21, Etapa AB). Una enzima que reacciona con 3-oxoácidos es la 3,5-diaminohexanoato deshidrogenasa (EC 1.4.1.11), una enzima que se encuentra en organismos que fermentan lisina. El gen que codifica esta enzima, *kdd*, se identificó recientemente en *Fusobacterium nucleatum* (Kreimeyer et ál., J Biol. Chem. 282:7191-7197 (2007)). La enzima se ha purificado y caracterizado en otros organismos (Baker et

ál., Chem. 247:7724-7734 (1972)); y Baker et ál., Biochemistr. 13:292-299 (1974)) pero los genes asociados a estas enzimas no se conocen. Los candidatos en *Myxococcus xanthus*, *Porphyromonas gingivalis* W83 y otros organismos secuenciados pueden deducirse mediante homología de secuencia.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>kdd</i>	19713113	AAL93966.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>mxan_4391</i>	108462082	ABF87267.1	<i>Myxococcus xanthus</i>
<i>pg_1069</i>	34397119	AAQ66183.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>

- 5 Las conversiones de 2-amino-7-oxoheptanoato en homolisina (Figura 20, Etapa G; Figura 21, Etapa Q; Figura 26, Etapa M), 3-oxo-1-carboxiheptanal en 3-oxo-7-aminoheptanoato (Figura 21, Etapa D) 3-amino-7-oxoheptanoato en 3,7-diaminoheptanoato (Figura 21, Etapa Z) y 6-aminoheptanal en HMDA (Figura 26, Etapa C; Figura 22, Etapa G) son catalizadas por oxidorreductasas de aminación que transforman aldehídos en sus correspondientes aminas primarias. Una enzima que cataliza una reacción similar es la lisina 6-deshidrogenasa (EC 1.4.1.18), codificada por los genes *lysDH*. Esta enzima cataliza la desaminación oxidativa reversible del grupo 6-amino de L-lisina para formar 2-aminoadipato-6-semialdehído (Misono et ál., J Bacteriol. 150:398-401 (1982)). Se encuentran ejemplos de enzimas en *Geobacillus stearothermophilus* (Heydari et ál., Appl Environ. Microbiol 70:937-942 (2004)), *Agrobacterium tumefaciens* (Hashimoto et ál., J Biochem 106:76-80 (1989); y Misono et ál., J Bacteriol. 150:398-401 (1982)), y *Achromobacter denitrificans* (Ruldeekulthamrong et ál., BMP Rep. 41:790-795 (2008)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>lysDH</i>	13429872	BAB39707	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>lysDH</i>	15888285	NP_353966	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>lysDH</i>	74026644	AAZ94428	<i>Achromobacter denitrificans</i>

- 15 **2.3.1.b** Aciltransferasa (beta-cetotilasa) - En la **Etapa A de la Figura 21**, se condensa glutaril-CoA y acetil-CoA para formar 3-oxopimeloil-CoA mediante oxopimeloil-CoA:glutaril-CoA aciltransferasa, una beta-cetotilasa (EC 2.3.1.16). Una enzima que cataliza esta transformación se encuentra en *Ralstonia eutropha* (que anteriormente se conocía como *Alcaligenes eutrophus*), codificada por los genes *bktB* y *bktC* (Haywood et ál., FEMS Microbiology Letters 52:91-96 (1988); y Slater et ál., J. Bacteriol. 180:1979-1987 (1998)). La secuencia de la proteína BktB es conocida; sin embargo, no se ha indicado la secuencia de la proteína BktC. El operón *pim* de *Rhodopseudomonas palustris* también codifica una beta-cetotilasa, codificada por el *pimB*, que se prevé que catalizará esta transformación en la dirección de degradación durante la degradación de benzoil-CoA (Harrison et ál., Microbiology 151:727-736 (2005)). Se identificó un candidato enzimático de beta-cetotilasa en *S. aciditrophicus* mediante homología de secuencia con respecto a *bktB* (43 % de identidad, valor e = 1e-93).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>bktB</i>	11386745	YP_725948	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>pimB</i>	39650633	CAE29156	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
<i>syn_02642</i>	85860483	YP_462685.1	<i>Syntrophus aciditrophicus</i>

- 30 Las enzimas beta-cetotilasas que catalizan la formación de beta-cetovalerato a partir de acetil-CoA y propionil-CoA también pueden ser capaces de catalizar la formación de 3-oxopimeloil-CoA. La *Zoogloea ramigera* posee dos cetotilasas que forman β -cetovaleril-CoA a partir de propionil-CoA y acetil-CoA y la *R. eutropha* tiene una cetotilasa de β -oxidación que también es capaz de catalizar esta transformación (Gruys et ál., patente de EE. UU. n.º 5,958,745 (1999)). No se han indicado las secuencias de estos genes o sus proteínas traducidas, pero se pueden identificar varios candidatos en la *R. eutropha*, *Z. ramigera*, u otros organismos en función de la homología de

secuencia con respecto a *bktB* de *R. eutropha*. Estos incluyen:

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>phaA</i>	113867452	YP_725941.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_A1713</i>	113867716	YP_726205.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>pcaF</i>	116694155	YP_728366.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_B1369</i>	116695312	YP_840888.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_A0170</i>	113866201	YP_724690.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_A0462</i>	113866491	YP_724980.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_A1528</i>	113867539	YP_726028.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_B0381</i>	116694334	YP_728545.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h176_B0662</i>	116694613	YP_728824.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_B0759</i>	116694710	YP_728921.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_B0668</i>	116694619	YP_728830.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16-A1720</i>	113867723	YP_726212.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>h16_A1887</i>	113867867	YP_726356.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>phbA</i>	135759	P07097.4	<i>Zoogloea ramigera</i>
<i>bktB</i>	194289475	YP_002005382.1	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>
<i>Rmet_1362</i>	94310304	YP_583514.1	<i>Ralstonia metallidurans</i>
<i>Bphy_0975</i>	186475740	YP_001857210.1	<i>Burkholderia phymatum</i>

Otros candidatos incluyen beta-cetotilosas que se sabe que convierten dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA (EC 2.1.3.9). Los ejemplos de enzimas acetoacetil-CoA tiolasas incluyen los productos génicos de *atoB* de la *E. coli* (Martin et ál., Nat. Biotechnol 21:796-802 (2003)), *thIA* y *thIB* de *C. acetobutylicum* (Hanai et ál., Appl Environ Microbiol 73:7814-7818 (2007)); y Winzer et ál., J. Mol. Microbiol Biotechnol 2:531-541 (2000)), y *ERG10* de *S. cerevisiae* (Hiser et ál., J. Biol. Chem. 269:31383-31389 (1994)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>atoB</i>	16130161	NP_416728	<i>Escherichia coli</i>
<i>thIA</i>	15896127	NP_349476.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>thIB</i>	15004782	NP_149242.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>ERG10</i>	6325229	NP_015297	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

- La beta-cetoadipil-CoA tiolasa (EC 2.3.1.174), también denominada «3-oxoadipil-CoA tiolasa», convierte beta-cetoadipil-CoA en succinil-CoA y acetil-CoA, y es una enzima fundamental de la vía de beta-cetoadipato para la degradación de compuestos aromáticos. La enzima está extendida en hongos y bacterias del suelo que incluyen *Pseudomonas putida* (Harwood et ál., J Bacteriol 176:6479-6488 (1994)) y *Acinetobacter calcoaceticus* (Doten et ál., J Bacteriol. 169:3168-3174 (1987)). Los productos génicos codificados por *pcaF* en *Pseudomonas* cepa B13 (Kaschabek et ál., J Bacteriol. 184:207-215 (2002)), *phaD* en *Pseudomonas putida* U (Olivera et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 95:6419-6424 (1998)), *paaE* en *Pseudomonas fluorescens* ST (Di Arch et ál., Microbiol 188:117-125 (2007)), y *paaJ* de *E. coli* (Nogales et ál., Microbiology 153:357-365 (2007)) también catalizan esta transformación. Varias beta-cetotiolasas presentan actividades significativas y selectivas en la dirección de formación de oxoadipil-CoA que incluyen *bkt* de *Pseudomonas putida*, *pcaF* y *bkt* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *bkt* de *Burkholderia ambifaria* AMMD, *paaJ* de *E. coli* y *phaD* de *P. putida*. Estas enzimas también pueden emplearse para la síntesis de 3-oxopimeloil-CoA, un compuesto estructuralmente similar a la 3-oxoadipil-CoA.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>paaJ</i>	16129358	NP_415915.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>pcaF</i>	17736947	AAL02407	<i>Pseudomonas knackmussii</i> (B13)
<i>phaD</i>	3253200	AAC24332.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>pcaF</i>	506695	AAA85138.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>pcaF</i>	141777	AAC37148.1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
<i>paaE</i>	106636097	ABF82237.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>bkt</i>	115360515	YP_777652.1	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD
<i>bkt</i>	9949744	AAG06977.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
<i>pcaF</i>	9946065	AAG03617.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1

- También se necesita una beta-cetotiolasa para condensar glutamil-CoA y acetil-CoA (Figura 20, Etapa B). Hasta donde se sabe, esta transformación no se produce de manera natural. Los candidatos de beta-cetotiolasa descritos anteriormente también son ejemplos de candidatos para catalizar esta transformación.

2.6.1.a Aminotransferasa - Varias reacciones en las Figuras 20-26 son catalizadas por aminotransferasas en la clase EC 2.6.1. Esas enzimas transfieren de manera reversible grupos amino de donantes aminados a aceptores tales como piruvato y alfa-cetoglutarato.

- Las aminotransferasas selectivas para los aldehídos son necesarias para transaminar 2-amino-7-oxoheptanoato (Figura 20, Etapa G; Figura 21, Etapa Q; Figura 26, Etapa M), 3-oxo-1-carboxiheptanal (Figura 21, Etapa D) 3-amino-7-oxoheptanoato (Figura 21, Etapa Z) y 6-aminohexanal (Figura 26, Etapa C; Figura 22, Etapa G). Un ejemplo de enzima para convertir aldehídos en aminas primarias es la lisina-6-aminotransferasa (EC 2.6.1.36). Esta función enzimática, que convierte lisina en alfa-aminoadipato semialdehído, se ha demostrado en levaduras y bacterias. Los candidatos de *Candida utilis* (Hammer et ál., J Basic Microbiol 32:21-27 (1992)), *Flavobacterium lutescens* (Fujii et ál., J Biochem. 128:391-397 (2000)) y *Streptomyces clavuligenus* (Romero et ál., Microbiol Biotechnol 18:241-246 (1997)) se han caracterizado. Una lisina-6-aminotransferasa recombinante de *S. clavuligenus* se expresó de manera funcional en *E. coli* (Tobin et ál., J Bacteriol. 173:6223-6229 (1991)). La enzima de *F. lutescens* tiene especificidad con respecto al alfa-cetoglutarato como el aminoceptor (Soda et ál., Biochemistry 7:4110-4119 (1968)). Otras enzimas que convierten aldehídos en aminas del extremo incluyen el gen *dat* en *Acinetobacter baumannii* que codifica la 2,4-diaminobutanoato:2-cetoglutarato 4-transaminasa (Ikai et ál., J Bacteriol. 179:5118-5125 (1997)). Además de su sustrato natural, el 2,4-diaminobutirato, la DAT transamina las aminas del extremo de la lisina, el 4-aminobutirato y la ornitina.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>lat</i>	10336502	BAB13756.1	<i>Flavobacterium lutescens</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>lat</i>	153343	AAA26777.1	<i>Streptomyces clavuligenus</i>
<i>dat</i>	6685373	P56744.1	<i>Acinetobacter baumannii</i>

Otras candidatas enzimáticas incluyen putrescina aminotransferasas u otras diamina aminotransferasas. La putrescina aminotransferasa de *E. coli* es codificada por el gen *ygjG* y la enzima purificada también fue capaz de transaminar cadaverina y espermidina (Samsonova et ál., Microbiol 3:2 (2003)). Además, se ha indicado la actividad de esta enzima sobre 1,7-diaminoheptano y con aminoaceptores que no son el 2-oxoglutarato (p. ej., piruvato, 2-oxobutanoato) (Kim et ál., J Biol. Chem. 239:783-786 (1964); y Samsonova et ál., Microbiol 3:2 (2003)). El gen *spuC* de *Pseudomonas aeruginosa* codifica una putrescina aminotransferasa con una actividad más alta con piruvato como el aminoaceptor que el alfa-cetoglutarato (Lu et ál., J Bacteriol. 184:3765-3773 (2002)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>ygjG</i>	145698310	NP_417544	<i>Escherichia coli</i>
<i>spuC</i>	9946143	AAG03688	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

- 10 La conversión de un aldehído en una amina del extremo también puede ser catalizada por la gamma-aminobutirato transaminasa (GABA transaminasa). Esta enzima interconvierte de manera natural semialdehído succínico y glutamato en 4-aminobutirato y alfa-cetoglutarato y se sabe que tiene una amplia variedad de sustratos (Liu et ál., Biochemistry 43:10896-10905 (2004); y Schulz et ál., Appl Environ Microbiol 56:1-6 (1990)). Las dos GABA transaminasas en la *E. coli* son codificadas por el *gabT* (Bartsch et ál., J Bacteriol. 172:7035-7042 (1990)) y *puuE* (Kurihara et ál., J. Biol. Chem. 280:4602-4608 (2005)).
- 15 Se ha demostrado que las GABA transaminasas en *Mus musculus*, *Pseudomonas fluorescens* y *Sus scrofa* reaccionan con una amplia variedad de sustratos alternativos que incluyen el ácido 6-aminocaproico (Cooper, Methods Enzymol. 113:80-82 (1985)); y Scott et ál., J Biol. Chem. 234:932-936 (1959)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>gabT</i>	16130576	NP_417148.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>puuE</i>	16129263	NP_415818.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>abat</i>	37202121	NP_766549.2	<i>Mus musculus</i>
<i>gabT</i>	70733692	YP_257332.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>abat</i>	47523600	NP_999428.1	<i>Sus scrofa</i>

- 20 Las enzimas que transaminan 3-oxoácidos son necesarias para convertir 3-oxo-7-aminoheptanoato en 3,7-diaminoheptanoato (Figura 21, Etapa E), 3-oxopimelato en 3-aminopimelato (Figura 21, Etapa J) y 3-oxo-1-carboxiheptanal en 3-amino-7-oxoheptanoato (Figura 21, Etapa AB). Hasta ahora, no se han identificado enzimas que catalicen estas transformaciones exactas. La beta-alanina/alfa-cetoglutarato aminotransferasa (WO08027742) reacciona con beta-alanina para formar semialdehído malónico, un 3-oxoácido. Se demostró que el producto génico de *SkPYD4* en la *Saccharomyces kluyveri* usa de manera preferencial beta-alanina como el donante de grupo amino (Andersen et ál., Gene. 124:105-109 (1993)). El *SkUGA1* codifica un homólogo de la GABA aminotransferasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el *UGA1* (Ramos et ál., Eur. J. Biochem. 149:401-404 (1985)), mientras que el *SkPYD4* codifica una enzima involucrada en la transaminación de beta-alanina y GABA (Andersen y Hansen, et ál., Gene. 124:105-109 (1993)).
- 25 La 3-amino-2-metilpropionato transaminasa cataliza la transformación de metilmalonato semialdehído en 3-amino-2-metilpropionato. La enzima se ha caracterizado en *Rattus norvegicus* y *Sus scrofa* y es codificada por *Abat* (Kakimoto et ál., Biochim. Biophys. Acta 156:374-380 (1968); y Tamaki et ál., Methods Enzymol. 324:376-389 (2000)).
- 30

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>SkyPYD4</i>	98626772	ABF58893.1	<i>Lachancea kluyveri</i>
<i>SkUGA1</i>	98626792	ABF58894.1	<i>Lachancea kluyveri</i>
<i>UGA1</i>	6321456	NP_011533.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Abat</i>	122065191	P50554.3	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Abat</i>	120968	P80147.2	<i>Sus scrofa</i>

Varias aminotransferasas transaminan los grupos amino de 2-oxo ácidos para formar aminoácidos. Una enzima de ese tipo es necesaria para la transaminación de 2-oxo-7-aminoheptanoato para formar homolisina (Figura 22, Etapa D; Figura 26, Etapa M) y de 2-amino-7-oxosubarato para formar 2,7-diaminosubarato (Figura 26, Etapa K). Un candidato enzimático auspicioso es la alfa-aminoadipato aminotransferasa (EC 2.6.1.39), una enzima que participa en la biosíntesis de lisina y la degradación en algunos organismos. Esta enzima interconvierte 2-aminoadipato y 2-oxoadipato, mediante el uso de alfa-cetoglutarato como el aminoaceptor. Se encuentran candidatos génicos en *Homo sapiens* (Okuno et ál., Enzyme Protein 47:136-148 (1993)) y *Thermus thermophilus* (Miyazaki et ál., Microbiology 150:2327-2334 (2004)). La enzima de *Thermus thermophilus*, codificada por el *lysN*, es activa con varios sustratos alternativos que incluyen oxaloacetato, 2-oxoisocaproato, 2-oxoisovalerato y 2-oxo-3-metilvalerato.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>lysN</i>	31096548	BAC76939.1	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>AadAT-II</i>	46395904	Q8N5Z0.2	<i>Homo sapiens</i>

Otro candidato es la aspartato aminotransferasa, una enzima que transfiere de manera natural un grupo oxo de oxaloacetato a glutamato, formando alfa-cetoglutarato y aspartato. La actividad de la aspartato aminotransferasa es catalizada, por ejemplo, por los productos génicos del *aspC* de la *Escherichia coli* (Yagi et ál., FEBS Lett. 100:81-84 (1979); y Yagi et ál., Methods Enzymol. 113:83-89 (1985)), *AAT2* de *Saccharomyces cerevisiae* (Yagi et ál., J Biochem. 92:35-43 (1982)) y *ASP5* de *Arabidopsis thaliana* (de la et ál., Plant J 46:414-425 (2006); Kwok et ál., J Exp. Bot. 55:595-604 (2004); y Wilkie et ál., Protein Expr. Purif. 12:381-389 (1998)). Se ha demostrado que la enzima de *Rattus norvegicus* transamina sustratos alternativos tales como ácido 2-aminohexanedioico y ácido 2,4-diaminobutírico (Recasens et ál., Biochemistry 19:4583-4589 (1980)). Las aminotransferasas que funcionan en otros sustratos de aminoácidos también pueden ser capaces de catalizar esta transformación. La valina aminotransferasa cataliza la conversión de valina y piruvato en 2-cetoisovalerato y alanina. El gen de la *E. coli*, *avtA*, codifica una enzima de ese tipo (Whalen et ál., J. Bacteriol. 150:739-746 (1982)). Este producto génico también cataliza la transaminación de α -cetobutirato para generar α -aminobutirato, aunque no se ha identificado el donante de amina en esta reacción (Whalen et ál., J. Bacteriol. 158:571-574 (1984)). El producto génico del *serC* de *E. coli* cataliza dos reacciones, fosfoserina aminotransferasa y fosfohidroxitreonina aminotransferasa (Lam, J. et ál., Bacteriol. 172:6518-6528 (1990)), y no se pudo detectar actividad en sustratos no fosforilados (Drewke et ál., FEBS. Lett. 390:179-182 (1996)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>aspC</i>	16128895	NP_415448.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>AAT2</i>	1703040	P23542.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ASP5</i>	20532373	P46248.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Got2</i>	112987	P00507	<i>Rattus norvegicus</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>avtA</i>	49176374	YP_026231.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>serC</i>	16128874	NP_415427.1	<i>Escherichia coli</i>

2.7.2.a Fosfotransferasa (carboxiaceptor) - Las enzimas fosfotransferasas en la clase EC 2.7.2 transforman ácidos carboxílicos en ácidos fosfónicos con la hidrólisis simultánea de un ATP. Las Etapas F, M y U en la Figura 21 necesitan una fosfotransferasa para activar los grupos carboxilo de 3-oxopimelato (Etapa F), 3-aminopimelato (Etapa M) y 2-aminopimelato (Etapa U) para formar sus correspondientes ácidos fosfónicos. La butirato cinasa (EC 2.7.2.7) lleva a cabo la conversión reversible de butiril-fosfato en butirato durante la acidogénesis en *C. acetobutylicum* (Cary et ál., Appl. Environ. Microbiol 56:1576-1583 (1990)). Esta enzima es codificada por cualquiera de los dos productos génicos *buk* (Huang et ál., J Mol. Microbiol Biotechnol 2:33-38 (2000)). Otras enzimas butirato cinasas se encuentran en *C. butyricum* y *C. tetanomorphum* (Twarog et ál., J Bacteriol. 86:112-117 (1963)). La enzima isobutirato cinasa relacionada de *Thermotoga maritima* también se ha expresado en la *E. coli* y cristalizado (Diao et ál., E. Biol. Crystallogr. 59:1100-1102 (2003); y Diao et ál., J Bacteriol. 191:2521-2529 (2009)). La aspartato cinasa cataliza la fosforilación dependiente de ATP del aspartato y participa de la síntesis de varios aminoácidos. La enzima aspartocinasa III en la *E. coli*, codificada por el *lysC*, tiene una amplia variedad de sustratos y se han elucidado los residuos catalíticos involucrados en la especificidad de sustrato (Keng et ál., Arch. Biochem. Biophys. 335:73-81 (1996)). Dos cinasas adicionales en la *E. coli* también son candidatas adecuadas: acetato cinasa y gamma-glutamil cinasa. La acetato cinasa de *E. coli*, codificada por el *ackA* (Skarstedt et ál., J. Biol. Chem. 251:6775-6783 (1976)), fosforila el propionato además del acetato (Hesslinger et ál., Mol. Microbiol 27:477-492 (1998)). La gamma-glutamil cinasa de la *E. coli*, codificada por el *proB* (Smith et ál., J. Bacteriol. 157:545-551 (1984)), fosforila el grupo de ácido gamma carbónico del glutamato.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>buk1</i>	15896326	NP_349675	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>buk2</i>	20137415	Q97II1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>buk2</i>	6685256	Q9X278.1	<i>Thermotoga maritima</i>
<i>lysC</i>	16131850	NP_418448.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>ackA</i>	16130231	NP_416799.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>proB</i>	16128228	NP_414777.1	<i>Escherichia coli</i>

2.8.3.a Coenzima-A transferasa - Las CoA transferasas catalizan la transferencia reversible de un resto de CoA de una molécula a otra. Varias transformaciones en las Figuras 20 y 21 necesitan una CoA transferasa para activar ácidos carboxílicos para formar sus correspondientes derivados de acil-CoA (Figura 20, Etapas A e I; Figura 21, Etapas H, J, V). Las enzimas candidatas para catalizar estas transformaciones incluyen los productos génicos de *cat1*, *cat2* y *cat3* de *Clostridium kluyveri*, que se ha demostrado que presentan actividad de succinil-CoA, 4-hidroxibutiril-CoA y butiril-CoA transferasa, respectivamente (Seedorf et ál., Proc. Natl. Acad. Sci EUA 105:2128-2133 (2008); y Sohling et ál., J Bacteriol. 178:871-880 (1996)). Actividades de CoA transferasa similares también se encuentran presentes en *Trichomonas vaginalis* (van Grinsven et ál., J. Biol. Chem. 283:1411-1418 (2008)) y *Trypanosoma brucei* (Riviere et ál., J. Biol. Chem. 279:45337-45346 (2004)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>cat1</i>	729048	P38946.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>cat2</i>	172046066	P38942.2	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>cat3</i>	146349050	EDK35586.1	<i>Clostridium kluyveri</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>TVAG_395550</i>	123975034	XP_001330176	<i>Trichomonas vaginalis</i> G3
<i>Tb11.02.0290</i>	71754875	XP_828352	<i>Trypanosoma brucei</i>

La enzima glutaconil-CoA-transferasa (EC 2.8.3.12) de la bacteria anaerobia *Acidaminococcus fermentans* reacciona con glutaconil-CoA y 3-butenil-CoA (Mack et ál., Eur. J. Biochem. 226:41-51 (1994)), sustratos similares en estructura a la 2,3-deshidroadiopil-CoA. Los genes que codifican esta enzima son el *gctA* y *gctB*. Esta enzima tiene una actividad reducida pero detectable con otros derivados de CoA que incluyen glutaril-CoA, 2-hidroxi-glutaril-CoA, adipil-CoA, crotonil-CoA y acilil-CoA (Buckel et ál., Eur. J Biochem. 118:315-321 (1981)). La enzima se ha clonado y expresado en la *E. coli* (Mack et ál., Eur. J. Biochem. 226:41-51 (1994)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>gctA</i>	559392	CAA57199.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>gctB</i>	559393	CAA57200.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>

Una CoA transferasa que puede utilizar acetil-CoA como el donante de CoA es la acetoacetil-CoA transferasa, codificada por los genes *atoA* (subunidad alfa) y *atoD* de *E. Coli* (subunidad beta) (Korolev et ál., Biol. Crystallogr. 58:2116-2121 (2002); y Vanderwinkel et ál., Biophys. Res. Commun. 33:902-908 (1968)). Esta enzima tiene una amplia variedad de sustratos (Sramek et ál., Arch. Biochem. Biophys. 171:14-26 (1975)) y se ha demostrado que transfiere el resto de CoA a acetato a partir de una variedad de sustratos de acil-CoA ramificados y lineales, que incluyen isobutirato (Matthies et ál., Appl Environ. Microbiol 58:1435-1439 (1992)), valerato (Vanderwinkel et ál., Biophys. Res. Commun. 33:902-908 (1968)) y butanoato (Vanderwinkel et ál., Biophys. Res. Commun. 33:902-908 (1968)). Esta enzima se induce a nivel de la transcripción mediante acetoacetato, por lo que la modificación del control de regulación puede ser necesaria para modificar genéticamente esta enzima en una vía (Pauli et ál., Eur. J Biochem. 29:553-562 (1972)). Existen enzimas similares en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Duncan et ál., Appl. Environ. Microbiol 68:5186-5190 (2002)), *Clostridium acetobutylicum* (Cary et ál., Appl. Environ. Microbiol 56:1576-1583 (1990); y Wiesenborn et ál., Appl. Environ. Microbiol 55:323-329 (1989)) y *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kosaka et ál., Biosci. Biotechnol Biochem 71:58-68 (2007)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>atoA</i>	2492994	P76459.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>atoD</i>	2492990	P76458.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>actA</i>	62391407	YP_226809.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>cg0592</i>	62389399	YP_224801.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>ctfA</i>	15004866	NP_149326.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>ctfB</i>	15004867	NP_149327.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>ctfA</i>	31075384	AAP42564.1	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>ctfB</i>	31075385	AAP42565.1	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>

La desacilación de 3-oxopimeloil-CoA para formar 3-oxopimelato (Figura 21, Etapa B) es catalizada por una 3-oxoácido-CoA transferasa (EC 2.8.3.6). La succinil-CoA:3-oxoácido-CoA transferasa, también conocida como «beta-cetoadipil-CoA transferasa», es codificada por el *pcaI* y *pcaJ* en la *Pseudomonas putida* (Kaschabek et ál., J

Bacteriol. 184:207-215 (2002)). Existen enzimas similares basadas en la homología de secuencia de proteínas en *Acinetobacter* sp. ADP1 (Kowalchuk et ál., Gene 146:23-30 (1994)). Se encuentran ejemplos adicionales de succinil-CoA:3-oxoácido-CoA transferasas en *Helicobacter pylori* (Corthesy-Theulaz et ál., J. Biol. Chem. 272:25659-25667 (1997)) y *Bacillus subtilis* (Stols et ál., Protein Expr. Purif. 53:396-403 (2007)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>pcaI</i>	24985644	AAN69545.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>pcaJ</i>	26990657	NP_746082.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>pcaI</i>	50084858	YP_046368.1	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1
<i>pcaJ</i>	141776	AAC37147.1	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1
<i>pcaI</i>	21224997	NP_630776.1	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>pcaJ</i>	21224996	NP_630775.1	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>HPAG1_0676</i>	108563101	YP_627417	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>NPAG1_0677</i>	108563102	YP_627418	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>ScoA</i>	16080950	NP_391778	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>ScoB</i>	16080949	NP_391777	<i>Bacillus subtilis</i>

5

3.1.2.a CoA hidrolasa - La hidrólisis de la 6-aminopimeloil-CoA para formar 6-aminopimelato (Figura 20, Etapa I) es llevada a cabo por la enzima acil CoA hidrolasa en la familia 3.1.2. Hasta ahora no se ha mostrado una enzima que cataliza esta transformación. Varias acetil-CoA hidrolasas eucariotas (EC 3.1.2.1) tienen una amplia especificidad de sustratos y, por lo tanto, representan enzimas candidatas adecuadas para hidrolizar el 6-aminopimelato. Por ejemplo, la enzima del cerebro de *Rattus norvegicus* (Robinson et ál., Res. Commun. 71:959-965 (1976)) puede reaccionar con butiril-CoA, hexanoil-CoA y malonil-CoA. Si bien no se ha indicado su secuencia, la enzima de la mitocondria de la hoja de la judía también tiene una amplia especificidad de sustratos, con actividad demostrada en acetil-CoA, propionil-CoA, butiril-CoA, palmitoil-CoA, oleoil-CoA, succinil-CoA y crotonil-CoA (Zeihner et ál., Plant. Physiol. 94:20-27 (1990)). La acetil-CoA hidrolasa, *ACH1*, de *S. cerevisiae* representa otra hidrolasa candidata (Buu et ál., J. Biol. Chem. 278:17203-17209 (2003)).

10

15

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>acot12</i>	18543355	NP_570103.1	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>ACH1</i>	6319456	NP_009538	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Otra hidrolasa candidata es la ácido dicarboxílico tioesterasa humana, *acot8*, que presenta actividad sobre la glutaril-CoA, adipil-CoA, suberil-CoA, sebacil-CoA y dodecanodioil-CoA (Westin et ál., J. Biol. Chem. 280:38125-38132 (2005)) y el homólogo más cercano de la *E. coli*, *eltesB*, que también puede hidrolizar una amplia variedad de CoA tioésteres (Naggert et ál., J. Biol. Chem. 266:11044-11050 (1991)). Una enzima similar también se ha caracterizado en el hígado de ratas (Deana et ál., Biochem. Int. 26:767-773 (1992)). Otras posibles tioéster hidrolasas de la *E. coli* incluyen los productos génicos de *tesA* (Bonner et ál., Chem. 247:3123-3133 (1972)), *ybgC* (Kuznetsova et ál., FEMS Microbiol Rev 29:263-279 (2005); y (Zhuang et ál., FEBS Lett. 516:161-163 (2002)), *paal* (Song et ál., J. Biol. Chem. 281:11028-11038 (2006)), y *ybdB* (Leduc et ál., J. Bacteriol. 189:7112-7126 (2007)).

20

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>tesB</i>	16128437	NP_414986	<i>Escherichia coli</i>
<i>acot8</i>	3191970	CAA15502	<i>Homo sapiens</i>
<i>acot8</i>	51036669	NP_570112	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>teas</i>	16128478	NP_415027	<i>Escherichia coli</i>
<i>ybgC</i>	16128711	NP_415264	<i>Escherichia coli</i>
<i>paal</i>	16129357	NP_415914	<i>Escherichia coli</i>
<i>ybdB</i>	16128580	NP_415129	<i>Escherichia coli</i>

Incluso otra hidrolasa candidata es la glutacolato CoA-transferasa de la *Acidaminococcus fermentans*. Esta enzima fue transformada mediante mutagénesis dirigida al sitio en una acil-CoA hidrolasa con actividad en glutaril-CoA, acetil-CoA y 3-butenil-CoA (Mack et ál., FEBS. Lett. 405:209-212 (1997)). Esto sugiere que las enzimas que codifican succinil-CoA:3-cetoácido-CoA transferasas y acetoacetil-CoA:acetil-CoA transferasas también pueden servir como candidatas para esta etapa de reacción pero necesitarían determinadas mutaciones para cambiar su función.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>gctA</i>	559392	CAA57199	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>gctB</i>	559393	CAA57200	<i>Acidaminococcus fermentans</i>

4.1.1.a Carboxi-liasas - Las reacciones de descarboxilación de la homolisina para formar HMDA (Figura 20, Etapa H; Figura 21, Etapa S; Figura 22, Etapa E; Figura 26, Etapa H), de 2-aminopimelato para formar 6-ACA (Figura 20, Etapa J, Figura 21, Etapa AA y Figura 26, Etapa E), de 2,7-diaminosubarato para formar homolisina (Figura 26, Etapa L), de 2-amino-7-oxoheptanoato para formar 6-aminoheptanal (Figura 26, Etapa B; Figura 22, Etapa F) y de 2-amino-7-oxosubarato para formar 2-oxo-7-aminoheptanoato (Figura 26, Etapa I) son catalizadas por enzimas aminoácido descarboxilasas. La lisina descarboxilasa (EC 4.1.1.18) cataliza una transformación similar: la descarboxilación de lisina para formar cadaverina. Dos isozimas de esta enzima son codificadas en el genoma de la *E. coli* por los genes *cadA* y *ldcC*. El CadA se encuentra involucrado en la resistencia a ácidos y está sometido a una regulación positiva por parte del producto génico *cadC* (Lemonnier et ál., Microbiology 144 (Pt 3):751-760 (1998)). El CadC acepta la hidroxilisina y S-aminoetilcisteína como sustratos alternativos, pero el 2-aminopimelato y 6-ACA actúan como inhibidores en competencia para esta enzima (Sabo et ál., Biochemistry 13:662-670 (1974)). La evolución dirigida u otros métodos de modificación genética de enzimas pueden ser necesarios para que esta enzima descarboxile el 2-aminopimelato. El gen *ldc* expresado de manera constitutiva es menos activo que el CadA (Lemonnier et ál., Microbiology 144 (Pt 3):751-760 (1998)). Una lisina descarboxilasa análoga al CadA se identificó recientemente en *Vibrio parahaemolyticus* (Tanaka, et ál., J Appl Microbiol 104:1283-1293 (2008)). La lisina descarboxilasa de *Selenomonas ruminantium*, codificada por el *ldc*, presenta una similitud de secuencia con respecto a las ornitina descarboxilasas eucariotas, y acepta a la L-lisina y la L-ornitina como sustratos (Takatsuka et ál., Biosci. Biotechnol Biochem. 63:1843-1846 (1999)). Los residuos del sitio activo se identificaron y modificaron genéticamente para alterar la especificidad de sustratos de la enzima (Takatsuka et ál., J Bacteriol. 182:6732-6741 (2000)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>cadA</i>	145458	AAA23536.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>ldcC</i>	1786384	AAC73297.1	<i>Escherichia coli</i>

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>ldc</i>	13124043	O50657.1	<i>Selenomonas ruminantium</i>
<i>cadA</i>	44886078	AB 124819.1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

Varias enzimas ornitina descarboxilasas (EC 4.1.1.17) presentan actividad sobre la lisina y otros compuestos similares. Esas enzimas se encuentran en *Nicotiana glutinosa* (Lee et ál., Biochem. J 360:657-665 (2001)), *Lactobacillus sp. 30a* (Guirard et ál., J Biol. Chem. 255:5960-5964 (1980)) y *Vibrio vulnificus* (Lee et ál., J Biol. Chem. 282:27115-27125 (2007)). Las enzimas de *Lactobacillus sp. 30a* (Momany et ál., J Mol. Biol. 252:643-655 (1995)) y *V. vulnificus* se han cristalizado. La enzima de *V. vulnificus* cataliza de manera eficiente la descarboxilación de lisina y se han elucidado los residuos involucrados en la especificidad de sustratos (Lee et ál., J Biol. Chem. 282:27115-27125 (2007)). Una enzima similar se ha caracterizado en *Trichomonas vaginalis*, pero no se conoce el gen que codifica esta enzima (Yarlett et ál., Biochem. J 293 (Pt 2):487-493 (1993)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>AF323910.1:1..1299</i>	12007488	AAG45222.1	<i>Nicotiana glutinosa</i>
<i>odc1</i>	1169251	P43099.2	<i>Lactobacillus sp. 30a</i>
<i>VV2_1235</i>	27367615	NP_763142.1	<i>Vibrio vulnificus</i>

Se necesitan enzimas cetó-ácido descarboxilasas para convertir 2-oxo-7-aminoheptanoato en 6-aminoheptanal (Etapa F de la Figura 22; Etapa G de la Figura 26) y 2-amino-7-oxosubarato en 2-amino-7-oxoheptanoato (Etapa A de la Figura 26). La descarboxilación de cetó-ácidos es catalizada por una variedad de enzimas con especificidades de sustratos variadas, que incluyen la piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1), benzoilformiato descarboxilasa (EC 4.1.1.7), alfa-cetoglutarato descarboxilasa y alfa-cetó-ácido descarboxilasa de cadena ramificada. La piruvato descarboxilasa (PDC), también denominada «cetó-ácido descarboxilasa», es una enzima fundamental en la fermentación alcohólica, que cataliza la descarboxilación de piruvato para formar acetaldehído. La enzima de *Saccharomyces cerevisiae* tiene una amplia variedad de sustratos para 2-cetó ácidos alifáticos que incluyen 2-cetobutirato, 2-cetovalerato, 3-hidroxipiruvato y 2-fenilpiruvato (Henning et ál., Appl. Environ. Microbiol. 72:7510-7517 (2006)). Esta enzima se ha estudiado extensamente, modificado genéticamente para obtener una actividad alterada y expresado funcionalmente en la *E. coli* (Killenberg-Jabs et ál., Eur. J. Biochem. 268:1698-1704 (2001); Li, H. y F. Jordan, Biochemistry. 38:10004-10012 (1999); y ter Schure et ál., Appl. Environ. Microbiol. 64:1303-1307 (1998)). La PDC de *Zymomonas mobilis*, codificada por el *pdv*, también tiene una amplia variedad de sustrato y se ha sometido a estudios de modificación genética dirigida a alterar la afinidad para diferentes sustratos (Siegert et ál., Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005)). La estructura cristalina de esta enzima se encuentra disponible (Killenberg-Jabs et ál., Eur. J. Biochem. 268:1698-1704 (2001)). Otros candidatos de PDC bien caracterizados incluyen las enzimas de *Acetobacter pasteurians* (Chandra et ál., Arch. Microbiol. 176:443-451 (2001)) y *Kluyveromyces lactis* (Krieger et ál., Eur. J. Biochem. 269:3256-3263 (2002)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>pdv</i>	118391	P06672.1	<i>Zymomonas mobilis</i>
<i>pdv1</i>	30923172	P06169	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>pdv</i>	20385191	AM21208	<i>Acetobacter pasteurians</i>
<i>pdv1</i>	52788279	Q12629	<i>Kluyveromyces lactis</i>

Al igual que la PDC, la benzoilformiato descarboxilasa (EC 4.1.1.7) tiene una amplia variedad de sustratos y ha sido objeto de estudios de modificación genética de enzimas. La enzima de *Pseudomonas putida* se ha estudiado extensamente y se encuentran disponibles estructuras cristalinas de esta enzima (Hasson et ál., Biochemistry 37:9918-9930 (1998); Polovnikova et ál., Biochemistry 42:1820-1830 (2003)). La mutagénesis dirigida al sitio de dos residuos en el sitio activo de la enzima de *Pseudomonas putida* alteró la afinidad (Km) de sustratos de origen no

natural y no natural (Siegert et ál., Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005)). Las propiedades de esta enzima se han modificado de manera adicional mediante modificación genética dirigida (Lingen et ál., Protein Eng 15:585-593 (2002); y Lingen et ál., Chembiochem. 4:721-726 (2003)). La enzima de *Pseudomonas aeruginosa*, codificada por el *mdlC*, también se ha caracterizado de manera experimental (Barrowman et ál., FEMS Microbiology Letters 34:57-60 (1986)). Otros candidatos génicos de *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens* y otros organismos pueden deducirse a partir de la homología de secuencia o identificarse mediante el uso de un sistema de selección de desarrollo que se desarrolló en *Pseudomonas putida* (Henning et ál., Appl. Environ. Microbiol. 72:7510-7517 (2006)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>mdlC</i>	3915757	P20906.2	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>mdlC</i>	81539678	Q9HUR2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>dpgB</i>	126202187	ABN80423.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>ilvB-1</i>	70730840	YP_260581.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Una tercera enzima capaz de descarboxilar 2-oxoácidos es la alfa-cetoglutarato descarboxilasa (KGD). Hasta ahora no se ha estudiado la variedad de sustratos de esta clase de enzimas. La KDC de *Mycobacterium tuberculosis* (Tian et ál., Proc Natl Acad Sci EUA 102:10670-10675 (2005)) se ha clonado y expresado de manera funcional en otros proyectos internos en Genomática. Sin embargo, no representa un candidato ideal para la modificación genética de la cepa debido a su gran tamaño (~130 kD) y riqueza de GC. Se ha detectado la actividad enzimática de la KDC en varias especies de rizobios que incluyen *Bradyrhizobium japonicum* y *Mesorhizobium loti* (Green et ál., J. Bacteriol. 182:2838-2844 (2000)). Si bien el o los genes de codificación de KDC no se han aislado en estos organismos, las secuencias genómicas se encuentran disponibles y varios genes en cada genoma se registran como KDC putativas. Una KDC de *Euglena gracilis* también se ha caracterizado, pero el gen asociado a esta actividad no se ha identificado hasta ahora (Shigeoka y Nakano, Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28 (1991)). Se secuenciaron los primeros veinte aminoácidos desde el extremo N MTYKAPVKDVKFLDKVFKV (SEQ ID NO:) (Shigeoka y Nakano, Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28 (1991)). El gen podría identificarse mediante la evaluación de genes candidatos que contengan esta secuencia del extremo N para la actividad de KDC.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>kgd</i>	160395583	O50463.4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>kgd</i>	27375563	NP_767092.1	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>kgd</i>	13473636	NP_105204.1	<i>Mesorhizobium loti</i>

Una cuarta enzima candidata para catalizar esta reacción es la alfa-cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada (BCKA). Se ha demostrado que esta clase de enzima funciona en una variedad de compuestos que varían en longitud de cadena de 3 a 6 carbonos (Oku y Kaneda, J Biol Chem. 263:18386-18396 (1988); y Smit et ál., Appl Environ Microbiol. 71:303-311 (2005)). La enzima en *Lactococcus lactis* se ha caracterizado en una variedad de sustratos ramificados y lineales que incluyen 2-oxobutanoato, 2-oxohexanoato, 2-oxopentanoato, 3-metil-2-oxobutanoato, 4-metil-2-oxobutanoato e isocaproato (Smit et ál., Appl Environ Microbiol. 71:303-311 (2005)). La enzima se ha caracterizado estructuralmente (Berg et ál., Science. 318:1782-1786 (2007)). Las alineaciones de secuencias entre la enzima de *Lactococcus lactis* y la piruvato descarboxilasa de *Zymomonas mobilis* indican que los residuos de reconocimiento de sustratos y catalíticos son casi idénticos (Siegert et ál., Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005)), por lo que esta enzima sería una candidata auspiciosa para la modificación genética dirigida. La descarboxilación del alfa-cetoglutarato por parte de una BCKA se detectó en *Bacillus subtilis*; sin embargo, esta actividad fue baja (5 %) con respecto a la actividad en otros sustratos de cadena ramificada (Oku y Kaneda, J Biol Chem. 263:18386-18396 (1988)) y el gen que codifica esta enzima no se ha identificado hasta ahora. Se pueden identificar candidatos génicos de BCKA adicionales mediante la homología con respecto a la secuencia de proteínas de *Lactococcus lactis*. Muchas de las coincidencias de BLASTp de puntuación alta con esta enzima se registran como indolpiruvato descarboxilasas (EC 4.1.1.74). La indolpiruvato descarboxilasa (IPDA) es una enzima que cataliza la descarboxilación de indolpiruvato para formar indolacetaldehído en plantas y bacterias de plantas.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>kdcA</i>	44921617	AAS49166.1	<i>Lactococcus lactis</i>

Enzimas alfa-ceto ácido descarboxilasas de cadena ramificada recombinantes derivadas de las subunidades E1 del complejo de ceto ácido deshidrogenasa de cadena ramificada mitocondrial de *Homo sapiens* y *Bos taurus* se han clonado y expresado de manera funcional en *E. coli* (Davie et ál., J. Biol. Chem. 267:16601-16606 (1992); Wynn et ál., J. Biol. Chem. 267:1881-1887 (1992); y Wynn et ál., J. Biol. Chem. 267:12400-12403 (1992)). En estos estudios, los autores descubrieron que la expresión conjunta de las chaperoninas GroEL y GroES mejoró 500 veces la actividad específica de la descarboxilasa (Wynn et ál., J. Biol. Chem. 267:12400-12403 (1992)). Estas enzimas están compuestas por dos subunidades alfa y dos beta.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>BCKDHB</i>	34101272	NP_898871.1	<i>Homo sapiens</i>
<i>BCKDHA</i>	11386135	NP_000700.1	<i>Homo sapiens</i>
<i>BCKDHB</i>	115502434	P21839	<i>Bos taurus</i>
<i>BCKDHA</i>	129030	P11178	<i>Bos taurus</i>

4.1.2.a La condensación de piruvato con 4-aminobutanol (Figura 22, Etapa A) o glutamato-5-semialdehído (Figura 27, Etapa A) es catalizada por una aldehído liasa en la clase EC 4.1.2. Una variedad de enzimas aldehído liasas utilizan el piruvato como un aceptor; sin embargo, no se ha demostrado que ninguna de estas utilice 4-aminobutanol o glutamato-5-semialdehído como un donante. La enzima 4-hidroxi-2-oxopimelato (HODH) aldolasa (EC 4.1.2.-) condensa semialdehído succínico y piruvato para catalizar la formación de 4-hidroxi-2-oxopimelato. Esta enzima es una aldolasa de clase II dependiente de ion metálico divalente, que cataliza la etapa final de la degradación de ácido 4-hidroxifenilacético en *E. coli* C, *E. coli* W, y otros organismos. En el contexto natural, la enzima funciona en la dirección de degradación. La reacción inversa (de condensación) es desfavorable desde el punto de vista termodinámico; sin embargo, el equilibrio puede desplazarse a través del acoplamiento de la HODH aldolasa a enzimas de vías posteriores que funcionen de manera eficiente en productos de reacción. Esas estrategias han sido eficaces para desplazar el equilibrio de otras aldolasas en la dirección de condensación (Nagata et ál., Appl Microbiol Biotechnol 44:432-438 (1995); y Pollard et ál., Appl Environ. Microbiol 64:4093-4094 (1998)). La enzima de *E. coli* C, codificada por el *hpcH*, es capaz de condensar una variedad de aceptores de aldehído con piruvato y recientemente se ha cristalizado (Rea et ál., J Mol. Biol. 373:866-876 (2007); y Stringfellow et ál., Gene 166:73-76 (1995)). La enzima de *E. coli* W es codificada por el *hpaI* (Prieto et ál., J Bacteriol. 178:111-120 (1996)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>hpcH</i>	633197	CAA87759.1	<i>Escherichia coli</i> C
<i>hpaI</i>	38112625	AAR11360.1	<i>Escherichia coli</i> W

Otra aldehído liasa que utiliza piruvato es la 2-deshidro-3-desoxiglucarato aldolasa (DDGA, EC 4.1.2.20), una aldolasa tipo II que participa de la vía catabólica para la utilización de D-glucarato/galactarato en la *E. coli*. El donante natural de esta enzima es el tartronato semialdehído, pero esta enzima tiene una amplia especificidad de sustratos y se ha demostrado que condensa de manera reversible una amplia variedad de aldehídos con piruvato (Fish et ál., Methods Enzymol. 9:529-534 (1966)). Se ha determinado la estructura cristalina de esta enzima y se ha propuesto un mecanismo catalítico (Izard et ál., EMBO J 19:3849-3856 (2000)). Otras enzimas DDGA candidatas se encuentran en *Leptospira interrogans* (118) y *Sulfolobus solfataricus* (Buchanan et ál., Biochem. J 343 Pt 3:563-570 (1999)). La enzima de *S. solfataricus* es altamente termoestable y se clonó y expresó en la *E. coli* (Buchanan et ál., Biochem. J 343 Pt 3:563-570 (1999)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>garL</i>	1176153	P23522.2	<i>Escherichia coli</i>
<i>LA_1624</i>	24195249	AAN48823.1	<i>Leptospira interrogans</i>
<i>AJ224174.1:1..885</i>	2879782	CAA11866.1	<i>Sulfolobus solfataricus</i>

4.2.1.a Hidro-liasas - Dos reacciones en las Figuras 20 y 22 emplean enzimas en la clase de deshidratasas (EC 4.1.2). La deshidratación de la 3-hidroxi-6-aminopimeloil-CoA (Figura 20, Etapa D) es catalizada por una enoil-CoA hidratasa. Hasta donde se sabe, esta reacción no se produce de manera natural; sin embargo, la capacidad de deshidratar derivados de 3-hidroxiacil-CoA se encuentra extendida. Las enoil-CoA hidratasas (EC 4.2.1.17) catalizan la deshidratación de una variedad de sustratos de 3-hidroxiacil-CoA (Agnihotri et ál., Bioorg. Med. Chem. 11:9-20 (2003); Conrad et ál., J Bacteriol. 118:103-111 (1974) y Roberts et ál., Arch. Microbiol 117:99-108 (1978)). La enoil-CoA hidratasa de *Pseudomonas putida*, codificada por el *ech*, cataliza la conversión de 3-hidroxiacil-CoA en crotonil-CoA (Roberts et ál., Arch. Microbiol 117:99-108 (1978)). Otros candidatos de enoil-CoA hidratasa son el *phaA* y *phaB*, de *P. putida*, y *paaA* y *paaB* de *P. fluorescens* (Olivera et ál., Proc. Natl. Acad. Sci EUA 95:6419-6424 (1998)). Se prevé que el producto génico de *pimF* en *Rhodopseudomonas palustris* codifique una enoil-CoA hidratasa que participe de la degradación de pimeloil-CoA (Harrison et ál., Microbiology 151:727-736 (2005)). Por último, se ha demostrado que una cantidad de genes de *Escherichia coli* muestran funcionalidad de enoil-CoA hidratasa, lo cual incluye *maoC* (Park et ál., J. Bacteriol. 185:5391-5397. 2003), *paaF* (Ismail et ál., Eur. J Biochem. 270:3047-3054 (2003); Park et ál., Appl. Biochem. Biotechnol 113-116:335-346 (2004) y (Park et ál., Biotechnol Bioeng 86:681-686 (2004)) y *paaG* (Park et ál., J Bacteriol. 185:5391-5397. 2003), *paaF* (Ismail et ál., Eur. J Biochem. 270:3047-3054 (2003); Park et ál., Appl. Biochem. Biotechnol 113-116:335-346 (2004) y Park et ál., Biotechnol Bioeng 86:681-686 (2004)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>ech</i>	26990073	NP_745498.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaA</i>	26990002	NP_745427.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaB</i>	26990001	NP_745426.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>phaA</i>	106636093	ABF82233.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>phaB</i>	106636094	ABF82234.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>pimF</i>	39650635	CAE29158	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
<i>maoC</i>	16129348	NP_415905.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaF</i>	16129354	NP_415911.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaG</i>	16129355	NP_415912.1	<i>Escherichia coli</i>

La 3-hidroxiacil-CoA deshidratasa (EC 4.2.1.55), también denominada «crotonasa», es una enoil-CoA hidratasa que deshidrata 3-hidroxiisobutiril-CoA para formar crotonil-CoA. Las enzimas crotonasas son necesarias para la formación de n-butanol en algunos organismos, particularmente la especie *Clostridium*, y también comprenden una etapa del ciclo 3-hidroxiisobutiril-CoA/4-hidroxiisobutirato en las arqueas termófilas de los géneros *Sulfolobus*, *Acidianus* y *Metallosphaera*. Pueden encontrarse ejemplos de genes que codifican enzimas crotonasas en *C. acetobutylicum* (Atsumi et ál., Metab Eng. 10:305-311 (2008); y Boynton et ál., J Bacteriol. 178:3015-3024 (1996)), *C. kluyveri* (Hillmer et ál., FEBS Lett. 21:351-354. 1972)), y *Metallosphaera sedula* (Berg et ál., Science. 318:1782-1786 (2007)) aunque la secuencia de este último gen no se conoce.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>crt</i>	15895969	NP_349318.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>crt1</i>	153953091	YP_001393856.1	<i>Clostridium kluyveri</i>

De manera alternativa, los productos génicos de *E. coli* del *fadA* y *fadB* codifican un complejo multienzimático involucrado en la oxidación de ácidos grasos que presenta actividad de enoil-CoA hidratasa (Nakahigashi et ál., Nucleic Acids Res. 18:4937 (1990); Yang et ál., J Bacteriol. 173:7405-7406 (1991) y Yang et ál., Biochemistry 30:6788-6795 (1991)). La inactivación de un regulador negativo codificado por el *fadR* puede utilizarse para activar el producto génico *fadB* (Sato et ál., J Biosci. Bioeng 103:38-44 (2007)). Los genes *fadI* y *fadJ* codifican funciones similares y se expresan de manera natural en condiciones anaerobias (Campbell et ál., Mol. Microbiol 47:793-805 (2003)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>fadA</i>	49176430	YP_026272.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadB</i>	16131692	NP_418288.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadI</i>	16130275	NP_416844.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadJ</i>	16130274	NP_416843.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadR</i>	16129150	NP_415705.1	<i>Escherichia coli</i>

Se forma 2-oxo-7-aminohept-3-enoato a partir de la deshidratación de 2-oxo-4-hidroxi-7-aminoheptanoato (Figura 22, Etapa B). La deshidratación de 2-amino-5-hidroxi-7-oxosubarato para formar 2-amino-5-eno-7-oxosubarato (Figura 27, Etapa B) es una transformación similar. Hasta donde se sabe, las enzimas que catalizan estas reacciones exactas no se producen de manera natural. Una enzima candidata que cataliza una reacción similar es la OHED hidratasa, que deshidrata de manera natural el 2-oxo-4-hidroxi-hepta-1,7-dioato (HODH) para formar 2-oxo-hept-4-eno-1,7-dioato (OHED). La HODH es similar en estructura a los sustratos deseados. Esta enzima requiere magnesio como un cofactor (Burks et ál., J. Am. Chem. Soc. 120 (1998)). Los candidatos enzimáticos de OHED hidratasa se han identificado y caracterizado en *E. coli* C (Izumi et ál., J Mol. Biol. 370:899-911 (2007; y Roper et ál., Gene 156:47-51 (1995)) y *E. coli* W (Prieto et ál., J Bacteriol. 178:111-120 (1996)). La comparación de secuencias revela homólogos en una variedad de bacterias, plantas y animales. Enzimas con secuencias muy similares se encuentran contenidas en *Klebsiella pneumonia* (91 % de identidad, valor e = 2e-138) y *Salmonella enterica* (91 % de identidad, valor e = 4e-138), entre otras.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>hpcG</i>	556840	CAA57202.1	<i>Escherichia coli</i> C
<i>hpaH</i>	757830	CAA86044.1	<i>Escherichia coli</i> W
<i>hpaH</i>	150958100	ABR80130.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Sari_01896</i>	160865156	ABX21779.1	<i>Salmonella enterica</i>

Un candidato enzimático alternativo para catalizar esta reacción es la fumarasa, también conocida como «fumarato hidratasa» (EC 4.2.1.2). La *E. coli* tiene tres fumarasas: FumA, FumB y FumC que son reguladas por las condiciones de desarrollo. La FumB es sensible al oxígeno y solamente presenta actividad en condiciones anaerobias. La FumA es activa en condiciones microanaerobias, y la FumC es la única enzima activa en desarrollo aerobio (Guest et ál., J Gen Microbiol. 131:2971-2984 (1985); Tseng et ál., J Bacteriol 183:461-467 (2001) y Woods et ál., Biochim Biophys Acta 954:14-26 (1988)). Se ha demostrado que la FumC deshidrata sustratos alternativos que incluyen el tartrato y

treo-hidroxiaspartato (Teipel et ál., J Biol. Chem. 243:5684-5694 (1968)). Se encuentra disponible mucha información estructural para la FumC y los investigadores han modificado con éxito la enzima para alterar la actividad, inhibición y localización (Weaver et ál., D Biol Crystallogr. 61:1395-1401 (2005)). Otras enzimas fumarato hidratadas se encuentran en la *Escherichia coli* (Estevez et ál., Protein Sci 11:1552-1557 (2002); Hong, et ál., Biotechnol. Bioprocess Eng. 9:252-255 (2005)) y Rose et ál., Proc Natl Acad Sci EUA 101:3393-3397 (2004)), *Corynebacterium glutamicum* (Genda et ál., Biotechnol Biochem. 70:1102-1109 (2006)), *Campylobacter jejuni* (Smith et ál., Cell Biol 31:961-975 (1999)), *Thermus thermophilus* (Mizobata et ál., Arch. Biochem. Biophys. 355:49-55 (1998)) y *Rattus norvegicus* (Kobayashi et ál., J Biochem. 89:1923-1931 (1981)). La fumarasa MmcBC de *Pelotomaculum thermopropionicum* es otra clase de fumarasa con dos subunidades (Shimoyama et ál., FEMS Microbiol Lett 270:207-213 (2007)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>fumA</i>	81175318	P0AC33	<i>Escherichia coli</i> K12
<i>fumB</i>	33112655	P14407	<i>Escherichia coli</i> K12
<i>fumC</i>	120601	P05042.1	<i>Escherichia coli</i> K12
<i>fumC</i>	39931596	Q8NRN8.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>fumC</i>	9789756	O69294.1	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>fumC</i>	75427690	P84127	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>fumH</i>	120605	P14408.1	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>MmcB</i>	147677691	YP_001211906	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>
<i>MmcC</i>	147677692	YP_001211907	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>

Otro candidato enzimático es la citramato hidrolasa (EC 4.2.1.34), una enzima que deshidrata de manera natural 2-metilmalato para formar mesaconato. Esta enzima se ha estudiado en *Methanocaldococcus jannaschii* en el contexto de la vía de piruvato para formar 2-oxobutanoato, donde ha demostrado tener una amplia especificidad de sustratos (Drevland et ál., J Bacteriol. 189:4391-4400 (2007)). Esta actividad enzimática también se detectó en *Clostridium tetanomorphum*, *Morganella morganii*, *Citrobacter amalonaticus* donde se cree que participa de la degradación de glutamato (Kato et ál., Arch. Microbiol 168:457-463 1997)). La secuencia de proteínas de *M. jannaschii* no presenta una homología significativa con respecto a los genes en estos organismos.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>leuD</i>	3122345	Q58673.1	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>

5.4.3.a Aminomutasa - Varias reacciones en la Figura 21 involucran desplazar una amina secundaria de la posición 3 a la 2 (Figura 21, Etapas P, R, T). Un candidato enzimático auspicioso para catalizar estas transformaciones es la lisina 2,3-aminomutasa (EC 5.4.3.2), una enzima que convierte de manera natural lisina en (3S)-3,6-diaminohexanoato, desplazando de manera reversible un grupo amina de la posición 2 a la 3. La enzima se encuentra en bacterias que fermentan la lisina para formar acetato y butirato, que incluyen *Fusobacterium nucleatum* (*kamA*) (Barker et ál., J. Bacteriol. 152:201-207 (1982)) y *Clostridium subterminale* (*kamA*) (Chirpich et ál., J. Biol. Chem. 245:1778-1789 (1970)). La enzima de *Clostridium subterminale* se ha cristalizado (117). Una enzima que codifica esta función también es codificada por el *yodO* en *Bacillus subtilis* (Chen et ál., Biochem. J. 348 Pt 3:539-549 (2000)). La enzima utiliza piridoxal 5'-fosfato como un cofactor, requiere activación por parte de una S-adenosilmetioionina, y es estereoselectiva con respecto a la L-lisina. No se ha demostrado que la enzima reaccione con sustratos alternativos, por lo que se puede necesitar evolución dirigida u otros métodos de modificación genética para que esta enzima reaccione con los sustratos no naturales 3-amino-7-oxohexanoato, 3,7-diaminoheptanoato y 3-aminopimelato. Por ejemplo, Cargill ha desarrollado una enzima 2,3-aminomutasa novedosa derivada de lisina-2,3-aminomutasa que convierte L-alanina en β -alanina (Liao et ál., patente de EE. UU. 20050221466 (2005)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>kamA</i>	75423266	Q9XBQ8.1	<i>Clostridium subterminale</i>
<i>kamA</i>	81485301	Q8RHX4	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>yodO</i>	4033499	034676.1	<i>Bacillus subtilis</i>

Otras enzimas con actividad de 2,3-aminomutasa incluyen la tirosina 2,3-aminomutasa (EC 5.4.3.6) y leucina 2,3-aminomutasa (EC 5.4.3.7). La tirosina 2,3-aminomutasa participa de la biosíntesis de tirosina, convirtiendo de manera reversible tirosina en 3-amino-3-(4-hidroxifenil)-propionato mediante el desplazamiento de una amina de la posición 2 a la 3. En la *Streptomyces globisporus*, también se ha demostrado que la enzima reacciona con derivados de tirosina (Christenson et ál., Biochemistry 42:12708-12718 (2003)); sin embargo, la secuencia de esta enzima todavía no se encuentra disponible. La leucina 2,3-aminomutasa convierte L-leucina en beta-leucina durante la biosíntesis y degradación de leucina. Un ensayo específico de la leucina 2,3-aminomutasa detectó la actividad enzimática en muchos organismos (Poston et ál., Methods Enzymol. 166:130-135 (1988)), pero no se han identificado hasta ahora genes que codifiquen la enzima.

6.2.1.a Ácido-tiol ligasa - La activación de ácidos carboxílicos para formar derivados de acil-CoA es catalizada por CoA ácido-tiol ligasas o CoA sintetetas en la clase EC 6.2.1 (los términos «ligasa», «sintetasa» y «sintasa» se usan en la presente memoria de manera intercambiable y hacen referencia a la misma clase de enzimas). Esas enzimas acoplan el costo energético de la formación de enlaces tioéster a la hidrólisis de ATP para formar ADP o AMP. Se ha demostrado que varias CoA ligasas formadoras de ADP reaccionan en la dirección inversa, removiendo el resto de CoA de las moléculas de acil-CoA y formando de manera concomitante ATP. Se necesitan CoA ligasas reversibles para desacilar 6-aminopimeloil-CoA (Figura 20, Etapa I) y 3-oxopimeloil-CoA (Figura 21, Etapa B), mientras que las ligasas formadoras de AMP o ADP pueden acilar 3-oxopimelato (Figura 21, Etapa H), 3-aminopimelato (Figura 21, Etapa K) y 2-aminopimelato (Figura 21, Etapa V). Las enzimas que catalizan estas transformaciones exactas no se han caracterizado hasta ahora; sin embargo, se han descrito varias enzimas con especificidades de sustratos amplias en la bibliografía.

La acetil-CoA sintetasa formadora de ADP (ACD, EC 6.2.1.13) es una enzima que acopla la conversión de ésteres de acil-CoA en sus correspondientes ácidos con la síntesis concomitante de ATP. Se demostró que la ACD I de *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por AF1211, funciona en una variedad de sustratos de cadena lineal y ramificada que incluyen el isobutirato, isopentanoato y fumarato (Musfeldt et ál., J. Bacteriol. 184:636-644 (2002)). También se demostró que una segunda ACD reversible en *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por AF1983, tiene una amplia variedad de sustratos con actividad alta en los compuestos cíclicos fenilacetato e indolacetato (Musfeldt et ál., J. Bacteriol. 184:636-644 (2002)). La enzima de *Haloarcula marismortui* (mencionada como una succinil-CoA sintetasa) acepta propionato, butirato y ácidos de cadena ramificada (isovalerato e isobutirato) como sustratos y se demostró que funciona en la dirección directa e inversa (Brasen et ál., Arch. Microbiol 182:277-287 (2004)). La ACD codificada por PAE3250 de la crenarquea hipertermofílica *Pyrobaculum aerophilum* mostró la variedad de sustrato más amplia de todas las ACD caracterizadas, y reaccionó con acetil-CoA, isobutiril-CoA (sustrato preferido) y fenilacetil-CoA (Brasen et ál., Arch. Microbiol 182:277-287 (2004)). Se puede usar la modificación genética o evolución dirigida para modificar esta enzima para que funcione a la temperatura fisiológica del organismo hospedador. Las enzimas de *A. fulgidus*, *H. marismortui* y *P. aerophilum* se han clonado, expresado funcionalmente y caracterizado en *E. coli* (Brasen et ál., Arch. Microbiol 182:277-287 (2004); y Musfeldt et ál., J. Bacteriol. 184:636-644 (2002)). Un candidato adicional es la enzima codificada por el *sucCD* en *E. coli*, que cataliza de manera natural la formación de succinil-CoA a partir de succinato con el consumo concomitante de un ATP, una reacción que es reversible *in vivo* (Buck et ál., Biochemistry 24:6245-6252 (1985)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>AF1211</i>	11498810	NP_070039.1	<i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 4304
<i>AF1983</i>	11499565	NP_070807.1	<i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 4304
<i>scs</i>	55377722	YP_135572.1	<i>Haloarcula marismortui</i>
<i>PAE3250</i>	18313937	NP_560604.1	<i>Pyrobaculum aerophilum</i> str. IM2

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>sucC</i>	16128703	NP_415256.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>sucD</i>	1786949	AAC73823.1	<i>Escherichia coli</i>

- 5 Otra enzima candidata es la pimeloil-CoA ligasa formadora de AMP (EC 6.2.1.14), que activa de manera natural el pimelato para formar pimeloil-CoA durante la biosíntesis de biotina en bacterias grampositivas. Se demostró que la enzima de *Pseudomonas mendocina*, clonada en *E. coli*, acepta los sustratos alternativos hexanodioato y nonanodioato (Binieda et ál., Biochem. J 340 (Pt 3):793-801 (1999)). Otros candidatos de pimeloil-CoA ligasa se encuentran en *Bacillus subtilis* (Bower et ál., J Bacteriol. 178:4122-4130 (1996)) y *Lysinibacillus sphaericus* (anteriormente *Bacillus sphaericus*) (Ploux et ál., Biochem. J 287 (Pt 3):685-690 (1992)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>pauA</i>	15596214	NP_249708.1	<i>Pseudomonas mendocina</i>
<i>bioW</i>	50812281	NP_390902.2	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>bioW</i>	115012	P22822.1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>

- 10 Otras CoA-ligasas incluyen la dicarboxilato-CoA ligasa de ratas para la cual no se ha caracterizado todavía la secuencia (Vamecq et ál., Biochem J 230:683-693 (1985)), cualquiera de las dos fenilacetato-CoA ligasas caracterizadas de *P. chrysogenum* (Lamas et ál., Maceiras, J 395:147-155 (2006); y Wang et ál., Biophys. Res. Commun. 360:453-458 (2007)) y la fenilacetato-CoA ligasa de *Pseudomonas putida* (Martinez-Blanco et ál., J Biol. Chem. 265:7084-7090 (1990)). Las acetoacetil-CoA sintetasas de *Mus musculus* (Hasegawa et ál., Biochim. Biophys. Acta 1779:414-419 (2008)) y *Homo sapiens* (Ohgami et ál., Biochem. Pharmacol. 65:989-994 (2003))
- 15 catalizan de manera natural la conversión dependiente de ATP del acetoacetato en acetoacetil-CoA.

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>phl</i>	77019264	CAJ15517.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>phlB</i>	152002983	ABS19624.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>paaF</i>	22711873	AAC24333.2	<i>Pseudomonas putida</i>
AACS	21313520	NP_084486.1	<i>Mus musculus</i>
AACS	31982927	NP_076417.2	<i>Homo sapiens</i>

Ejemplo XXVII

Vías adicionales para la producción de hexametilendiamina a partir de 6-aminocaproato

- 20 La Figura 24 proporciona vías adicionales para la producción de HMDA y amplía lo de la Figura 13 y el Ejemplo XX anterior. Las flechas para las Etapas O y P indican la conversión directa de 6-aminocaproato y 6-acetamidohexanoato en semialdehído 6-aminocaproico y 6-acetamidohexanal, respectivamente. Estas reacciones son catalizadas por una reductasa en la clase EC 1.2.1.e. Para una descripción de candidatos enzimáticos, véase el Ejemplo XXVI (EC 1.2.1.e).

Ejemplo XXVIII

- 25 Vías para la producción de 6-aminocaproato a partir de adipato

La Figura 25 proporciona vías adicionales para la producción de 6-ACA y amplía lo de la Figura 10 y el Ejemplo XVI

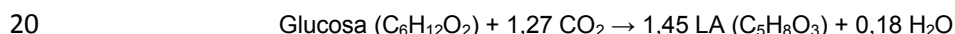
anterior. La conversión de adipato en adipato semialdehído (Figura 25, Etapa X) es catalizada por una enzima con funcionalidad de adipato reductasa. La adipato cinasa cataliza la formación de adipilfosfato a partir de adipato (Figura 25, Etapa Y). Se forma adipato semialdehído a partir de adipilfosfato mediante adipilfosfato reductasa (Figura 25, Etapa Z). Los candidatos enzimáticos para catalizar estas transformaciones se describen en el Ejemplo XXVI.

5 Ejemplo XXIX

Vía para la producción de ácido levulínico

El ácido levulínico (LA), también conocido como «ácido 4-oxopentanoico» y «ácido 4-cetovalérico», es un precursor de los polímeros tipo nailon, cauchos sintéticos y plásticos. También es un precursor de otros productos químicos de consumo básico tales como metiltetrahidrofurano, valerolactona y etil levulinato. Otras posibles aplicaciones incluyen el uso como un extensor de combustible y un herbicida/pesticida biodegradable. Tradicionalmente se prepara mediante el tratamiento de biomasa celulósica con ácidos fuertes tales como ácidos clorhídricos y sulfúricos. Este proceso tiene las desventajas de un menor rendimiento de LA y numerosos subproductos. Más recientemente, se desarrolló el proceso Biofine que convierte biomasa celulósica en LA, ácido fórmico y furfural con un rendimiento del 70 % del máximo teórico (Hayes et ál., «The biofine process-production of levulinic acid, furfural and formic acid from lignocellulosic feedstock» p. 139-164. En *Biorefineries: Industrial Processes and Products*. Wiley, Weinheim, Alemania (2006)). En la presente memoria, se describe un proceso para producir de manera selectiva LA a partir de materias primas de sintegas o azúcar mediante el uso de un organismo microbiano.

El rendimiento teórico máximo de LA a partir de glucosa es de 1,45 moles de LA por mol de glucosa utilizado (0,938 g/g), según la siguiente ecuación:



Se produce LA a partir de los metabolitos centrales succinil-CoA y acetil-CoA en tres etapas enzimáticas. En la primera etapa, se condensa acetil-CoA y succinil-CoA mediante una beta-cetotiolasa para formar 3-oxoadipil-CoA (Etapa A de la Figura 25). Posteriormente, el resto de CoA se remueve mediante una CoA hidrolasa, transferasa o ligasa (Etapas E/F/G de la Figura 25). En la etapa final de la vía, se descarboxila 3-oxoadipato para formar LA (Etapa AA de la Figura 25).

La descarboxilación de 3-oxoadipato para formar LA puede producirse de manera enzimática o espontánea. En la *E. coli*, se ha demostrado que varios 3-oxoácidos producidos durante la biosíntesis de aminoácidos experimentan una descarboxilación espontánea (Boylan et ál., *Biochem. Biophys. Res Commun.* 85:190-197 (1978)). No se ha demostrado que una enzima catalice la descarboxilación de 3-oxoadipato para formar LA hasta donde se sabe. Un ejemplo de candidato enzimático que cataliza una reacción similar es la acetoacetato descarboxilasa (EC 4.1.1.4). La acetoacetato descarboxilasa de *Clostridium acetobutylicum*, codificada por el *adc*, tiene una amplia especificidad de sustratos y se ha demostrado que descarboxila 3-oxopentanoato, ácido 2-oxo-3-fenilpropiónico y 2-metil-3-oxobutirato (Benner et ál., *J. Am. Chem. Soc.* 103:993-994 (1981) y Rozzel et ál., *J. Am. Chem. Soc.* 106:4937-4941 (1984)). También se ha caracterizado una acetoacetato descarboxilasa en la *Clostridium beijerinckii* (Ravagnani et ál., *Mol. Microbiol.* 37:1172-1185 (2000)). La acetoacetato descarboxilasa de *Bacillus polymyxa*, caracterizada en extractos sin células, también tiene una amplia especificidad de sustratos con respecto a 3-ceto ácidos y puede descarboxilar el 3-oxopentanoato (Matiasek et ál., *Curr. Microbiol.* 42:276-281 (2001)). El gen que codifica esta enzima no se ha identificado hasta ahora y la secuencia genómica de *B. polymyxa* todavía no se encuentra disponible. Otro *adc* se encuentra en la *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kosaka, et ál., *Biosci. Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007)).

Nombre del gen	N.º GI	N.º de acceso en GenBank	Organismo
<i>adc</i>	15004868	NP_149328.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>adc</i>	31075386	AAP42566.1	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>cbei_3835</i>	150018652	YP_001310906.1	<i>Clostridium beijerinckii</i>

Ejemplo XXX

Estrategias de inactivación *in silico* para la producción de adipato, 6-ACA y HMDA

Este ejemplo describe estrategias de alteración genética para la producción de adipato, ácido 6-aminocaproico (6-ACA) y hexametildiamina (HMDA).

Más adelante, se describirán en mayor detalle conjuntos de actividades enzimáticas que pueden reducirse mediante

alteraciones o eliminaciones adecuadas de genes en un hospedador de producción modificado genéticamente para contener las vías de producción de adipato, ácido 6-aminocaproico (6-ACA) y hexametilendiamina (HMDA), por ejemplo, vías que usen succinil CoA y acetil CoA como precursores.

El OptKnock es un marco informático de dos niveles formulado con el objetivo general de desarrollar microorganismos de sobreproducción con estabilidad genética. Específicamente, el marco examina la red completa de un microorganismo con el fin de proponer manipulaciones genéticas que fueren al bioquímico deseado a volverse un subproducto obligatorio del desarrollo celular. Al acoplar la producción bioquímica al desarrollo celular a través de alteraciones o eliminaciones de genes en ubicaciones estratégicas, las presiones de selección de desarrollo impuestas a las cepas modificadas genéticamente después de largos períodos de tiempo en un biorreactor conducen a mejoras en el rendimiento como resultado de la producción bioquímica acoplada al desarrollo obligatoria. Por último, en el caso de una eliminación de genes, hay una cantidad insignificante de que las cepas diseñadas vuelvan a sus estados de tipo salvaje dado que los genes seleccionados mediante OptKnock se remueven por completo del genoma.

La producción bioquímica acoplada al desarrollo puede visualizarse en el contexto de las envolturas de producción bioquímica de una red metabólica típica que se calcula mediante el uso de un modelo *in silico*. Estos límites se obtienen mediante la fijación de la o las tasas de absorción del o de los sustratos de limitación en su o sus valores medidos a nivel experimental y el cálculo de las tasas máximas y mínimas de producción bioquímica en cada nivel alcanzable de desarrollo. Si bien existen excepciones, normalmente la producción de un bioquímico deseado se encuentra en competencia directa con la formación de biomasa para obtener recursos intracelulares. Por lo tanto, las tasas mejoradas de producción bioquímica producirán generalmente tasas de desarrollo menores que el nivel máximo. Las inactivaciones propuestas por OptKnock están diseñadas para restringir los límites de solución permitibles, forzando un cambio en el comportamiento metabólico de la cepa de tipo salvaje. Si bien los límites de solución efectivos para una cepa determinada se expandirán o contraerán en la medida en que la o las tasas de absorción aumenten o disminuyan, cada punto experimental debería encontrarse dentro de su límite de solución calculado. Las gráficas como estas permiten visualizar qué tan cerca se encuentran las cepas de sus límites de rendimiento o, en otras palabras, qué tanto lugar hay para mejoras. Se ha usado el marco OptKnock para identificar estrategias de eliminación de genes auspiciosas para la sobreproducción de bioquímicos y establece un marco sistemático que abarca naturalmente mejoras futuras en los marcos de modelado metabólico y de regulación.

Más adelante, se describirán conjuntos de actividades enzimáticas que deberían ausentarse, atenuarse o eliminarse para crear organismos hospedadores que puedan lograr una producción de adipato, 6-ACA o HMDA acoplada al desarrollo a partir de la adición de la vía biosintética que proceda a través de succinil-CoA y acetil-CoA. Para enumerar todas las posibles estrategias, se ha implementado una técnica de optimización, denominada «cortes de enteros», que implica resolver de manera iterativa el problema de OptKnock con la incorporación de una limitación adicional denominada «corte de enteros» en cada iteración.

Se usó el algoritmo de OptKnock para identificar diseños en función de un modelo estequiométrico del metabolismo de la *Escherichia coli*. Los supuestos incluyen (i) una tasa de absorción de glucosa de 10 mmol/gdw/h; (ii) condiciones anaerobias o microaerobias; y (iii) un requisito de mantenimiento mínimo no asociado al desarrollo de 4 mmol/gdw/h. La Tabla 12 proporciona una lista de todas las estequiometría de reacción y los genes asociados que se sabe que están asociados a las reacciones identificadas para la eliminación en las estrategias. La Tabla 13 proporciona una lista de las abreviaciones de los metabolitos, los nombres y las ubicaciones correspondientes de todos los metabolitos que participan de las reacciones enumeradas en la Tabla 12. Los diseños de producciones acopladas al desarrollo para el ácido adipico, el 6ACA y la HMDA se proporcionan en las Tablas 14-16. Las tasas de formación de productos que se muestran en las Tablas 14-16 se expresan en mmol/gDCW·h. La tasa de absorción de glucosa básica es de 10 mmol/gDCW h y la tasa de formación de biomasa se muestra en unidades de 1/h. Estas tablas enumeran las reacciones que se inactivan en una estrategia particular, el producto anticipado y rendimientos de biomasa. Si bien se identificaron los diseños mediante el uso de un modelo metabólico del metabolismo de la *E. coli*, y los nombres de los genes enumerados son específicos de la *E. coli*, el método de selección de las estrategias de modificación genética metabólica y también los propios diseños son aplicables a cualquier organismo productor de HMDA, 6-ACA o adipato. Por lo tanto, los diseños son esencialmente listas de transformaciones enzimáticas cuya actividad se ha de eliminar, atenuar o inicialmente ausentar de un microorganismo para proporcionar la producción acoplada al desarrollo de adipato, 6ACA y HMDA.

El criterio fundamental para priorizar la selección final de diseños fue el rendimiento acoplado al desarrollo de cada uno de los productos. Para examinar esto, se construyeron conos de producción para cada estrategia mediante, en primer lugar, la maximización y posterior minimización de los rendimientos del producto con diferentes tasas de formación de biomasa, como se describió anteriormente. Si el límite más a la derecha de todos los fenotipos posibles de la red mutante es un solo punto, esto implica que hay un rendimiento óptimo particular del producto con la tasa de formación de biomasa máxima posible en la red. En otros casos, el límite más a la derecha de los fenotipos viables es una línea vertical, lo cual indica que, en el punto del máximo de biomasa, la red puede generar cualquier cantidad del producto en el intervalo calculado, lo cual incluye la menor cantidad en el punto más inferior de la línea vertical. Se asignó una menor prioridad a esos diseños.

Las estrategias de modificación genética metabólica que se describirán más adelante presupondrán que el

organismo puede producir adipato, 6-ACA o HMDA a través de la vía que utiliza succinil CoA y acetil-CoA. En la presente memoria, se describe la construcción de un organismo hospedador recombinante capaz de producir estos productos a través de la vía.

Construcción de la cepa: Con el fin de validar las predicciones informáticas propuestas en este informe, las cepas se construyen, evolucionan y evalúan. La *Escherichia coli* K-12 MG1655 que alberga la vía de succinil-CoA-acetil-CoA sirve como la cepa en la que se introducen las eliminaciones. Las cepas se construyen mediante la incorporación de eliminaciones en marco mediante el uso de recombinación homóloga a través del sistema de recombinasa λ Red de Datsenko y Wanner (Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 97(12):6640-6645 2000)). La estrategia implica remplazar una secuencia cromosómica, es decir, el gen seleccionado para la remoción, con un gen de resistencia a antibióticos seleccionable, que posteriormente también se remueve. Las inactivaciones se integran una por una en la cepa receptora. No permanece ningún marcador de resistencia a antibióticos después de cada eliminación, lo cual permite la acumulación de múltiples mutaciones en cada cepa objetivo. La tecnología de eliminación remueve por completo el gen seleccionado para la remoción, de manera de reducir sustancialmente la posibilidad de que los mutantes construido vuelvan al tipo salvaje.

Caracterización con matraces de agitación: A medida que se construyen cepas intermedias, se cuantifica el rendimiento de las cepas mediante la realización de fermentaciones en matraces de agitación. Se obtienen condiciones anaerobias mediante el sellado de los matraces con un tabique de caucho y el posterior rociado del medio con nitrógeno. Para las cepas en las que no se observa desarrollo en condiciones anaerobias estrictas, se pueden aplicar condiciones microaerobias al cubrir el matraz con una lámina de aluminio y la perforación de un pequeño orificio para una ventilación limitada. Todos los experimentos se realizaron mediante el uso de un medio mínimo M9 complementado con glucosa, a menos que se indique de otro modo. Durante la noche se desarrollan precultivos y se usan como inóculo para un cultivo por lotes recién preparado para el que se realizan mediciones durante el desarrollo exponencial. La tasa de desarrollo se determina mediante la medición de la densidad óptica mediante el uso de un espectrofotómetro (600 nm), y la tasa de absorción de glucosa mediante la supervisión de la eliminación de fuentes de carbono con el transcurso del tiempo. Los productos, el etanol y los ácidos orgánicos se analizan mediante GC-MS o HPLC mediante el uso de procedimientos de rutina. Se desarrollan cultivos en triplicado para cada cepa.

Evaluación con fermentador por lotes: El rendimiento de cepas seleccionadas se evalúa en fermentaciones por lotes con control de pH y en condiciones anaerobias. Esto permite una cuantificación segura del desarrollo, la absorción de glucosa y las tasas de formación de todos los productos, así como garantizar que la acumulación de productos de fermentación ácidos no limite el desarrollo celular. Además, esto permite la determinación precisa de la productividad volumétrica y del rendimiento de formación de productos, dos de los parámetros más importantes en la caracterización del rendimiento de cepas. Se llevan a cabo fermentaciones en biorreactores de 1 L con un volumen de trabajo de 600 mL, equipados con control de temperatura y pH. El reactor se rocía de manera continua con N_2 a aproximadamente 0,5 L/min para garantizar que los niveles de oxígeno disuelto (DO, por sus siglas en inglés) permanezcan por debajo de los niveles de detección. El medio de cultivo es igual que como se describió anteriormente, con la excepción de que se aumenta la concentración de glucosa de acuerdo con la densidad celular más alta que se puede lograr en un recipiente de fermentación.

Evaluación con quimiostato: Se llevan a cabo experimentos con quimiostato para obtener una medición directa de cómo afecta al rendimiento del producto y la productividad volumétrica el cambio en el modo de fermentación de lotes a modo continuo. Los biorreactores descritos anteriormente mediante el uso del modo por lotes funcionan en modo de quimiostato a través del suministro continuo de medio y la remoción de cultivo agotado. La tasa de flujo de entrada se fija para mantener una tasa de dilución constante del 80 % de la tasa de desarrollo máxima observada para cada cepa en el lote, y se controla el flujo de salida para mantener el nivel. La glucosa es el nutriente limitante en el medio y se fija para lograr la densidad óptica deseada en el recipiente.

Evolución adaptativa: Se espera que inicialmente las cepas inactivadas presenten tasas de desarrollo menores que las óptimas hasta que sus redes metabólicas se hayan ajustado a sus funcionalidades faltantes. Para permitir este ajuste, las cepas evolucionan de manera adaptativa. Al someter las cepas a la evolución adaptativa, la tasa de desarrollo celular se vuelve la presión de selección primaria y se obliga a que las células mutantes reubiquen sus flujos metabólicos con el fin de mejorar sus tasas de desarrollo. Esta reprogramación del metabolismo se ha demostrado recientemente para varias mutaciones de *E. coli* que han evolucionado de manera adaptativa en varios sustratos para alcanzar las tasas de desarrollo previstas *a priori* por un modelo *in silico* (Fong y Palsson, Nat. Genet. 36(10):1056-1058 (2004)). Las cepas generadas mediante OptKnock evolucionan de manera adaptativa en triplicado (en paralelo) debido a diferencias en los patrones evolucionarios presenciados anteriormente en la *E. coli* (Fong y Palsson, Nat. Genet. 36(10):1056-1058 (2004); Fong et al., J. Bacteriol. 185(21):6400-6408 (2003); Ibarra et al., Nature 420(6912): 186-189 (2002)) que podrían llegar a producir una cepa con calidades de producción superiores a las de las demás. Se realizan evoluciones durante un período de 2-6 semanas, dependiendo de la tasa de desarrollo mejorada alcanzada. Por lo general, las evoluciones se detienen una vez que se obtiene un fenotipo estable. El concepto de producción de bioquímicos acoplada al desarrollo detrás de la estrategia de OptKnock produce la generación de sobreproductores con estabilidad genética.

Si bien se describieron anteriormente como «conjuntos de eliminación», se comprende que, como se describe en la

5

presente memoria, los conjuntos de genes pueden eliminarse o alterarse de forma tal que se reduzcan o eliminen las actividades de los productos génicos que se codifican. Por lo tanto, los conjuntos de eliminación de genes de las Tablas 14-16 pueden usarse para eliminar o alterar un conjunto de genes en un organismo hospedador en el que se desea un aumento en la producción de 6-ACA, adipato y/o HMDA. Se comprende que cualquiera de los conjuntos de eliminación de genes que se describen puede usarse para generar cepas inactivadas con genes alterados o eliminados que confieran un aumento en la producción de 6-ACA, adipato y/o HMDA.

Tabla 12: Una lista de todas las estequiometrías de reacción y los genes asociados que se sabe que están asociados a las reacciones identificadas para la eliminación en las estrategias enumeradas en las Tablas 1 y 2.

Abreviación de la reacción	Nombre de la reacción	Estequiometría de la reacción	Genes asociados
ACKr	Acetato cinasa	$[c] : ac + atp \rightleftharpoons actp + adp$	(b3115 o b2296 o b1849)
ADHEr	Alcohol deshidrogenasa	$[c] : accoa + (2) h + (2) nadh \rightleftharpoons coa + etoh + (2) nad$	(b0356 o b1478 o b1241)
AKGD	Alfa-cetoglutarato deshidrogenasa	$[c] : akc + coa + nad \rightarrow co2 + nadh + succoa$	(b0116 y b0726 y b0727)
ALAR	Alanina racemasa	$[c] : ala-L \rightleftharpoons ala-D$	b4053
ASNS2	Asparagina sintetasa	$[c] : asp-L + atp + nh4 \rightarrow amp + asn-L + h + ppi$	b3744
ASPT	L-aspartasa	$[c] : asp-L \rightarrow fum + nh4$	b4139
ATPS4r	ATP sintasa	$adp[c] + (4) h[p] + pi[c] \rightleftharpoons atp[c] + (3) h[c] + h2o[c]$	((b3736 y b3737 y b3738) y (b3731 y b3732 y b3733 y b3734 y b3735)) o ((b3736 y b3737 y b3738) y (b3731 y b3732 y b3733 y b3734 y b3735) y b3739))
CBMK2	Carbamato cinasa	$[c] : atp + co2 + nh4 \rightarrow adp + cbp + (2) h$	(b0521 o b0323 o b2874)
DAAD	D-aminoácido deshidrogenasa	$[c] : ala-D + fad + h2o \rightarrow fadh2 + nh4 + pyr$	b1189
EDA	2-deshidro-3-desoxi fosfogluconato aldolasa	$[c] : 2ddg6p \rightarrow g3p + pyr$	b1850
ENO	Enolasa	$[c] : 2pg \rightleftharpoons h2o + pep$	b2779
FBA	Fructosa-bis-fosfato aldolasa	$[c] : fdp \rightleftharpoons dhap + g3p$	(b2097 o b2925 o b1773)
FRD	Fumarato reductasa	$[c] : fum + mq18 \rightarrow mqn8 + succ$	(b4151 y b4152 y b4153 y b4154)
FUM	Fumarasa	$[c] : fum + h2o \rightleftharpoons mal-L$	(b1612 o b4122 o b1611)
G5SD	Glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa	$[c] : glu5p + h + nadph \rightarrow glu5sa + nadp + pi$	b0243

Abreviación de la reacción	Nombre de la reacción	Estequiometría de la reacción	Genes asociados
G6PDHy	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	[c] : g6p + nadp <==> 6pg1 + h + nadph	b1852
GLCpts	Transporte de D-glucosa a través del mecanismo de PTS	glc-D[e] + pep[c] --> g6p[c] + pyr[c]	((b2417 y b1101 y 62415 y b2416) o (b1817 y b1818 y b1819 y b2415 y b2416) o (b2417 y b1621 y b2415 y b2416))
GLU5K	Glutamato-5-cinasa	[c] : atp + glu-L --> adp + glu5p	b0242
GLUDy	Glutamato deshidrogenasa	[c] : glu-L + h2o + nadp <==> akgl + h + nadph + nh4	b1761
HEX1	Hexocinasa	[c] : atp + glc-D --> adp + g6p + h	b2388
LDH_D	Lactato deshidrogenasa	[c]: lac-D + nad <==> h + nadh + pyr	b1380 o b2133
MDH	Malato deshidrogenasa	[c] : mal-L + nad <==> h + nadh + oaa	b3236
ME1x	Enzima málica (NAD)	[c] : mal-L + nad --> co2 + nadh + pyr	b1479
ME2	Enzima málica (NADP)	[c] : mal-L + nadp --> co2 + : nadph + pyr	b2463
NADH12	NADH deshidrogenasa (ubiquinona-8)	[c]: h + nadh + ubq8 --> nad + ubq8h2	b1109
NADH6	NADH deshidrogenasa (ubiquinona-8 y 3,5 protones)	(4.5) h[c] + nadh[c] + ubq8[c]-> (3.5) h[e] + nad[c] + ubq8h2[c]	(b2276 y b2277 y b2278 y b2279 y b2280 y b2281 y b2282 y b2283 y b2284 y b2285 y b2286 y b2287 y b2288)
PDH	Piruvato deshidrogenasa	[c] : coa + nad + pyr --> accoa + co2 + nadh	((b0114 y b0115 y b0116) o (b0116 y b0726 y b0727) o (b0116 y b2903 y b2904 y b2905))
PFK	Fosfofructocinasa	[c] : atp + f6p --> adp + fdp + h	(b3916 o b1723)
PFLi	Piruvato formiato liasa	[c] : coa + pyr --> accoa + for	((b0902 y b0903) y b2579) o (b0902 y b0903) o (b0902 y b3114) o (b3951 y b3952))
PGDH	Fosfogluconato deshidrogenasa	[c] : 6pgc + nadp --> co2 + nadph + ru5p-D	b2029
PGDHY	Fosfogluconato deshidratasa	[c] : 6pgc --> 2ddg6p + h2o	b1851

Abreviación de la reacción	Nombre de la reacción	Estequiometría de la reacción	Genes asociados
PGI	Glucosa-6-fosfato isomerasa	[c] : g6p <==> f6p	b4025
PGL	Fosfogluconolactonasa	[c] : 6pg1 + h2o --> 6pgc + h	b0767
PGM	Fosfoglicerato mutasa	[c] : 3pg <==> 2pg	b3612
PPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa	[c]: co2 + h2o + pep --> h + oaa + pi	b3956
PPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinasa	[c] : atp + oaa --> adp + co2 + pep	b3403
PROIz	Prolina oxidasa	[c] : fad + pro-L --> lpyr5c + fadh2 + h	b1014
PTAr	Fosfotransacetilasa	[c] : accoa + pi <==> actp + coa	b2297
PYK	Piruvato cinasa	[c] : adp + h + pep --> atp + pyr	(b1854 o b1676)
RPE	Ribulosa-5-fosfato-5-epimerasa	[c]: ru5p-D <==> xu5p-D	(b4301 o b3386)
SUCD4	Succinato deshidrogenasa	[c] : fadh2 + ubq8 <==> fad + ubq8h2	(b0721 y b0722 y b0723 y b0724
SUCOAS	Succinil-CoA sintetasa	[c] : atp + coa + succ <==> adp + pi + succoa	(b0728 y b0729)
TAL	Transaldolasa	[c]: g3p + s7p <==> e4p + f6p	(b2464 o b0008)
THD2	NADP transhidrogenasa	(2) h[e] + nadh[c] + nadp[c] --> (2) h[c] + nad[c] + nadph[c]	(b1602 y b1603)
THD5	NAD transhidrogenasa	[c] : nad + nadph --> nadh +	(b3962 o (b1602 y b1603))
TKT1	Transcetolasa	[c] : r5p + xu5p-D <==> g3p + s7p	(b2935 o b2465)
TKT2	Transcetolasa	[c] : e4p + xu5p-D <==> f6p + g3p	(b2935 o b2465)
TPI	Triosefosfato isomerasa	[c] : dhap <==> g3p	b3919
VALTA	Valina transaminasa	[c] : akg + val-L <==> 3mob + glu-L	b3770

Tabla 13: Lista de las abreviaciones de los metabolitos, los nombres y las ubicaciones correspondientes de todos los metabolitos que participan de las reacciones enumeradas en la Tabla 12.

Abreviación del metabolito	Compartimento	Nombre del metabolito
13dpg	Citosol	3-fosfo-D-glicroil fosfato
1pyr5c	Citosol	1-pirrolin-5-carboxilato
2ddg6p	Citosol	2-deshidro-3-desoxi-D-gluconato-6-fosfato
2pg	Citosol	D-glicerato 2-fosfato
3mob	Citosol	3-metil-2-oxobutanoato
3pg	Citosol	3-fosfo-D-glicerato
6pgc	Citosol	6-fosfo-D-gluconato
6pgl	Citosol	6-fosfo-D-glucono-1,5-lactona
ac	Citosol	Acetato
accoa	Citosol	Acetil-CoA
actp	Citosol	Acetil fosfato
adp	Citosol	Adenosina difosfato
akg	Citosol	2-oxoglutarato
ala-D	Citosol	D-alanina
ala-L	Citosol	L-alanina
amp	Citosol	Adenosina monofosfato
asn-L	Citosol	L-asparagina
asp-L	Citosol	L-aspartato
atp	Citosol	Adenosina trifosfato
cbp	Citosol	Carbamoil fosfato
co2	Citosol	Dióxido de carbono
coa	Citosol	Coenzima A dihidroxiacetona
dhap	Citosol	Dihidroxiacetona fosfato
e4p	Citosol	D-eritrosa 4-fosfato
etoh	Citosol	Etanol

Abreviación del metabolito	Compartimento	Nombre del metabolito
f6p	Citosol	D-fructosa 6-fosfato
fad	Citosol	Flavina adenina dinucleótido
fadh2	Citosol	Flavina adenina dinucleótido-con reducción
fdp	Citosol	D-fructosa 1,6-bisfosfato
for	Citosol	Formiato
fum	Citosol	Fumarato
g3p	Citosol	Gliceraldehído 3-fosfato
g6p	Citosol	D-glucosa 6-fosfato
glc-D[e]	Extraorganismo	D-glucosa
glu5p	Citosol	L-glutamato 5-fosfato
glu5sa	Citosol	L-glutamato 5-semialdehído
glu-L	Citosol	L-glutamato
h	Citosol	H ⁺
h[e]	Extraorganismo	H ⁺
h2o	Citosol	Agua
lac-D	Citosol	D-lactato
mal-L	Citosol	L-malato
mql-8	Citosol	Menaquinol-8
mqn-8	Citosol	Menaquinona-8
nad	Citosol	Nicotinamida adenina dinucleótido
nadh	Citosol	Nicotinamida adenina dinucleótido - con reducción
nadp	Citosol	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida-adenina
nadph	Citosol	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato - con reducción
nh4	Citosol	Amonio
o2	Citosol	Oxígeno
oaa	Citosol	Oxaloacetato

Abreviación del metabolito	Compartimento	Nombre del metabolito
pep	Citosol	Fosfoenolpiruvato
pi	Citosol	Fosfato
ppi	Citosol	Difosfato
pyr	Citosol	Piruvato
r5p	Citosol	alfa-D-ribosa 5-fosfato
ru5p-D	Citosol	D-ribulosa 5-fosfato
s7p	Citosol	Sedoheptulosa 7-fosfato
succ	Citosol	Succinato
succoa	Citosol	Succinil-CoA
ubq8	Citosol	Ubiquinona-8
ubq8h2	Citosol	Ubiquinol-8
val-L	Citosol	L-valina
xu5p-D	Citosol	D-xilulosa 5-fosfato

Tabla 14. Diseños de cepas con inactivación para el aumento de la producción de 6-ACA, mostrando los rendimientos de 6-ACA y biomasa.

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
1	1	1,72604	0,38773	ATPS4r
2	1	0,83466	0,26712	PGI
3	2	5,04234	0,22255	IIEX1,PGI
4	2	4,11897	0,24338	EDA y/o PGDHY,PGI
5	2	3,26272	0,35236	ADHEr,NADH6
6	2	2,8403	0,28275	ADHEr,PPCK
7	2	2,05537	0,33531	GLCpts,NADH6
8	2	2,0373	0,38161	ATPS4r,RPE
9	2	1,89007	0,3845	ATPS4r,TAL

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
10	2	1,49147	0,26024	PFLi,PGI
11	2	1,11406	0,32382	NADH6,PFLi
12	2	0,95551	0,27773	PFLi,PPCK
13	2	0,89333	0,37885	ADHEr,FUM
14	2	0,41621	0,38953	ADHEr,HEX1
15	2	0,31773	0,36065	ASPT,FUM
16	3	6,93034	0,18126	EDA y/o PGDHY,NADHG,PGI
17	3	6,91845	0,19552	HEX1,PFLi,PGI
18	3	6,14899	0,1758	EDA y/o PGDHY,PFLi,PGI
19	3	5,81422	0,16481	ATPS4r,EDA y/o PGDHY,PGI
20	3	5,71646	0,21908	ADHEr,HEX1,PGI
21	3	4,83364	0,29669	ADHEr,NADH6,PFLi
22	3	4,23803	0,24209	ACKr y/o PTAr,EDA y/o PGDHY,PGI
23	3	4,02855	0,29483	ADHEr,MDH,THD2 y/o GLUDy
24	3	3,77533	0,25553	ADHEr,ASPT,MDH
25	3	3,65248	0,19372	ADHEr,NADH6,PGI
26	3	3,47283	0,25194	ADHEr,NADH6,PPCK
27	3	3,39319	0,29001	ADHEr,MDH,NADH6
28	3	3,35305	0,34906	ADHEr,NADH6,RPE
29	3	3,23462	0,28717	ACKr y/o PTAr,ATPS4r,SUCOAS
30	3	3,0877	0,16431	ADHEr,PGI,PPCK
31	3	2,90019	0,24841	ADHEr,GLCpts,PPCK
32	3	2,89855	0,2815	ADHEr,PPCK,RPE
33	3	2,88617	0,25645	ADHEr,FUM,THD2 y/o GLUDy
34	3	2,72186	0,35068	ADHEr,FUM,HEX1

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
35	3	2,60615	0,3202	ATPS4r,HEX1,PFLi
36	3	2,54001	0,22798	PFLi,PGDH,PGI
37	3	2,5259	0,22921	PFLi,PGI,TAL
38	3	2,5129	0,23034	PFLi,PGI,RPE
39	3	2,50442	0,16853	ATPS4r,PFLi,PGI
40	3	2,38919	0,18418	GLCpts,NADH6,PGI
41	3	2,30741	0,33343	ATPS4r,GLCpts,NADH6
42	3	2,16995	0,33092	GLCpts,NADH6,RPE
43	3	2,11568	0,333	GLCpts,NADH6,TAL
44	3	2,10576	0,25488	ATPS4r,PPCK,PYK
45	3	1,5933	0,25891	FUM,PFLi,PGI
46	3	1,25154	0,3194	NADH6,PFLi,RPE
47	3	1,23093	0,32359	ACKr y/o PTAr,NADH6,PFLi
48	3	1,18643	0,32149	NADH6,PFLi,TAL
49	3	1,08143	0,27599	PFLi,PPCK,RPE
50	3	1,0527	0,27673	ACKr y/o PTAr,PFLi,PPCK
51	3	1,03356	0,34314	FUM,HEX1,PFLi
52	3	1,02156	0,27682	PFLi,PPCK,TAL
53	3	0,8538	0,24817	MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
54	3	0,5753	0,38695	ADHEr,HEX1,RPE
55	3	0,49968	0,38818	ADHEr,HEX1,TAL
56	3	0,31402	0,35643	FDII2,FUM,NADII6
57	3	0,23944	0,28074	FUM,PFLi,THD2 y/o GLUDy
58	3	0,23418	0,26581	ASPT,MDH,PFLi
59	3	0,20901	0,23724	ASPT,MDH,PYK

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
60	4	7,08404	0,12641	EDA y/o PGDHY,NADH6,PFLi,PGI
61	4	7,0245	0,10838	EDA y/o PGDHY,PFLi,PGI,PPCK
62	4	6,92332	0,16482	ADHEr,HEX1,NADH6,PGI
63	4	6,89839	0,18171	ACKr y/o PTAr,ADHEr,NADH6,PGI
64	4	6,58534	0,16513	EDA y/o PGDHY,GLCpts,PFLi,PGI
65	4	6,36357	0,11937	EDA y/o PGDHY,PFLi,PGI,THD2 y/o GLUDy
66	4	6,22082	0,11375	ATPS4r,EDA y/o PGDHY,PFLi,PGI
67	4	5,8701	0,13379	ADIIEr,EDA y/o PGDIY,PGI,PPCK
68	4	5,85757	0,23874	ADHEr,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
69	4	5,85411	0,19685	ADHEr,HEX1,PGI,PPS
70	4	5,67774	0,13549	EDA y/o PGDHY,PGI,PPCK,PYK
71	4	5,46506	0,26673	EDA y/o PGDHY,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
72	4	5,40131	0,26362	ADHEr,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
73	4	5,08219	0,13778	ATPS4r,NADH6,PFLi,PGI
74	4	4,88764	0,27849	ADHEr,NADH12,NADH6,PFLi
75	4	4,88489	0,27942	ADHEr,FUM,NADH6,PFLi
76	4	4,81778	0,26037	ADHEr,ATPS4r,MDH,NADH6
77	4	4,73419	0,21859	ADHEr,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
78	4	4,63783	0,29595	ADHEr,ATPS4r,FDH2,NADH6
79	4	4,51525	0,21818	ADHEr,FUM,PPCK,THD2 y/o GLUDy
80	4	4,51525	0,21818	ADHEr,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
81	4	4,30547	0,19131	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PGI
82	4	4,2733	0,23078	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PPCK
83	4	4,16417	0,18771	ATPS4r,NADH6,PGI,RPE
84	4	4,16053	0,18697	ATPS4r,NADH6,PGI,TAL

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
85	4	4,15658	0,18617	ATPS4r,NADH6,PGDH,PGI
86	4	4,12032	0,32701	ADHEr,ATPS4r,FUM,NADH6
87	4	3,9718	0,23354	ADHEr,ATPS4r,MDH,PPCK
88	4	3,9718	0,23354	ADHEr,ATPS4r,FUM,PPCK
89	4	3,8747	0,21758	ADHEr,ASPT,GLCpts,MDH
90	4	3,84814	0,25342	ADHEr,ASPT,MDH,RPE
91	4	3,83986	0,2047	ADHEr,ASPT,MDH,PYK
92	4	3,75472	0,32987	ADHEr,ATPS4r,HEX1,NADH6
93	4	3,54965	0,29114	ADHEr,ATPS4r,MDH,PGDH
94	4	3,54605	0,21695	ADHEr,GLCpts,NADH6,PPCK
95	4	3,54385	0,218	ADHEr,NADH6,PPCK,PYK
96	4	3,53615	0,25027	ADHEr,NADH6,PPCK,RPE
97	4	3,5018	0,32809	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1
98	4	3,46904	0,25375	ADHEr,GLCpts,MDH,NADH6
99	4	3,46528	0,28851	ADHEr,MDH,NADH6,RPE
100	4	3,44916	0,13425	ADHEr,PFLi,PGI,PPCK
101	4	3,44555	0,26498	ADHEr,HEX1,NADH6,THD2 y/o GLUDy
102	4	3,43776	0,29402	ADHEr,ATPS4r,MDH,TAL
103	4	3,36596	0,19156	FUM,NADH6,PGI,THD5
104	4	3,36596	0,19156	MDH,NADH6,PGI,THD5
105	4	3,33377	0,2967	ADHEr,ATPS4r,MDH,RPE
106	4	3,33152	0,33978	ADHEr,FUM,NADH6,TAL
107	4	3,32935	0,34088	ADHEr,HEX1,NADH6,TAL
108	4	3,32788	0,32122	ADHEr,FUM,HEX1,NADH6
109	4	3,31278	0,3493	ADHEr,GLU5K,NADH6,TAL

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
110	4	3,31278	0,3493	ADHEr,G5SD,NADH6,TAL
111	4	3,17484	0,10602	ADHEr,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
112	4	3,16614	0,11184	ADHEr,MDH,PGI,THD2 y/o GLUDy
113	4	3,16614	0,11184	ADHEr,FUM,PGI,THD2 y/o GLUDy
114	4	3,11125	0,24826	ADHEr,ATPS4r,PPCK,THD2 y/o GLUDy
115	4	2,96628	0,21051	ADHEr,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
116	4	2,95529	0,24477	ADHEr,PPCK,RPE,THD2 y/o GLUDy
117	4	2,95136	0,24731	ADHEr,GLCpts,PPCK,RPE
118	4	2,94249	0,25305	ADHEr,FUM,RPE,THD2 y/o GLUDy
119	4	2,93765	0,22693	ADHEr,MDH,PPCK,PYK
120	4	2,93765	0,22693	ADHEr,FUM,PPCK,PYK
121	4	2,9332	0,24406	ADHEr,PPCK,TAL,THD2 y/o GLUDy
122	4	2,90913	0,24328	ADHEr,PGDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
123	4	2,90913	0,24328	ADHEr,PGL y/o G6PDHy,PPCK,THD2 y/o GLUDy
124	4	2,90081	0,26381	ADHEr,FUM,PPCK,TAL
125	4	2,90081	0,26381	ADHEr,MDH,PPCK,TAL
126	4	2,86334	0,28161	ATPS4r,GLCpts,NADH6,PFLi
127	4	2,79498	0,34856	ADHEr,FUM,HEX1,RPE
128	4	2,7362	0,31504	ATPS4r,HEX1,PFLi,RPE
129	4	2,70922	0,18179	ATPS4r,GLCpts,NADH6,PGI
130	4	2,67469	0,31748	ATPS4r,HEX1,PFLi,TAL
131	4	2,61943	0,36027	ADHEr,HEX1,PFLi,PPS
132	4	2,60629	0,2178	PFLi,PGDH,PGI,TAL
133	4	2,60314	0,31113	ADHEr,HEX1,MDH,PFLi
134	4	2,56456	0,18551	ASPT,NADH6,PGI,THD5

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
135	4	2,55949	0,17944	ATPS4r,PFLi,PPCK,PYK
136	4	2,45433	0,3546	ADHEr,ATPS4r,HEX1,THD2 y/o GLUDy
137	4	2,45166	0,03625	GLCpts,NADH6,PPCK,PYK
138	4	2,44258	0,32891	ATPS4r,GLCpts,NADH6,RPH
139	4	2,43939	0,25153	ATPS4r,PPCK,PYK,RPE
140	4	2,37857	0,33105	ATPS4r,GLCpts,NADH6,TAL
141	4	2,30961	0,22691	ATPS4r,NADH6,PPCK,PYK
142	4	2,28135	0,25311	ATPS4r,PPCK,PYK,TAL
143	4	2,18633	0,3609	ADHEr,HEX1,PPS,THD2 y/o GLUDy
144	4	2,11347	0,31979	ADHEr,ATPS4r,HEX1,MDH
145	4	2,05497	0,19746	ASPT,ATPS4r,PGI,THD5
146	4	1,83108	0,25754	MDH,PFLi,PGI,THD2 y/o GLUDy
147	4	1,65594	0,25767	ACKr y/o PTAr,FUM,PFLi,PGI
148	4	1,36673	0,31918	ACKr y/o PTAr,NADH6,PFLi,RPE
149	4	1,30242	0,32127	ACKr y/o PTAr,NADH6,PFLi,TAL
150	4	1,28243	0,32216	ACKr y/o PTAr,GLU5K,NADH6,PFLi
151	4	1,28243	0,32216	ACKr y/o PTAr,G5SD,NADH6,PFLi
152	4	1,26654	0,34191	ACKr y/o PTAr,FUM,HEX1,PFLi
153	4	1,18926	0,34046	FUM,HEX1,PFLi,RPE
154	4	1,17756	0,275	ACKr y/o PTAr,PFLi,PPCK,RPE
155	4	1,1182	0,27583	ACKr y/o PTAr,PFLi,PPCK,TAL
156	4	1,1153	0,34173	FUM,HEX1,PFLi,TAL
157	4	0,95889	0,24471	MDH,PrLi,RPE,THD2 y/o GLUDy
158	4	0,9475	0,3633	ADHEr,FUM,PGL y/o G6PDHy,TAL
159	4	0,9475	0,3633	ADHEr,FUM,PGDH,TAL

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
160	4	0,90913	0,24635	MDH,PFLi,TAL,THD2 y/o GLUDy
161	4	0,36773	0,36076	HEX1,PFLi,PPS,THD2 y/o GLUDy
162	4	0,3476	0,2132	ADHEr,MDH,RPE,THD2 y/o GLUDy
163	4	0,32915	0,27571	FUM,PFLi,RPE,THD2 y/o GLUDy
164	5	6,98742	0,06748	ADHEr,EDA y/o PGDHY,NADH6,PGI,THD2 y/o GLUDy
165	5	6,97749	0,0848	ACKr y/o PTAr,ATPS4r,HEX1,PFLi,PGI
166	5	6,70882	0,01277	EDA y/o PGDHY,FUM,PFLi,PGI,THD2 y/o GLUDy
167	5	6,70882	0,01277	EDA y/o PGDHY,MDH,PFLi,PGI,THD2 y/o GLUDy
168	5	6,69134	0,13239	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,MDH
169	5	6,55123	0,09841	ADHEr,ASPT,MDH,PGL y/o G6PDHy,PYK
170	5	6,55123	0,09841	ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,MDH,PYK
171	5	6,3052	0,17034	ADHEr,ASPT,ATPS4r,MDH,PGL y/o G6PDHy
172	5	6,20871	0,17434	EDA y/o PGDHY,MDH,PFLi,PGI,THD5
173	5	6,12639	0,08557	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
174	5	6,03386	0,19348	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH
175	5	5,98628	0,0693	ATPS4r,EDA y/o PGDHY,PGI,PPCK,PYK
176	5	5,98165	0,07186	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,PGI,PPCK
177	5	5,93527	0,09761	ADHEr,EDA y/o PGDHY,GLCpts,PGI,PPCK
178	5	5,87444	0,0434	ADHEr,EDA y/o PGDHY,MDH,PGI,THD2 y/o GLUDy
179	5	5,87444	0,0434	ADHEr,EDA y/o PGDHY,FUM,PGI,THD2 y/o GLUDy
180	5	5,82336	0,16439	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,MDH,PYK
181	5	5,75418	0,21654	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6
182	5	5,65488	0,26204	ACKr y/o PTAr,ADHEr,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
183	5	5,59555	0,20952	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,NADH6
184	5	5,30614	0,21123	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
185	5	5,21058	0,214	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH
186	5	5,20451	0,17174	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
187	5	5,1776	0,13724	ADHEr,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
188	5	5,11744	0,13758	ADHEr,MDH,NADH6,PFLi,PGI
189	5	5,11744	0,13758	ADHEr,FUM,NADH6,PFLi,PGI
190	5	5,11714	0,20117	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
191	5	5,11714	0,20117	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK
192	5	5,10437	0,12227	ADHEr,FUM,PFLi,PGI,PPCK
193	5	5,10437	0,12227	ADHEr,MDH,PFLi,PGI,PPCK
194	5	5,09877	0,17589	ADHEr,A TPS4r,GLCpts,NADH6,PPCK
195	5	5,0606	0,22022	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
196	5	5,02693	0,21085	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PGDH,PPCK
197	5	5,02693	0,21085	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PGL y/o G6PDHy,PPCK
198	5	5,00057	0,21154	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PPCK,TAL
199	5	4,97638	0,21218	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PPCK,RPE
200	5	4,88781	0,27844	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
201	5	4,88512	0,29281	ADHEr,GLU5K,NADH6,PFLi,RPE
202	5	4,88512	0,29281	ADHEr,G5SD,NADH6,PFLi,RPE
203	5	4,885	0,29286	ADHEr,ASNS2,NADH6,PFLi,RPE
204	5	4,85776	0,29446	ADHEr,ATPS4r,FDH2,NADH6,RPE
205	5	4,83644	0,29517	ADHEr,ATPS4r,FDH2,NADH6,TAL
206	5	4,7175	0,34071	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,THD2 y/o GLUDy
207	5	4,66386	0,18074	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,PPCK
208	5	4,66386	0,18074	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,PPCK
209	5	4,63095	0,20189	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,PFLi,PPCK

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
210	5	4,49707	0,25782	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,MDH,THD2 y/o GLUDy
211	5	4,4958	0,1778	ADHEr,ASPT,MDH,NADH6,PYK
212	5	4,41977	0,25646	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,THD2 y/o GLUDy
213	5	4,29965	0,18828	ADHEr,ASPT,ATPS4r,MDH,PYK
214	5	4,29026	0,24034	ACKr y/o PTAr,EDA y/o PGDHY,GLU5K,GLYCL,PGI
215	5	4,29026	0,24034	ACKr y/o PTAr,EDA y/o PGDHY,G5SD,GLYCL,PGI
216	5	4,28287	0,11665	ACKr y/o PTAr,ATPS4r,PPCK,PYK,SUCOAS
217	5	4,24299	0,26303	ACKr y/o PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6
218	5	4,18509	0,32432	ADHEr,ATPS4r,HEX1,NADH6,PGL y/o G6PDHy
219	5	4,18509	0,32432	ADHEr,ATPS4r,HEX1,NADH6,PGDH
220	5	4,15013	0,1124	ADHEr,ASPT,MDH,PYK,THD2 y/o GLUDy
221	5	4,14582	0,32483	ADHEr,ATPS4r,HEX1,NADH6,TAL
222	5	4,1099	0,32529	ADHEr,ATPS4r,HEX1,NADH6,RPE
223	5	4,04473	0,12883	ADHEr,PFLi,PGDH,PGI,PPCK
224	5	4,03844	0,12934	ADHEr,PFLi,PGI,PPCK,TAL
225	5	4,03266	0,12981	ADHEr,PFLi,PGI,PPCK,RPE
226	5	4,02531	0,1111	ADHEr,GLCpts,PFLi,PGI,PPCK
227	5	3,95205	0,10694	ACKr y/o PTAr,ATPS4r,PGDH,PGI,SUCOAS
228	5	3,94203	0,1079	ACKr y/o PTAr,ATPS4r,PGI,SUCOAS,TAL
229	5	3,9367	0,21579	ADHEr,ASPT,GLCpts,MDH,RPE
230	5	3,93273	0,1088	ACKr y/o PTAr,ATPS4r,PGI,RPE,SUCOAS
231	5	3,88257	0,21457	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK
232	5	3,84571	0,22865	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6
233	5	3,76049	0,30843	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,PFLi
234	5	3,74674	0,21738	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PPCK

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
235	5	3,71345	0,27754	ADHEr,ATPS4r,MDH,PGDH,TAL
236	5	3,69299	0,14673	ADHEr,NADH6,PPCK,PYK,THD2 y/o GLUDy
237	5	3,64625	0,1409	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,PGI,PPCK
238	5	3,64625	0,1409	ACKr y/o PTAr,ADHEr,MDH,PGI,PPCK
239	5	3,60057	0,21551	ADHEr,GLCpts,NADH6,PPCK,RPE
240	5	3,59735	0,21725	ADHEr,NADH6,PPCK,PYK,RPE
241	5	3,59622	0,19297	ADHEr,GLCpts,MDH,NADH6,PPCK
242	5	3,59622	0,19297	ADHEr,FUM,GLCpts,NADH6,PPCK
243	5	3,59594	0,19311	ADHEr,MDH,NADH6,PPCK,PYK
244	5	3,59594	0,19311	ADHEr,FUM,NADH6,PPCK,PYK
245	5	3,59157	0,1952	ADHEr,FUM,GLCpts,NADH6,THD2 y/o GLUDy
246	5	3,57086	0,18962	ATPS4r,FUM,NADH6,PGI,THD5
247	5	3,57086	0,18962	ATPS4r,MDH,NADH6,PGI,THD5
248	5	3,55204	0,22769	ADHEr,FUM,NADH6,PPCK,TAL
249	5	3,55204	0,22769	ADHEr,MDH,NADH6,PPCK,TAL
250	5	3,53212	0,25244	ADHEr,GLCpts,MDH,NADH6,RPE
251	5	3,52326	0,22785	ADHEr,FUM,GLU5K,NADH6,PPCK
252	5	3,52326	0,22785	ADHEr,G5SD,MDH,NADH6,PPCK
253	5	3,52326	0,22785	ADHEr,GLU5K,MDH,NADH6,PPCK
254	5	3,52326	0,22785	ADHEr,FUM,G5SD,NADH6,PPCK
255	5	3,52319	0,22788	ADHEr,ASNS2,FUM,NADH6,PPCK
256	5	3,52319	0,22788	ADHEr,ASNS2,MDH,NADH6,PPCK
257	5	3,51328	0,26261	ADHEr,HEX1,NADH6,RPE,THD2 y/o GLUDy
258	5	3,40958	0,31856	ADHEr,FUM,HEX1,NADH6,RPE
259	5	3,19551	0,34972	ADHEr,ATPS4r,HEX1,PPS,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
260	5	3,04993	0,16253	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
261	5	3,04993	0,16253	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
262	5	3,02516	0,17674	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
263	5	2,95797	0,22895	ADHEr,GLCpts,MDH,PPCK,TAL
264	5	2,95797	0,22895	ADHEr,FUM,GLCpts,PPCK,TAL
265	5	2,94768	0,30664	ADHEr,ATPS4r,HEX1,MDH,PFLi
266	5	2,93267	0,03242	ATPS4r,GLCpts,NADH6,PPCK,PYK
267	5	2,93156	0,27787	ATPS4r,GLCpts,NADH6,PFLi,RPE
268	5	2,92149	0,26881	ADHEr,ATPS4r,MDH,PGL y/o G6PDHy,PPS
269	5	2,76831	0,35787	ADHEr,HEX1,PFLi,PPS,RPE
270	5	2,73201	0,30945	ADHEr,HEX1,MDH,PFLi,RPE
271	5	2,69754	0,35901	ADHEr,HEX1,PFLi,PPS,TAL
272	5	2,69256	0,22448	ATPS4r,NADH6,PPCK,PYK,RPE
273	5	2,67071	0,31025	ADHEr,HEX1,MDH,PFLi,TAL
274	5	2,63273	0,17703	ATPS4r,PFLi,PPCK,PYK,RPE
275	5	2,61965	0,35455	ADHEr,ATPS4r,HEX1,RPE,THD2 y/o GLUDy
276	5	2,5479	0,2938	ADHEr,ATPS4r,GLUDy,HEX1,THD2 y/o GLUDy
277	5	2,5408	0,35457	ADHEr,ATPS4r,HEX1,TAL,THD2 y/o GLUDy
278	5	2,51093	0,22563	ATPS4r,NADH6,PPCK,PYK,TAL
279	5	2,50239	0,09117	GLCpts,PPLi,PGI,PPCK,PYK
280	5	1,97671	0,25583	ACKr y/o PTAr,MDH,PFLi,PGI,THD2 y/o GLUDy
281	5	1,41987	0,33925	ACKr y/o PTAr,FUM,HEX1,PFLi,RPE
282	5	1,41694	0,31779	ACKr y/o PTAr,GLU5K,NADH6,PPLi,RPH
283	5	1,41694	0,31779	ACKr y/o PTAr,G5SD,NADH6,PFLi,RPE
284	5	1,35397	0,34014	ACKr y/o PTAr,FUM,GLU5K,HEX1,PFLi

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
285	5	1,35397	0,34014	ACKr y/o PTAr,FUM,G5SD,HEX1,PFLi
286	5	1,35324	0,31986	ACKr y/o PTAr,GLU5K,NADH6,PFLi,TAL
287	5	1,35324	0,31986	ACKr y/o PTAr,G5SD,NADH6,PFLi,TAL
288	5	1,34703	0,34051	ACKr y/o PTAr,FUM,HEX1,PFLi,TAL
289	5	1,16644	0,24173	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPS,THD2 y/o GLUDy
290	5	0,935	0,24579	ACKr y/o PTAr,ACS,MDH,PPLi,THD2 y/o GLUDy
291	5	0,5376	0,11141	ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLUDy,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
292	5	0,44145	0,36033	HEX1,PFLi,PPS,RPE,THD2 y/o GLUDy
293	5	0,41407	0,27855	ACKr y/o PTAr,ACS,FUM,PFLi,THD2 y/o GLUDy
294	5	0,34153	0,21403	ACKr y/o PTAr,ADHEr,MDH,TAL,THD2 y/o GLUDy
295	5	0,29506	0,27092	FUM,PFLi,PGDH,TAL,THD2 y/o GLUDy
296	5	0,29506	0,27092	FUM,PFLi,PGL y/o G6PDHy,TAL,THD2 y/o GLUDy
297	5	0,29233	0,27766	FUM,GLYCL,PFLi,TAL,THD2 y/o GLUDy
298	2	1,72604	0,38773	ADHEr,ATPS4r
299	2	0,83466	0,26712	ADHEr,PGI
300	3	4,11897	0,24338	ADHEr,EDA y/o PGDHY,PGI
301	3	2,0373	0,38161	ADHEr,ATPS4r,RPE
302	3	1,89007	0,3845	ADHEr,ATPS4r,TAL
303	3	1,49147	0,26024	ADHEr,PFLi,PGI
304	4	6,93034	0,18126	ADHEr,EDA y/o PGDHY,NADH6,PGI
305	4	6,91845	0,19552	ADHEr,HEX1,PFLi,PGI
306	4	6,14899	0,1758	ADHEr,EDA y/o PGDHY,PFLi,PGI
307	4	5,81422	0,16481	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,PGI
308	4	4,23803	0,24209	ACKr y/o PTAr,ADHEr,EDA y/o PGDHY,PGI
309	4	3,23462	0,28717	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,SUCOAS

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
310	4	2,60615	0,3202	ADHEr,ATPS4r,HEX1,PFLi
311	4	2,54001	0,22798	ADHEr,PFLi,PGDH,PGI
312	4	2,5259	0,22921	ADHEr,PFLi,PGI,TAL
313	4	2,5129	0,23034	ADHEr,PFLi,PGI,RPE
314	4	2,50442	0,16853	ADHEr,ATPS4r,PFLi,PGI
315	4	1,5933	0,25891	ADHFr,FUM,PFLi,PGI
316	5	7,08404	0,12641	ADHEr,EDA y/o PGDHY,NADH6,PFLi,PGI
317	5	7,0245	0,10838	ADHEr,EDA y/o PGDHY,PFLi,PGI,PPCK
318	5	6,58534	0,16513	ADHEr,EDA y/o PGDHY,GLCpts,PFLi,PGI
319	5	6,36357	0,11937	ADHEr,EDA y/o PGDHY,PFLi,PGI,THD2 y/o GLUDy
320	5	6,22082	0,11375	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,PFLi,PGI
321	5	5,08219	0,13778	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PFLi,PGI
322	5	2,7362	0,31504	ADHEr,ATPS4r,HEX1,PFLi,RPE
323	5	2,67469	0,31748	ADHEr,ATPS4r,HEX1,PFLi,TAL
324	5	2,60629	0,2178	ADHEr,PFLi,PGDH,PGI,TAL
325	5	2,05497	0,19746	ADHEr,ASPT,ATPS4r,PGI,THD5
326	5	1,65594	0,25767	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,PFLi,PGI
327	6	7,82999	0,02101	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
328	6	7,21161	0,05631	ADHEr,EDA y/o PGDHY,HEX1,NADH6,PGI,THD2 y/o GLUDy
329	6	7,16447	0,10326	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,PYK
330	6	6,97749	0,0848	ACKr y/o PTAr, ADHEr, ATPS4r,HEX1,PFLi,PGI
331	6	6,89088	0,16538	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy
332	6	6,86543	0,14022	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi
333	6	6,72704	0,08076	ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,MDH,NADH6,PYK
334	6	6,72704	0,08076	ADHEr,ASPT,MDH,NADH6,PGL y/o G6PDHy,PYK

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
335	6	6,67303	0,15616	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
336	6	6,67303	0,15616	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
337	6	6,62564	0,17535	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
338	6	6,44535	0,24832	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2 y/o GLUDy
339	6	6,44535	0,24832	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
340	6	6,3515	0,04992	ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
341	6	6,3052	0,17034	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,MDH,PGDH
342	6	6,25221	0,15227	ACKr y/o PTAr, ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH
343	6	6,22508	0,18792	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
344	6	6,20871	0,17434	ADHEr,EDA y/o PGDHY,MDH,PFLi,PGI,THD5
345	6	6,19852	0,09326	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
346	6	6,19408	0,16324	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK
347	6	6,19255	0,17194	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,MDH,TAL
348	6	6,18674	0,18098	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6
349	6	6,18358	0,11862	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,NADH6,PFLi
350	6	6,12313	0,19075	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6
351	6	6,09846	0,03275	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,THD2 y/o GLUDy
352	6	6,09846	0,03275	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
353	6	6,08794	0,17343	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,MDH,RPE
354	6	6,01307	0,17456	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6
355	6	6,00837	0,14517	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
356	6	5,99004	0,18339	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
357	6	5,9797	0,19373	ACKr y/o PTAr,ACS,ADHEr,HEX1,PGI,PPS
358	6	5,97334	0,11266	ADIIEr,GLCpts,MDII,NADII6,PFLi,PGI
359	6	5,96643	0,16387	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,MDH,PYK,RPE

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
360	6	5,8983	0,16412	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,MDH,PYK,TAL
361	6	5,89777	0,06803	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,HEX1,PGI,THD2 y/o GLUDy
362	6	5,81808	0,13048	ADHEr,ATPS4r,MDH,NADH6,PFLi,PGI
363	6	5,77313	0,13132	ADHEr,ATPS4r,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
364	6	5,75832	0,26044	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLU5K,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
365	6	5,75832	0,26044	ACKr y/o PTAr,ADHEr,G5SD,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
366	6	5,75556	0,13165	ADHEr,A TPS4r,FUM,NADH6,PFLi,PGI
367	6	5,68405	0,15589	ADHEr,A TPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
368	6	5,64518	0,25081	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
369	6	5,61474	0,1274	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 y/o GLUDy
370	6	5,57706	0,11542	ADIIEr,ATPS4r,GLCpts,NADII6,PFLi,TIID2 y/o GLUDy
371	6	5,55724	0,20645	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6
372	6	5,39028	0,01098	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
373	6	5,36336	0,12039	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
374	6	5,35114	0,12824	ADHEr,NADH12,NADH6,PFLi,PGI,RPE
375	6	5,34992	0,12867	ADHEr,FUM,NADH6,PFLi,PGI,RPE
376	6	5,34421	0,12775	ADHEr,NADH12,NADH6,PFLi,PGI,TAL
377	6	5,34298	0,12817	ADHEr,FUM,NADH6,PFLi,PGI,TAL
378	6	5,33668	0,12721	ADHEr,NADH12,NADH6,PFLi,PGDH,PGI
379	6	5,33544	0,12763	ADHEr,FUM,NADH6,PFLi,PGDH,PGI
380	6	5,3133	0,13509	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
381	6	5,30121	0,14588	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6,PPCK,RPE
382	6	5,29298	0,14544	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6,PPCK,TAL
383	6	5,28823	0,16642	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK
384	6	5,28401	0,14496	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6,PGL y/o G6PDHy,PPCK

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
385	6	5,28401	0,14496	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6,PGDH,PPCK
386	6	5,28388	0,145	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
387	6	5,23479	0,26578	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
388	6	5,22487	0,16488	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
389	6	5,22487	0,16488	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK
390	6	5,18966	0,19912	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK
391	6	5,18966	0,19912	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
392	6	5,17671	0,18111	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi
393	6	5,17275	0,18244	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
394	6	5,16547	0,14992	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,MDH,PFLi
395	6	5,14231	0,02949	ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLUDy,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
396	6	5,1335	0,31969	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,THD2 y/o GLUDy
397	6	5,12241	0,20902	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
398	6	5,11384	0,20727	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
399	6	5,1046	0,2054	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH
400	6	5,00987	0,10652	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
401	6	4,99324	0,24292	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi
402	6	4,98859	0,24448	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
403	6	4,91516	0,18237	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK
404	6	4,91516	0,18237	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
405	6	4,90997	0,20313	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,THD2 y/o GLUDy
406	6	4,86469	0,20078	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,PFLi,PPCK,RPE
407	6	4,79988	0,22937	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,MDH,NADH6,PYK
408	6	4,75998	0,22327	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS,THD2 y/o GLUDy
409	6	4,75998	0,22327	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,PPS,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
410	6	4,75352	0,20131	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,PFLi,PPCK,TAL
411	6	4,72575	0,27672	ADHEr,ATPS4r,FDH2,HEX1,LDH_D,NADH6
412	6	4,68468	0,22968	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,TAL,THD2 y/o GLUDy
413	6	4,67203	0,24577	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
414	6	4,6646	0,15914	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,NADH6,THD2 y/o GLUDy
415	6	4,6568	0,25634	ADHEr,ATPS4r,ICL,MDH,PGL y/o G6PDHy,PPS
416	6	4,6568	0,25634	ADHEr,ATPS4r,FUM,MDH,PGL y/o G6PDHy,PPS
417	6	4,6568	0,25634	ADHEr,ATPS4r,MALS,MDH,PGL y/o G6PDHy,PPS
418	6	4,64861	0,22305	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
419	6	4,61213	0,23585	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,RPE,THD2 y/o GLUDy
420	6	4,54731	0,14834	ADHEr,EDA y/o PGDHY,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
421	6	4,45035	0,18822	ADHEr,ASPT,ATPS4r,MDH,PYK,RPE
422	6	4,44107	0,285	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH-D,NADH6
423	6	4,37848	0,18825	ADHEr,ASPT,ATPS4r,MDH,PYK,TAL
424	6	4,35711	0,22671	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6
425	6	4,30745	0,05232	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
426	6	4,29111	0,05856	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGI,THD2 y/o GLUDy
427	6	4,29026	0,24034	ACKr y/o PTAr,ADHEr,EDA y/o PGDHY,G5SD,GLYCL,PGI
428	6	4,29026	0,24034	ACKr y/o PTAr,ADHEr,EDA y/o PGDHY,GLU5K,GLYCL,PGI
429	6	4,19017	0,18892	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,THD2 y/o GLUDy
430	6	4,14405	0,19951	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PGDH,PPCK
431	6	4,14405	0,19951	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,PPCK
432	6	4,14405	0,19951	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH,PPCK
433	6	4,13843	0,19251	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,MDH,PPCK,RPE
434	6	4,11865	0,20026	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK,TAL

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
435	6	4,11865	0,20026	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,TAL
436	6	4,10258	0,11665	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,PPCK,PYK,SUCOAS
437	6	4,09791	0,11017	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
438	6	4,09791	0,11017	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
439	6	4,09533	0,20095	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK,RPE
440	6	4,09533	0,20095	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,RPE
441	6	4,08336	0,13789	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
442	6	4,08234	0,13828	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
443	6	4,0683	0,31169	ADHEr,FUM,HEX1,LDH-D,PPS,THD2 y/o GLUDy
444	6	4,05789	0,14762	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
445	6	4,04139	0,17129	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,RPE,THD2 y/o GLUDy
446	6	3,97871	0,17786	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK
447	6	3,95205	0,10694	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,PGDH,PGI,SUCOAS
448	6	3,95184	0,18812	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
449	6	3,94624	0,19026	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
450	6	3,94455	0,21245	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,RPE
451	6	3,94203	0,1079	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,PGI,SUCOAS,TAL
452	6	3,93874	0,25675	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
453	6	3,93273	0,1088	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,PGI,RPE,SUCOAS
454	6	3,91186	0,22634	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
455	6	3,90038	0,04761	ADHEr,GLCpts,NADH6,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
456	6	3,8947	0,05032	ADHEr,FUM,GLC.pts,NADH6,PGI,THD2 y/o GLUDy
457	6	3,8947	0,05032	ADHEr,GLCpts,MDH,NADH6,PGI,THD2 y/o GLUDy
458	6	3,84046	0,12564	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
459	6	3,81228	0,08972	ADHEr,EDA y/o PGDHY,MDH,NADH6,PYK,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
460	6	3,81228	0,08972	ADHEr,MDH,NADH6,PGL y/o G6PDHy,PYK,THD2 y/o GLUDy
461	6	3,76251	0,07312	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
462	6	3,70324	0,1395	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK
463	6	3,70023	0,1556	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,PYK
464	6	3,70023	0,1556	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,PYK
465	6	3,67651	0,1546	ADHEr,MDH,NADH6,PGL y/o G6PDHy,PPCK,PYK
466	6	3,67651	0,1546	ADHEr,EDA y/o PGDHY,MDH,NADH6,PPCK,PYK
467	6	3,652	0,16631	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 y/o GLUDy
468	6	3,64497	0,19156	ADHEr,FUM,GLCpts,NADH6,RPE,THD2 y/o GLUDy
469	6	3,62254	0,1804	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
470	6	3,5494	0,21535	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,THD2 y/o GLUDy
471	6	3,41696	0,27865	ADHEr,DAAD,FDH2,NADH12,NADH6,PRO1z
472	6	3,41696	0,27865	ADHEr,ALAR,FDH2,NADH12,NADH6,PR01z
473	6	3,40228	0,13474	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
474	6	3,27381	0,03414	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
475	6	3,22868	0,19148	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPS,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
476	6	3,11905	0,12289	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,PYK,THD2 y/o GLUDy
477	6	3,11905	0,12289	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,PYK,THD2 y/o GLUDy
478	6	3,10777	0,12936	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
479	6	3,10777	0,12936	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
480	6	2,9427	0,20328	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MALS,PPS,THD2 y/o GLUDy
481	6	2,9427	0,20328	ADHEr,FRD y/o SUCD4,ICL,LDH_D,PPS,THD2 y/o GLUDy
482	6	2,80361	0,3231	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 y/o GLUDy
483	6	2,79375	0,29126	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
484	6	2,68652	0,29222	ADHEr,ATPS4r,GLUDy,HEX1,RPE,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
485	6	2,62059	0,29297	ADHEr,ATPS4r,GLUDy,HEX1,TAL,THD2 y/o GLUDy
486	6	2,46956	0,30762	ADHEr,FUM,LDH_D,PPS,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
487	6	0,97386	0,28207	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,MDH,PGL y/o G6PDHy,SUCOAS
488	6	0,97386	0,28207	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ICL,MDH,PGL y/o G6PDHy,SUCOAS
489	6	0,97386	0,28207	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,MDH,PGDH,SUCOAS
490	6	0,97386	0,28207	ACKr y/o PTAr,ADHEr,MALS,MDH,PGL y/o G6PDHy,SUCOAS
491	6	0,97386	0,28207	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ICL,MDH,PGDH,SUCOAS
492	6	0,97386	0,28207	ACKr y/o PTAr,ADHEr,MALS,MDH,PGDH,SUCOAS
493	6	0,90686	0,28301	ACKr y/o PTAr,ADHEr,MALS,MDH,SUCOAS,TAL
494	6	0,90686	0,28301	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ICL,MDH,SUCOAS,TAL
495	6	0,84537	0,28387	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ICL,MDH,RPE,SUCOAS
496	6	0,84537	0,28387	ACKr y/o PTAr,ADHEr,MALS,MDH,RPE,SUCOAS
497	3	3,26272	0,35236	ADHEr,LDH_D,NADH6
498	3	2,8403	0,28275	ADHEr,LDH_D,PPCK
499	3	1,72604	0,38773	ADHEr,ATPS4r,LDH_D
500	3	0,89333	0,37885	ADHEr,FUM,LDH_D
501	3	0,83466	0,26712	ADHEr,LDH_D,PGI
502	3	0,41621	0,38953	ADHEr,HEX1,LDH_D
503	4	5,71646	0,21908	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGI
504	4	4,83364	0,29669	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi
505	4	4,11897	0,24338	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PGI
506	4	3,77533	0,25553	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH
507	4	3,65248	0,19372	ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI
508	4	3,47283	0,25194	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK
509	4	3,39319	0,29001	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
510	4	3,35305	0,34906	ADHEr,LDH_D,NADH6,RPE
511	4	3,0877	0,16431	ADHEr,LDH_D,PGI,PPCK
512	4	2,90019	0,24841	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PPCK
513	4	2,89855	0,2815	ADHEr,LDH_D,PPCK,RPE
514	4	2,88617	0,25645	ADHEr,FUM,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
515	4	2,72186	0,35068	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D
516	4	2,0373	0,38161	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,RPE
517	4	1,89007	0,3845	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TAL
518	4	1,49147	0,26024	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI
519	4	0,5753	0,38695	ADHEr,HEX1,LDH_D,RPE
520	4	0,49968	0,38818	ADHEr,HEX1,LDH_D,TAL
521	5	6,93034	0,18126	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,NADH6,PGI
522	5	6,92332	0,16482	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PGI
523	5	6,91845	0,19552	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI
524	5	6,89839	0,18171	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI
525	5	6,14899	0,1758	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PFLi,PGI
526	5	5,8701	0,13379	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PGI,PPCK
527	5	5,85757	0,23874	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
528	5	5,85411	0,19685	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGI,PPS
529	5	5,81422	0,16481	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PGI
530	5	5,40131	0,26362	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
531	5	4,88764	0,27849	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi
532	5	4,88489	0,27942	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi
533	5	4,81778	0,26037	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6
534	5	4,73419	0,21859	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
535	5	4,63783	0,29595	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6
536	5	4,30547	0,19131	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGI
537	5	4,2733	0,23078	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK
538	5	4,23803	0,24209	ACKr y/o PTAr,ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PGI
539	5	4,12032	0,32701	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6
540	5	3,9718	0,23354	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK
541	5	3,9718	0,23354	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK
542	5	3,8747	0,21758	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D, MDH
543	5	3,84814	0,25342	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,RPE
544	5	3,83986	0,2047	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK
545	5	3,75472	0,32987	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH-D,NADH6
546	5	3,54965	0,29114	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH
547	5	3,54605	0,21695	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK
548	5	3,54385	0,218	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK
549	5	3,53615	0,25027	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
550	5	3,5018	0,32809	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D
551	5	3,46904	0,25375	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
552	5	3,46528	0,28851	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
553	5	3,44916	0,13425	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
554	5	3,44555	0,26498	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,THD2 y/o GLUDy
555	5	3,43776	0,29402	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,TAL
556	5	3,33377	0,2967	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,RPE
557	5	3,33152	0,33978	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,TAL
558	5	3,32935	0,34088	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL
559	5	3,32788	0,32122	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
560	5	3,31278	0,3493	ADHEr,G5SD,LDH_D,NADH6,TAL
561	5	3,31278	0,3493	ADHEr,GLU5K,LDH_D,NADH6,TAL
562	5	3,23462	0,28717	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,SUCOAS
563	5	3,17484	0,10602	ADHEr,LDH_D,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
564	5	3,16614	0,11184	ADHEr,LDH_D,MDH,PGI,THD2 y/o GLUDy
565	5	3,16614	0,11184	ADHEr,FUM,LDH_D,PGI,THD2 y/o GLUDy
566	5	3,11125	0,24826	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
567	5	2,95529	0,24477	ADHEr,LDH_D,PPCK,RPE,THD2 y/o GLUDy
568	5	2,95136	0,24731	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PPCK,RPE
569	5	2,94249	0,25305	ADHEr,FUM,LDH_D,RPE,THD2 y/o GLUDy
570	5	2,93765	0,22693	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,PYK
571	5	2,93765	0,22693	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,PYK
572	5	2,9332	0,24406	ADHEr,LDH_D,PPCK,TAL,THD2 y/o GLUDy
573	5	2,90913	0,24328	ADHEr,LDH_D,PGDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
574	5	2,90913	0,24328	ADHEr,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,PPCK,THD2 y/o GLUDy
575	5	2,90081	0,26381	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,TAL
576	5	2,90081	0,26381	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TAL
577	5	2,79498	0,34856	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,RPE
578	5	2,61943	0,36027	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS
579	5	2,60615	0,3202	ADHEr,ATPS4r,HEX1 ,LDH_D,PFLi
580	5	2,60314	0,31113	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi
581	5	2,54001	0,22798	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI
582	5	2,5259	0,22921	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,TAL
583	5	2,5129	0,23034	ADHEr,LDH_D,PPLi,PGI,RPE
584	5	2,50442	0,16853	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PGI

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
585	5	2,45433	0,3546	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
586	5	2,18633	0,3609	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 y/o GLUDy
587	5	2,11347	0,31979	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH
588	5	1,5933	0,25891	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI
589	5	0,9475	0,3633	ADHEr,FUM,LDH_D,PGDH,TAL
590	5	0,9475	0,3633	ADHEr,FUM,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,TAL
591	6	7,08404	0,12641	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
592	6	7,0245	0,10838	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
593	6	6,98742	0,06748	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 y/o GLUDy
594	6	6,69134	0,13239	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH
595	6	6,58534	0,16513	ADHEr,EDA y/o PGDHY,GLCpts,LDH_D,PFLi,PGI
596	6	6,55123	0,09841	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy,PYK
597	6	6,55123	0,09841	ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PYK
598	6	6,36357	0,11937	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PFLi,PGI,THD2 y/o GLUDy
599	6	6,22082	0,11375	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PFLi,PGI
600	6	5,98165	0,07186	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PGI,PPCK
601	6	5,93527	0,09761	ADHEr,EDA y/o PGDHY,GLCpts,LDH_D,PGI,PPCK
602	6	5,87444	0,0434	ADHEr,EDA y/o PGDHY,FUM,LDH_D,PGI,THD2 y/o GLUDy
603	6	5,87444	0,0434	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PGI,THD2 y/o GLUDy
604	6	5,65488	0,26204	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
605	6	5,59555	0,20952	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
606	6	5,1776	0,13724	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
607	6	5,11744	0,13758	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
608	6	5,11744	0,13758	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGI
609	6	5,09877	0,17589	ADHEr,A TPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
610	6	5,08219	0,13778	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
611	6	5,02693	0,21085	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGDH,PPCK
612	6	5,02693	0,21085	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGL y/o G6PDHy,PPCK
613	6	5,00057	0,21154	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
614	6	4,97638	0,21218	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
615	6	4,88512	0,29281	ADHEr,GLU5K,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE
616	6	4,88512	0,29281	ADHEr,G5SD,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE
617	6	4,885	0,29286	ADHEr,ASNS2,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE
618	6	4,85776	0,29446	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,RPE
619	6	4,83644	0,29517	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,TAL
620	6	4,66386	0,18074	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK
621	6	4,66386	0,18074	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK
622	6	4,63095	0,20189	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK
623	6	4,49707	0,25782	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
624	6	4,4958	0,1778	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PYK
625	6	4,41977	0,25646	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
626	6	4,18509	0,32432	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PGL y/o G6PDHy
627	6	4,18509	0,32432	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PGDH
628	6	4,15013	0,1124	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK,THD2 y/o GLUDy
629	6	4,14582	0,32483	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL
630	6	4,1099	0,32529	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE
631	6	4,04473	0,12883	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI,PPCK
632	6	4,03844	0,12934	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,TAL
633	6	4,03266	0,12981	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,RPE
634	6	4,02531	0,1111	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
635	6	3,9367	0,21579	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,RPE
636	6	3,76049	0,30843	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi
637	6	3,71345	0,27754	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH,TAL
638	6	3,69299	0,14673	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK,THD2 y/o GLUDy
639	6	3,64625	0,1409	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PGI,PPCK
640	6	3,64625	0,1409	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PGI,PPCK
641	6	3,60057	0,21551	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
642	6	3,59735	0,21725	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK,RPE
643	6	3,59622	0,19297	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK
644	6	3,59622	0,19297	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
645	6	3,59594	0,19311	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK
646	6	3,59594	0,19311	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,PYK
647	6	3,59157	0,1952	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,THD2 y/o GLUDy
648	6	3,55204	0,22769	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,TAL
649	6	3,55204	0,22769	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
650	6	3,53212	0,25244	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
651	6	3,52326	0,22785	ADHEr,GLU5K,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
652	6	3,52326	0,22785	ADHEr,G5SD,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
653	6	3,52326	0,22785	ADHEr,FUM,GLU5K,LDH_D,NADH6,PPCK
654	6	3,52326	0,22785	ADHEr,FUM,G5SD,LDH_D,NADH6,PPCK
655	6	3,52319	0,22788	ADHEr,ASNS2,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK
656	6	3,52319	0,22788	ADHEr,ASNS2,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
657	6	3,51328	0,26261	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE,THD2 y/o GLUDy
658	6	3,40958	0,31856	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE
659	6	3,19551	0,34972	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
660	6	2,95797	0,22895	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK,TAL
661	6	2,95797	0,22895	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,TAL
662	6	2,94768	0,30664	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi
663	6	2,92149	0,26881	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy,PPS
664	6	2,76831	0,35787	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,RPE
665	6	2,7362	0,31504	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,RPE
666	6	2,73201	0,30945	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,RPE
667	6	2,69754	0,35901	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,TAL
668	6	2,67469	0,31748	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,TAL
669	6	2,67071	0,31025	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,TAL
670	6	2,61965	0,35455	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 y/o GLUDy
671	6	2,60629	0,2178	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI,TAL
672	6	2,5479	0,2938	ADHEr,ATPS4r,GLUDy,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
673	6	2,5408	0,35457	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 y/o GLUDy
674	6	2,05497	0,19746	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,PGI,THD5
675	6	1,65594	0,25767	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI
676	7	7,90077	0,01226	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
677	7	7,84104	0,01965	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
678	7	7,7052	0,03644	ADHEr,ASPT,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
679	7	7,67191	0,04055	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
680	7	7,61518	0,06956	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH12.PFLi,THD2 y/o GLUDy
681	7	7,57942	0,07603	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH
682	7	7,57942	0,07603	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGDH
683	7	7,57606	0,07664	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
684	7	7,57606	0,07664	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,TAL

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
685	7	7,57295	0,0772	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
686	7	7,57295	0,0772	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,RPE
687	7	7,55163	0,08105	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
688	7	7,38115	0,07649	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi
689	7	7,293	0,07152	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
690	7	7,21161	0,05631	ADHEr,EDA y/o PGDHY,HEX1,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 y/o GLUDy
691	7	7,10953	0,03056	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PYK,THD2 y/o GLUDy
692	7	7,04629	0,01861	ADHEr,ARGt4,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,THD2 y/o GLUDy
693	7	7,04629	0,01861	ADHEr,ARGt4,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
694	7	7,01619	0,17329	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH
695	7	7,00623	0,10284	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
696	7	7,00542	0,17519	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
697	7	6,99744	0,05155	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ICL,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
698	7	6,99744	0,05155	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
699	7	6,99744	0,05155	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MALS,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
700	7	6,99618	0,02608	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
701	7	6,99539	0,17696	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
702	7	6,99098	0,13845	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,PGL y/o G6PDHy
703	7	6,99098	0,13845	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PFLi
704	7	6,97749	0,0848	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI
705	7	6,95495	0,04834	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
706	7	6,94643	0,04549	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
707	7	6,94643	0,04549	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
708	7	6,94035	0,16409	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH
709	7	6,93216	0,19304	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,PPS,THD2 y/o GLUDy
710	7	6,9218	0,16465	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,TAL
711	7	6,90477	0,16517	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,RPE
712	7	6,89223	0,07039	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
713	7	6,89088	0,16538	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PGDH
714	7	6,88301	0,07117	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
715	7	6,88301	0,07117	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
716	7	6,86164	0,16622	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,TAL
717	7	6,83471	0,167	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,RPE
718	7	6,81823	0,05671	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
719	7	6,75858	0,12153	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
720	7	6,75858	0,12153	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
721	7	6,74354	0,0559	ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
722	7	6,72704	0,08076	ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PYK
723	7	6,72704	0,08076	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PGL y/o G6PDHy,PYK
724	7	6,72478	0,09245	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
725	7	6,71779	0,1313	ADHEr,FBP,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,THD2 y/o GLUDy
726	7	6,71371	0,1397	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
727	7	6,69882	0,08259	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,THD2 y/o GLUDy
728	7	6,69814	0,08084	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGDH,THD2 y/o GLUDy
729	7	6,68517	0,13281	ADHEr,FBP,LDH_D,MDH,PFLi,TAL,THD2 y/o GLUDy
730	7	6,67827	0,0833	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,TAL,THD2 y/o GLUDy
731	7	6,67803	0,08153	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,TAL,THD2 y/o GLUDy
732	7	6,66553	0,13149	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,PGI,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
733	7	6,65922	0,08397	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,RPE,THD2 y/o GLUDy
734	7	6,65477	0,13422	ADHEr,FBP,LDH_D,MDH,PFLi,RPE,THD2 y/o GLUDy
735	7	6,65444	0,13292	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,TAL,THD2 y/o GLUDy
736	7	6,64411	0,13426	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,RPE,THD2 y/o GLUDy
737	7	6,54706	0,05865	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
738	7	6,50546	0,0488	ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,FUM,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
739	7	6,4951	0,09302	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,RPE,THD2 y/o GLUDy
740	7	6,48152	0,09261	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,TAL,THD2 y/o GLUDy
741	7	6,4815	0,14937	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,RPE,THD2 y/o GLUDy
742	7	6,4814	0,1488	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TAL,THD2 y/o GLUDy
743	7	6,48129	0,14819	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LD H_D,MDH,NADH6,PGDH,THD2 y/o GLUDy
744	7	6,46677	0,09217	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PGDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
745	7	6,46677	0,09217	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,PPCK,THD2 y/o GLUDy
746	7	6,40404	0,13985	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
747	7	6,39358	0,0544	ADHEr,ASPT,FUM,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
748	7	6,36333	0,16503	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
749	7	6,35537	0,14906	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PYK
750	7	6,34075	0,15004	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FDH2,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
751	7	6,33847	0,16728	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6
752	7	6,30136	0,19463	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
753	7	6,30082	0,1583	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PYK

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
754	7	6,23552	0,18763	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
755	7	6,23519	0,15548	ACKr y/o PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PGDH,THD2 y/o GLUDy
756	7	6,22748	0,15693	ACKr y/o PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,TAL,THD2 y/o GLUDy
757	7	6,22033	0,15828	ACKr y/o PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,RPE,THD2 y/o GLUDy
758	7	6,2176	0,1588	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGDH,THD2 y/o GLUDy
759	7	6,21321	0,15963	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,TAL,THD2 y/o GLUDy
760	7	6,20917	0,16039	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,RPE,THD2 y/o GLUDy
761	7	6,20871	0,17434	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,THD5
762	7	6,18575	0,17904	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FDH2,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6
763	7	6,17771	0,01562	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
764	7	6,17771	0,01562	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
765	7	6,10255	0,12296	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
766	7	6,08364	0,10963	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
767	7	6,05909	0,217	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
768	7	5,99909	0,09659	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
769	7	5,99909	0,09659	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,PPCK
770	7	5,9797	0,19373	ACKr y/o PTAr,ACS,ADHEr,HEX1,LDH_D,PGI,PPS
771	7	5,97334	0,11266	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGI
772	7	5,94122	0,14646	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,PYK
773	7	5,94122	0,14646	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK,PYK
774	7	5,9395	0,02821	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
775	7	5,89777	0,06803	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,HEX1,LDH_D,PGI,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
776	7	5,86803	0,06511	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
777	7	5,84763	0,01509	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PGI,THD2 y/o GLUDy
778	7	5,80727	0,03994	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
779	7	5,80665	0,23182	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 y/o GLUDy
780	7	5,77313	0,13132	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
781	7	5,77052	0,23124	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 y/o GLUDy
782	7	5,75832	0,26044	ACKr y/o PTAr,ADHEr,G5SD,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
783	7	5,75832	0,26044	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLU5K,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
784	7	5,75556	0,13165	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
785	7	5,75413	0,21628	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,THD2 y/o GLUDy
786	7	5,75142	0,15	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
787	7	5,75142	0,15	ADHEr,A TPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK
788	7	5,73569	0,11619	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
789	7	5,73112	0,23062	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PGDH,THD2 y/o GLUDy
790	7	5,73112	0,23062	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,THD2 y/o GLUDy
791	7	5,7037	0,1229	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
792	7	5,7037	0,1229	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK
793	7	5,67082	0,04313	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,THD2 y/o GLUDy
794	7	5,67082	0,04313	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 y/o GLUDy
795	7	5,6689	0,01529	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PYK,THD2 y/o GLUDy
796	7	5,57706	0,11542	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
797	7	5,57479	0,20482	ACKr y/o PT,Ax,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,THD2 y/o

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
				GLUDy
798	7	5,56128	0,20483	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH12,THD2 y/o GLUDy
799	7	5,53687	0,15179	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
800	7	5,48032	0,07882	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
801	7	5,48032	0,07882	ADHEr,ATPS4r,FDH2,FUM,LDH_D,NADH6,THD2 y/o GLUDy
802	7	5,4574	0,07896	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
803	7	5,43688	0,14109	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 y/o GLUDy
804	7	5,42926	0,03599	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
805	7	5,41288	0,10644	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,RPE
806	7	5,41288	0,10644	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,PPCK,RPE
807	7	5,40727	0,10598	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,TAL
808	7	5,40727	0,10598	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,PPCK,TAL
809	7	5,40541	0,10406	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
810	7	5,40329	0,10477	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
811	7	5,40329	0,10477	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
812	7	5,40117	0,10549	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,PGI,PPCK
813	7	5,40117	0,10549	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI,PPCK
814	7	5,38947	0,11011	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK
815	7	5,37417	0,11441	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
816	7	5,37043	0,12143	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGI,RPE
817	7	5,37015	0,12013	ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
818	7	5,36414	0,12087	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGI,TAL
819	7	5,3573	0,12027	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGDH,PGI
820	7	5,3512	0,12232	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PRO1z,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
821	7	5,35114	0,12824	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI,RPE
822	7	5,34992	0,12867	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,RPE
823	7	5,34421	0,12775	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI,TAL
824	7	5,34298	0,12817	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,TAL
825	7	5,33668	0,12721	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGDH,PGI
826	7	5,33544	0,12763	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PGDH,PGI
827	7	5,32853	0,04869	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy,PPCK,THD2 y/o GLUDy
828	7	5,32586	0,13717	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
829	7	5,31986	0,13616	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
830	7	5,31768	0,14006	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,RPE
831	7	5,31768	0,14006	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
832	7	5,31338	0,13506	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PGL y/o G6PDHy,PPCK
833	7	5,31338	0,13506	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PGDH,PPCK
834	7	5,31161	0,139	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
835	7	5,31161	0,139	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,TAL
836	7	5,30507	0,13786	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PGL y/o G6PDHy,PPCK
837	7	5,30507	0,13786	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH,PPCK
838	7	5,30507	0,13786	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PGDH,PPCK
839	7	5,30121	0,14588	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
840	7	5,29298	0,14544	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
841	7	5,29144	0,14245	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi
842	7	5,28753	0,08933	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
843	7	5,28422	0,14489	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH12,NADH6,THD2 y/o GLUDy
844	7	5,28422	0,14489	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
845	7	5,28401	0,14496	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PGDH,PPCK
846	7	5,28401	0,14496	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PGL y/o G6PDHy,PPCK
847	7	5,27588	0,18393	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS,THD2 y/o GLUDy
848	7	5,27588	0,18393	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,PPS,THD2 y/o GLUDy
849	7	5,2736	0,14846	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
850	7	5,25759	0,18586	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,TAL,THD2 y/o GLUDy
851	7	5,24329	0,06953	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH,THD2 y/o GLUDy
852	7	5,24057	0,18767	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,RPE,THD2 y/o GLUDy
853	7	5,23194	0,07004	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,TAL,THD2 y/o GLUDy
854	7	5,22143	0,07051	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,RPE,THD2 y/o GLUDy
855	7	5,1096	0,03265	ADHEr,ASPT,FUM,GLUDy,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
856	7	5,07833	0,23187	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,THD2 y/o GLUDy
857	7	4,9126	0,20186	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS,TAL,THD2 y/o GLUDy
858	7	4,9126	0,20186	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,PPS,TAL,THD2 y/o GLUDy
859	7	4,89537	0,08136	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
860	7	4,86469	0,20078	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK,RPE
861	7	4,86188	0,1035	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,PYK,THD2 y/o GLUDy
862	7	4,85917	0,04186	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
863	7	4,85917	0,04186	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
864	7	4,84043	0,16101	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK
865	7	4,75352	0,20131	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK,TAL
866	7	4,6646	0,15914	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,THD2 y/o GLUDy
867	7	4,6568	0,25634	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MALS,MDH,PGL y/o G6PDHy,PPS

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
868	7	4,6568	0,25634	ADHEr,ATPS4r,ICL,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy,PPS
869	7	4,6568	0,25634	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy,PPS
870	7	4,60984	0,1687	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,RPE,THD2 y/o GLUDy
871	7	4,60771	0,13834	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 y/o GLUDy
872	7	4,5647	0,0741	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
873	7	4,51839	0,16783	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,TAL,THD2 y/o GLUDy
874	7	4,48284	0,18237	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PPCK
875	7	4,46608	0,18828	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH D,MDH,NADH12,NADH6
876	7	4,43524	0,31394	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS
877	7	4,43524	0,31394	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,PPS
878	7	4,43072	0,22439	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,RPE
879	7	4,41919	0,16689	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH,THD2 y/o GLUDy
880	7	4,4053	0,01495	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
881	7	4,39394	0,31457	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,TAL
882	7	4,37728	0,02565	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
883	7	4,37061	0,04989	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
884	7	4,36653	0,05265	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 y/o GLUDy
885	7	4,36374	0,03082	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PGI,THD2 y/o GLUDy
886	7	4,36277	0,03119	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PGI,THD2 y/o GLUDy
887	7	4,35613	0,31514	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,RPE
888	7	4,29026	0,24034	ACKr y/o PTAr,ADHEr,EDA y/o PGDHY,GLU5K,GLYCL,LDH_D,PGI
889	7	4,29026	0,24034	ACKr y/o PTAr,ADHEr,EDA y/o PGDHY,G5SD,GLYCL,LDH_D,PGI
890	7	4,25283	0,07318	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,PYK,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
891	7	4,17894	0,31889	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PPS,THD2 y/o GLUDy
892	7	4,17527	0,08598	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,MALS,THD2 y/o GLUDy
893	7	4,17527	0,08598	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,HEX1,ICL,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
894	7	4,17215	0,10398	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
895	7	4,15042	0,11229	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
896	7	4,14938	0,11268	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
897	7	4,141	0,08314	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
898	7	4,10258	0,11665	ACKr y/o PTAr,ADHEr,A TPS4r,LDH_D,PPCK,PYK,SUCOAS
899	7	4,08743	0,09886	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
900	7	4,04907	0,15099	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
901	7	4,03008	0,1761	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,RPE
902	7	4,01398	0,06136	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
903	7	4,00698	0,18592	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDHNADH6,PPCK,RPE
904	7	4,00128	0,18834	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
905	7	3,95205	0,10694	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PGDH,PGI,SUCOAS
906	7	3,94203	0,1079	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PGI,SUCOAS,TAL
907	7	3,93273	0,1088	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PGI,RPE,SUCOAS
908	7	3,90038	0,04761	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
909	7	3,8947	0,05032	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 y/o GLUDy
910	7	3,8947	0,05032	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PGI,THD2 y/o GLUDy
911	7	3,88125	0,03656	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
912	7	3,86624	0,19846	ACKr y/o PTAr,ADHEr,CITL,LDH_D,NADH12,NADH6,THD2 y/o GLUDy
913	7	3,82356	0,31976	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PPS,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
914	7	3,81228	0,08972	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PYK,THD2 y/o GLUDy
915	7	3,81228	0,08972	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGL y/o G6PDHy,PYK,THD2 y/o GTUDy
916	7	3,77115	0,10937	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
917	7	3,7291	0,12947	ADHEr,LDH_D,MDH,NADM12,NADH6,PYK,THD2 y/o GLUDy
918	7	3,7245	0,13167	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 y/o GLUDy
919	7	3,68994	0,14818	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
920	7	3,67651	0,1546	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGL y/o G6PDHy,PPCK,PYK
921	7	3,67651	0,1546	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,PYK
922	7	3,64497	0,19156	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,RPE,THD2 y/o GLUDy
923	7	3,60739	0,21183	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,RPE,THD2 y/o GLUDy
924	7	3,41696	0,27865	ADHEr,ALAR,FDH2,LDH_D,NADH12,NADH6,PRO1z
925	7	3,41696	0,27865	ADHEr,DAAD,FDH2,LDH_D,NADH12,NADH6,PRO1z
926	7	3,40396	0,28486	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,THD2 y/o GLUDy
927	7	3,25909	0,04258	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
928	7	3,25909	0,04258	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
929	7	3,2372	0,06431	ADHEr,FBP,LDH_D,MDH,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
930	7	3,2372	0,06431	ADHEr,FBP,FUM,LDH_D,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
931	7	3,23399	0,06432	ADHEr,FUM,LDH_D,PGI,PPCK,RPE,THD2 y/o GLUDy
932	7	3,23399	0,06432	ADHEr,LDH_D,MDH,PGI,PPCK,RPE,THD2 y/o GLUDy
933	7	3,22783	0,06435	ADHEr,FUM,LDH_D,PGI,PPCK,TAL,THD2 y/o GLUDy
934	7	3,22783	0,06435	ADHEr,LDH_D,MDH,PGI,PPCK,TAL,THD2 y/o GLUDy
935	7	3,01859	0,19992	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,PPS,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
936	7	3,00174	0,19757	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MALS,PPS,RPE,THD2 y/o GLUDy
937	7	3,00174	0,19757	ADHEr,FRD y/o SUCD4,ICL,LDH_D,PPS,RPE,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
938	7	2,96091	0,22716	ADHEr,FUM,GLUDy,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 y/o GLUDy
939	7	2,93716	0,22721	ADHEr,FUM,GLU5K,GLUDy,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
940	7	2,93716	0,22721	ADHEr,FUM,G5SD,GLUDy,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
941	7	2,93711	0,22724	ADHEr,ASNS2,FUM,GLUDy,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
942	7	2,7731	0,32129	ADHEr,ASNS2,FUM,GLU5K,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
943	7	2,7731	0,32129	ADHEr,ASNS2,FUM,G5SD,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
944	7	2,68652	0,29222	ADHEr,ATPS4r,GLUDy,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 y/o GLUDy
945	7	2,62059	0,29297	ADHEr,ATPS4r,GLUDy,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 y/o GLUDy
946	7	2,35991	0,29396	ACKr y/o FTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,RPH,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
947	7	2,35766	0,29368	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,SUCOAS,TAL,THD2 y/o GLUDy
948	7	2,3552	0,29337	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
949	7	2,3552	0,29337	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PGDH,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
950	7	1,91133	0,2766	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy,SUCOAS
951	7	1,91133	0,2766	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,MDH,PGDH,SUCOAS
952	7	1,91133	0,2766	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ICL,LDH_D,MDH,PGDH,SUCOAS
953	7	1,91133	0,2766	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MALS,MDH,PGL y/o G6PDHy,SUCOAS
954	7	1,91133	0,2766	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ICL,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy,SUCOAS
955	7	1,91133	0,2766	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MALS,MDH,PGDH,SUCOAS
956	7	1,86676	0,2774	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL
957	7	1,86676	0,2774	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MALS,MDH,SUCOAS,TAL
958	7	1,86676	0,2774	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ICL,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL
959	7	1,8259	0,27813	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MALS,MDH,RPE,SUCOAS

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
960	7	1,8259	0,27813	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS
961	7	1,8259	0,27813	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ICL,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS
962	7	1,11652	0,25888	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MALS,PPS,THD2 y/o GLUDy
963	7	1,11652	0,25888	ADHEr,ASPT,FUM,ICL,LDH_D,PPS,THD2 y/o GLUDy
964	5	7,09275	0,11213	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi
965	5	6,00696	0,20464	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi
966	5	5,40138	0,11184	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
967	5	2,59719	0,29318	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi
968	5	2,57488	0,22587	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPCK
969	5	0,16844	0,19119	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,PFLi
970	6	7,39516	0,07475	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi
971	6	7,007	0,09285	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
972	6	6,90414	0,13454	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi
973	6	6,57261	0,1606	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi
974	6	6,00781	0,09114	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,PPCK
975	6	6,00781	0,09114	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
976	6	5,39072	0,10901	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK
977	6	5,38861	0,10972	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
978	6	5,38861	0,10972	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK
979	6	5,06553	0,21856	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi
980	6	5,00212	0,2515	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE
981	6	4,98367	0,25221	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,TAL
982	6	4,96609	0,25206	ADHEr,GLU5K,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
983	6	4,96609	0,25206	ADHEr,G5SD,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
984	6	4,96599	0,2521	ADHEr,ASNS2,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
985	6	4,95562	0,24186	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
986	6	2,71835	0,29123	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,RPE
987	6	2,66849	0,22473	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPCK,RPE
988	6	2,66076	0,29216	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,TAL
989	6	1,85699	0,28717	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH D,PFLi,SUCOAS
990	6	1,63724	0,03081	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,THD2 y/o GLUDy
991	6	1,63724	0,03081	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,THD2 y/o GLUDy
992	6	1,38263	0,33268	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,PFLi,THD2 y/o GLUDy
993	6	0,25855	0,07515	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi
994	7	7,86642	0,01651	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PYK
995	7	7,71509	0,0515	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,PPS
996	7	7,70416	0,03656	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
997	7	7,48515	0,04452	ADHEr,EDA y/o PGDHY,GLCpts,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
998	7	7,44181	0,09832	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi
999	7	7,06656	0,04513	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi
1000	7	7,00811	0,04002	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
1001	7	7,00811	0,04002	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK
1002	7	7,00532	0,07752	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi
1003	7	6,99105	0,04159	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK
1004	7	6,96695	0,09776	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi
1005	7	6,69345	0,1479	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
1006	7	6,49322	0,12467	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PPS
1007	7	6,43565	0,1244	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi
1008	7	6,21891	0,18801	ADHEr,A TPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PGDH,PPS
1009	7	6,21891	0,18801	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PGL y/o G6PDHy,PPS

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
1010	7	6,21459	0,18835	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PPS,TAL
1011	7	6,21064	0,18866	ADHEr,A TPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PPS,RPE
1012	7	6,16665	0,08397	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
1013	7	6,13458	0,01447	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI,PPCK
1014	7	6,13051	0,01457	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGI,PPCK
1015	7	6,13051	0,01457	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,PPCK
1016	7	5,49961	0,07232	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK
1017	7	5,49821	0,07279	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
1018	7	5,49821	0,07279	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK
1019	7	5,22113	0,16614	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH12,PFLi,THD2 y/o GLUDy
1020	7	5,17418	0,18196	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi
1021	7	5,15097	0,18978	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
1022	7	4,01417	0,12149	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2 y/o GLUDy
1023	7	3,75439	0,27459	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS
1024	7	3,75439	0,27459	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,PPS
1025	7	2,64048	0,21814	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PGL y/o GGPDHy,PPCK,TAL
1026	7	2,64048	0,21814	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PGDH,PPCK,TAL
1027	7	2,62716	0,22497	ADHEr,GLYCL,HEX1,LDH_D,PFLi,PPCK,TAL
1028	7	1,5697	0,24425	ACKr y/o PTAr,ACS,ADHEr,T,DH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
1029	7	1,09053	0,33566	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PGDH,PPS
1030	7	1,09053	0,33566	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PGL y/o G6PDHy,PPS
1031	7	0,78572	0,33663	ADHEr,A TPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PPS,TAL
1032	7	0,50621	0,33751	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PPS,RPE
1033	8	7,88716	0,0204	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
1034	8	7,88653	0,02051	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,POX
1035	8	7,88026	0,02165	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 GLUDy y/o
1036	8	7,84104	0,02874	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,PPS
1037	8	7,80925	0,03448	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
1038	8	7,80925	0,03448	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
1039	8	7,67439	0,05735	ACKr PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PPLi y/o
1040	8	7,42051	0,09374	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PPS
1041	8	7,32674	0,0933	ACKr PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi y/o
1042	8	6,93593	0,04641	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH12,PFLi,PPCK,THD2 GLUDy y/o
1043	8	6,58791	0,09796	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,PGL G6PDHy,PPS y/o
1044	8	6,58791	0,09796	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,PGDH,PPS
1045	8	6,5802	0,09979	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,PPS,TAL
1046	8	6,57291	0,10152	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,PPS,RPE
1047	8	5,75656	0,15131	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPS,THD2 GLUDy y/o
1048	8	5,74602	0,16073	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH12,PFLi,PPS,THD2 GLUDy y/o
1049	8	5,67321	0,16148	ACKr PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH12,PFLi,THD2 GLUDy y/o y/o
1050	8	5,60169	0,03793	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
1051	8	5,60169	0,03793	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
1052	8	5,56692	0,04965	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
1053	8	5,56692	0,04965	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGL y/o G6PDHy,PPCK,PYK
1054	8	5,50925	0,07241	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,PPCK,RPE,THD2 y/o GLUDy
1055	8	5,50597	0,07191	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,PPCK,TAL,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
1056	8	5,50242	0,07138	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,PGL G6PDHy,PPCK,THD2 y/o GLUDy y/o
1057	8	5,50242	0,07138	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,PGDH,PPCK,THD2 GLUDy y/o
1058	8	5,44507	0,0907	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PRO1z,THD2 GLUDy y/o
1059	8	5,37306	0,11496	ADHEr,DAAD,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,PRO1z
1060	8	5,37306	0,11496	ADHEr,ALAR,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,PRO1z
1061	8	5,33606	0,12742	ADHEr,FUM,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,PYK
1062	8	5,17764	0,18079	ADHEr,DAAD,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PRO1z
1063	8	5,17764	0,18079	ADHEr,ALAR,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PRO1z
1064	8	5,17492	0,2398	ACKr y/o PTAr,ACS,ADHEr,EDA PGDHY,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy y/o
1065	8	4,65995	0,20434	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,PPS,RPE
1066	8	4,6123	0,20163	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,PPS,TAL
1067	8	4,56149	0,19874	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,PPS
1068	8	4,13777	0,23628	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,RPE
1069	8	4,06785	0,23403	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,TAL
1070	8	4,04062	0,10178	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PDH,PFLi,PPS
1071	8	4,04062	0,10178	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PDH,PFLi,PPS
1072	8	3,9927	0,23161	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,PGL y/o G6PDHy,PPS
1073	8	3,9927	0,23161	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,PGDH,PPS
1074	8	2,03637	0,11796	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FBP,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,THD2 y/o GLUDy
1075	8	1,98516	0,11932	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FBP,LDH_D,MDH,PFLi,TAL,THD2 y/o GLUDy
1076	8	1,93743	0,12058	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FBP, LDH_D,MDH,PFLi,RPE,THD2 y/o GLUDy
1077	8	1,76983	0,24401	ACKr y/o PTAr,ACS,ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
1078	8	1,5107	0,31956	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,PFLi,PGL G6PDHy,TAL,THD2 y/o GLUDy y/o
Id. de diseño nuevo	Num KO)	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
1079	8	1,5107	0,31956	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,PFLi,PGDH,TAL,THD2 GLUDy y/o
1080	8	1,45644	0,3201	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PGDH,PPS,TAL
1081	8	1,45644	0,3201	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PGL y/o G6PDHy,PPS,TAL
1082	3	0,165681142	0,248770484	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI
1083	3	2,792461067	0,310192487	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D
1084	4	0,245091981	0,278197481	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D
1085	4	1,163607813	0,384018912	ADHEr,ATPS4r,CBMK2,LDH_D
1086	4	2,27265597	0,332308612	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6
1087	4	1,260046787	0,384504476	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TKT1
1088	4	1,454891201	0,378757536	ADHEr,A TPS4r,LDH_D, TKT2
1089	4	2,042634808	0,153142196	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI
1090	4	2,041701304	0,149789093	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,PPCK
1091	4	0,270967943	0,244721556	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,TKT2
1092	4	2,907366868	0,244293538	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK
1093	4	0,363337262	0,340044232	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH
1094	4	2,907366868	0,244293538	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK
1095	4	2,085082479	0,31290916	ADHEr,LDH_D,ME2,NADH6
1096	4	2,881545955	0,259101938	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2
1097	4	3,647199605	0,168610416	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK y/o FBA y/o TPI
1098	4	2,774595569	0,320438424	ADHEr,FDH2,LDH_D,NADH6
1099	4	3,335904914	0,317384404	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6
1100	4	3,331989713	0,319255557	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
1101	4	2,224731454	0,327457036	ADHEr,LDH_D,NADH6,TKT2
1102	4	0,23734264	0,246014656	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,RPE
1103	4	0,454138927	0,26931886	ADHEr,LDH_D,PPCK,TKT2
1104	4	0,413317212	0,38682004	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS
1105	4	2,860294682	0,306273023	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,RPE
1106	4	2,808840722	0,300798688	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D
1107	4	2,817574813	0,295789651	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D
1108	4	2,916137696	0,239263432	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH
1109	4	2,973865652	0,206156212	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK
1110	4	2,892050239	0,30443817	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,TKT2
1111	4	0,203360099	0,247321495	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,TAL
1112	4	2,117903686	0,331070152	ADHEr,LDH_D,NADH6,TAL
1113	4	0,34884992	0,271004016	ADHEr,LDH_D,PPCK,TAL
1114	4	2,828154021	0,308130129	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,TAL
1115	4	0,203360099	0,247321495	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,TKT1
1116	4	2,117903686	0,331070152	ADHEr,LDH_D,NADH6,TKT1
1117	4	0,34884992	0,271004016	ADHEr,LDH_D,PPCK,TKT1
1118	4	2,828154021	0,308130129	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,TKT1
1119	5	3,948360602	0,222825522	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,TKT2
1120	5	3,966967048	0,182343827	ADHEr,ASPT,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH
1121	5	3,752898719	0,126622688	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2
1122	5	4,408716092	0,258053531	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
1123	5	6,415221004	0,039824926	ADHEr,FADH4,LDH-D,MDH,THD2 y/o GLUDy
1124	5	2,983060356	0,241650921	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TKT2
1125	5	2,997718029	0,231538695	ADHEr,FUM,LDH_D,THD2 y/o GLUDy,TKT2

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
1126	5	2,937396425	0,227071464	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
1127	5	3,001461104	0,190330107	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
1128	5	2,935886887	0,22793719	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
1129	5	3,081083028	0,144666606	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
1130	5	2,988449413	0,197792365	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PRO1z,THD2 y/o GLUDy
1131	5	2,948350239	0,234817401	ADHEr,FUM,LDH_D,TAL,THD2 y/o GLUDy
1132	5	3,101419157	0,133003752	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
1133	5	2,948350239	0,234817401	ADHEr,FUM,LDH_D,THD2 y/o GLUDy,TKT1
1134	5	2,983060356	0,241650921	ADHEr,LDH D,MDH,PPCK,TKT2
1135	5	2,916137696	0,239263432	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,ME2
1136	5	3,711787388	0,165696592	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK y/o FBA y/o TPI,TKT2
1137	5	3,457829994	0,311699463	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,TKT2
1138	5	3,451407023	0,315392099	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TKT2
1139	5	3,543757983	0,262298527	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TKT2
1140	5	3,445461549	0,265025086	ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,NADH6
1141	5	3,609567252	0,224464061	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TKT2
1142	5	3,691174432	0,166626529	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK y/o FBA y/o TPI,RPE
1143	5	3,065706296	0,153485225	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI
1144	5	3,071383178	0,15022951	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PFK y/o FBA y/o TPI
1145	5	5,367175665	0,178044995	ADHEr,CBMK2,HEX1,LDH_D,PGI
1146	5	5,888703714	0,106589745	ADHEr,EDA y/o PGDHY,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PGI
1147	5	3,110919215	0,148780301	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PGI
1148	5	2,958795095	0,242498072	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,RPE
1149	5	2,958795095	0,242498072	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,RPE
1150	5	2,936051582	0,257223558	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,RPE

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
1151	5	3,418935049	0,313512999	ADHEr,FUM, LDH_D,NADH6,RPE
1152	5	3,413158878	0,316629525	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE
1153	5	2,967063614	0,237144547	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,RPE
1154	5	3,018085814	0,204109778	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,RPE
1155	5	3,009552774	0,185689501	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,PPCK
1156	5	3,009552774	0,185689501	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PPCK
1157	5	2,991038247	0,23614703	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,TKT2
1158	5	2,961772661	0,256337155	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,TKT2
1159	5	3,106778446	0,151550201	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,PGI
1160	5	3,04583421	0,164881948	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,PYK
1161	5	3,038870487	0,203147899	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,TKT2
1162	5	3,886386663	0,225053566	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,TAL
1163	5	3,670328799	0,167566962	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK y/o FBA y/o TPI,TAL
1164	5	3,480501908	0,264053132	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
1165	5	3,554829627	0,226273464	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
1166	5	2,942885577	0,238150528	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,TAL
1167	5	2,99710338	0,20508081	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,TAL
1168	5	3,964901837	0,267840742	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
1169	5	3,00074032	0,229453637	ADHEr,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy,TKT2
1170	5	4,557091208	0,201359081	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,THD2 y/o GLUDy
1171	5	2,935925119	0,227915263	ADHEr,LDH_D,MDH,PGDH,THD2 y/o GLUDy
1172	5	2,97971305	0,22895456	ADHEr,LDH_D,MDH,RPE,THD2 y/o GLUDy
1173	5	2,958777052	0,228457649	ADHEr,LDH_D,MDH,TAL,THD2 y/o GLUDy
1174	5	3,886386663	0,225053566	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,TKT1
1175	5	2,934359102	0,243351183	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TKT1

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	6ACA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
1176	5	2,934359102	0,243351183	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,TKT1
1177	5	3,670328799	0,167566962	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK y/o FBA y/o TPI,TKT1
1178	5	3,379584856	0,31534776	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,TKT1
1179	5	3,374609422	0,317876699	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TKT1
1180	5	3,480501908	0,264053132	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TKT1
1181	5	3,554829627	0,226273464	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TKT1
1182	5	2,942885577	0,238150528	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,TKT1
1183	5	2,99710338	0,20508081	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,TKT1
1184	5	2,958777052	0,228457649	ADHEr,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy,TKT1

Tabla 15. Diseños de cepas con inactivación para el aumento de la producción de adipato, mostrando los rendimientos de adipato y biomasa.

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
1	3	5,47908	0,34054	ADHEr,LDH_D,NADH6
2	3	4,26684	0,28031	ADHEr,LDH_D,PPCK
3	3	2,76166	0,38773	ADHEr,ATPS4r,LDH_D
4	3	1,54669	0,25966	ADIIEr,LDII_D,PGI
5	3	1,33726	0,37808	ADHEr,FUM,LDH_D
6	3	0,83242	0,38953	ADHEr,HEX1,LDH_D
7	4	7,52636	0,16586	ADHEr.HEX1,LDH_D,PGI
8	4	6,84269	0,27849	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi
9	4	6,5702	0,20631	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH
10	4	6,16994	0,16614	ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI
11	4	6,0882	0,30766	ADHEr,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
12	4	5,87407	0,22728	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
13	4	5,68406	0,28176	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6
14	4	5,62555	0,33704	ADHEr,LDH_D,NADH6,RPE
15	4	5,60596	0,30416	ADHEr,LDH_D,NADH6,THD2 y/o GLUDy
16	4	5,55606	0,3387	ADHEr,LDH_D,NADH6,TAL
17	4	5,54557	0,32148	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6
18	4	5,16028	0,24175	ADHEr,LDH_D,PFLi,PPCK
19	4	4,91511	0,27067	ADHEr,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
20	4	4,3568	0,24592	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PPCK
21	4	4,35358	0,27902	ADHEr,LDH_D,PPCK,RPE
22	4	4,34095	0,25198	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK
23	4	4,34095	0,25198	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK
24	4	4,28493	0,2734	ADHEr,FUM,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
25	4	4,0889	0,34834	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D
26	4	3,25969	0,38161	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,RPE
27	4	3,18007	0,37054	ADHEr,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
28	4	3,11658	0,34524	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
29	4	3,02411	0,3845	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TAL
30	4	1,1506	0,38695	ADHEr,HEX1,LDH_D,RPE
31	4	0,99936	0,38818	ADHEr,HEX1,LDH_D,TAL
32	5	7,63281	0,14897	ADHEr,HEX1,LDH_D,PG1,THD2 y/o GLUDy
33	5	7,60368	0,23979	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6
34	5	7,25714	0,17876	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
35	5	7,21061	0,18996	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
36	5	7,21061	0,18996	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK
37	5	7,11676	0,21254	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
38	5	7,10568	0,21521	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,THD2 y/o GLUDy
39	5	6,9706	0,24771	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
40	5	6,90675	0,27577	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE
41	5	6,83498	0,1681	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH
42	5	6,80758	0,29402	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,TAL
43	5	6,79015	0,29114	ADHEr,A TPS4r,LDH_D,MDH,PGDH
44	5	6,76743	0,17785	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
45	5	6,76201	0,23293	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
46	5	6,66991	0,23493	ADHEr,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
47	5	6,66754	0,2967	ADHEr,A TPS4r,LDH_D,MDH,RPE
48	5	6,57746	0,21333	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
49	5	6,34963	0,21785	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK
50	5	6,225	0,14772	ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 y/o GLUDy
51	5	6,18982	0,20058	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
52	5	6,18254	0,21218	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
53	5	6,18254	0,21218	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
54	5	5,99792	0,19177	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK
55	5	5,97051	0,22537	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
56	5	5,92744	0,32733	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6
57	5	5,92472	0,22627	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
58	5	5,81113	0,24533	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
59	5	5,80132	0,28014	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
60	5	5,74556	0,28091	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
61	5	5,74235	0,20973	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
62	5	5,73575	0,30136	ADHEr,LDH_D,NADH6,RPE,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
63	5	5,72421	0,22208	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK
64	5	5,72421	0,22208	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK
65	5	5,68542	0,31766	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,RPE
66	5	5,67414	0,30269	ADHEr,LDH_D,NADH6,TAL,THD2 y/o GLUDy
67	5	5,62871	0,29764	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6
68	5	5,61913	0,31947	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,TAL
69	5	5,56433	0,06187	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PGI
70	5	5,53618	0,32417	ADHEr.HEX1, LDH_D,NADH6,THD2 y/o GLUDy
71	5	5,36114	0,24084	ADHEr,LDH_D,PFLi,PPCK,RPE
72	5	5,35732	0,32317	ADHBr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D
73	5	5,29193	0,25262	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
74	5	5,26552	0,24127	ADHEr,LDH_D,PFLi,PPCK,TAL
75	5	5,23886	0,36027	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS
76	5	5,2123	0,3202	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi
77	5	5,20628	0,31113	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi
78	5	5,20628	0,31113	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi
79	5	5,00885	0,16853	ADHEr,A TPS4r,LDH_D,PFLi,PGI
80	5	4,73325	0,11896	ADHEr,LDH_D,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
81	5	4,71871	0,12544	ADHEr,LDH_D,MDH,PGI,THD2 y/o GLUDy
82	5	4,71871	0,12544	ADHEr,FUM,LDH_D,PGI,THD2 y/o GLUDy
83	5	4,46543	0,20438	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
84	5	4,45303	0,23609	ADHEr,LDH_D,MDH,RPE,THD2 y/o GLUDy
85	5	4,44799	0,21105	ADHEr,LDH_D,MDH,PYK,THD2 y/o GLUDy
86	5	4,43313	0,21674	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK
87	5	4,43313	0,21674	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
88	5	4,43289	0,24479	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PPCK,RPE
89	5	4,42239	0,22084	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
90	5	4,4202	0,25027	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,RPE
91	5	4,4202	0,25027	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,RPE
92	5	4,41922	0,25069	ADHEr,LDH_D,PPCK,RPE,THD2 y/o GLUDy
93	5	4,41348	0,22425	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,PYK
94	5	4,41348	0,22425	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,PYK
95	5	4,3742	0,27012	ADHEr,FUM,LDH_D,RPE,THD2 y/o GLUDy
96	5	4,34566	0,25018	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
97	5	4,22695	0,31979	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH
98	5	4,21297	0,36989	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
99	5	4,19799	0,34618	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,RPE
100	5	4,15986	0,32121	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
101	5	4,14613	0,34721	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TAL
102	5	4,14548	0,36885	ADHEr,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 y/o GLUDy
103	5	4,09366	0,36854	ADHEr,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 y/o GLUDy
104	5	4,03694	0,36821	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,THD2 y/o GLUDy
105	5	4,03694	0,36821	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGDH,THD2 y/o GLUDy
106	5	3,55579	0,34037	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,RPE,THD2 y/o GLUDy
107	5	3,35244	0,11579	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPS,THD2 y/o GLUDy
108	5	3,34785	0,34268	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TAL,THD2 y/o GLUDy
109	5	2,86477	0,08801	ADHEr,EDA y/o PGDHY,FUM,LDH_D,PGI
110	5	1,41816	0,36252	ADHEr,FUM,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,TAL
111	5	1,41816	0,36252	ADHEr,FUM,LDH_D,PGDH,TAL
112	6	8,40974	0,12863	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
113	6	8,3656	0,13555	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
114	6	8,3656	0,13555	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
115	6	8,30583	0,11621	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
116	6	8,24494	0,15445	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
117	6	7,99084	0,19426	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
118	6	7,9508	0,20053	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
119	6	7,92831	0,12763	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
120	6	7,91305	0,13531	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
121	6	7,91305	0,13531	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK
122	6	7,87012	0,02274	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
123	6	7,7587	0,21695	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 y/o GLUDy
124	6	7,75003	0,03607	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGI,THD2 y/o GLUDy
125	6	7,74149	0,21948	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6
126	6	7,7368	0,0672	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
127	6	7,72197	0,07098	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,THD2 y/o GLUDy
128	6	7,72197	0,07098	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,THD2 y/o GLUDy
129	6	7,67273	0,08355	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,THD2 y/o GLUDy
130	6	7,64843	0,19881	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
131	6	7,61824	0,14232	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
132	6	7,60825	0,2542	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2 y/o GLUDy
133	6	7,5467	0,16899	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
134	6	7,48349	0,12429	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
135	6	7,4685	0,07894	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy,PYK
136	6	7,4685	0,07894	ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PYK
137	6	7,44298	0,08037	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
138	6	7,40415	0,13677	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
139	6	7,4	0,14438	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
140	6	7,36241	0,15343	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
141	6	7,36241	0,15343	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK
142	6	7,27527	0,1744	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,THD2 y/o GLUDy
143	6	7,27448	0,17459	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
144	6	7,24864	0,17893	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy,THD2 y/o GLUDy
145	6	7,24278	0,26146	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
146	6	7,20895	0,28496	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2 y/o GLUDy
147	6	7,18819	0,12101	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK,THD2 y/o GLUDy
148	6	7,17088	0,20914	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,RPE,THD2 y/o GLUDy
149	6	7,15564	0,2082	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,TAL,THD2 y/o GLUDy
150	6	7,1458	0,12325	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
151	6	7,13909	0,20717	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,THD2 y/o GLUDy
152	6	7,12504	0,22071	ADHEr,LDH_D,PFLi,PPCK,RPE,THD2 y/o GLUDy
153	6	7,10894	0,21971	ADHEr,LDH_D,PFLi,PPCK,TAL,THD2 y/o GLUDy
154	6	7,09146	0,21863	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGL y/o G6PDHy,PPCK,THD2 y/o GLUDy
155	6	7,09146	0,21863	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
156	6	7,0863	0,31638	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,THD2 y/o GLUDy
157	6	7,06893	0,22405	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
158	6	7,054	0,1365	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
159	6	7,02653	0,24555	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE,THD2 y/o GLUDy
160	6	6,99568	0,14491	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
161	6	6,92353	0,16046	ADHEr,ASPT,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
162	6	6,90243	0,27063	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,TAL
163	6	6,8314	0,18819	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy,PPCK
164	6	6,79251	0,30763	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi
165	6	6,70257	0,21085	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGL y/o G6PDHy,PPCK
166	6	6,70257	0,21085	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGDH,PPCK
167	6	6,66743	0,21154	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
168	6	6,63518	0,21218	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
169	6	6,48093	0,19172	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,PPCK
170	6	6,48093	0,19172	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PGDH,PPCK
171	6	6,44865	0,19659	ADHEr,A TPS4r,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK
172	6	6,44275	0,19249	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,TAL
173	6	6,40767	0,1932	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,RPE
174	6	6,33204	0,06396	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
175	6	6,28774	0,02127	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PGI,THD2 y/o GLUDy
176	6	6,27764	0,32432	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PGL y/o G6PDHy
177	6	6,27764	0,32432	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PGDH
178	6	6,21873	0,32483	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL
179	6	6,16484	0,32529	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE
180	6	6,12301	0,15589	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PYK,THD2 y/o GLUDy
181	6	6,09151	0,3086	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 y/o GLUDy
182	6	6,08785	0,16598	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK
183	6	6,08785	0,16598	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,PYK
184	6	6,07929	0,19015	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
185	6	6,0681	0,17164	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
186	6	6,04302	0,20189	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE,THD2 y/o GLUDy
187	6	6,01911	0,18569	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK
188	6	6,01911	0,18569	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PPCK
189	6	5,98595	0,1952	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,THD2 y/o GLUDy
190	6	5,93003	0,21123	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,THD2 y/o GLUDy
191	6	5,91322	0,24391	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
192	6	5,89537	0,30664	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi
193	6	5,86467	0,24459	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
194	6	5,8616	0,12855	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
195	6	5,8616	0,12855	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
196	6	5,75652	0,29464	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE
197	6	5,71417	0,25845	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy,PPS
198	6	5,69588	0,29606	ADHEr,FUM,HEX1 ,LDH_D,NADH6,TAL
199	6	5,53662	0,35787	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,RPE
200	6	5,4724	0,31504	ADHEr,ATPS4r,HEX1 ,LDH_D,PFLi,RPE
201	6	5,46402	0,30945	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,RPE
202	6	5,46402	0,30945	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,RPE
203	6	5,39509	0,35901	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,TAL
204	6	5,34939	0,31748	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,TAL
205	6	5,34143	0,31025	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,TAL
206	6	5,34143	0,31025	ADHEr,FUM,HEX1 ,LDH_D,PFLi,TAL
207	6	5,07203	0,20521	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,PGI
208	6	5,07203	0,20521	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI
209	6	5,04668	0,20656	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,TAL
210	6	5,04668	0,20656	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,TAL

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
211	6	5,02327	0,2078	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,RPE
212	6	5,02327	0,2078	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,RPE
213	6	4,96889	0,09918	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
214	6	4,92469	0,33322	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,PPS,THD2 y/o GLUDy
215	6	4,92469	0,33322	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS,THD2 y/o GLUDy
216	6	4,8531	0,05616	ADHEr,LDH_D,MDH,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
217	6	4,8531	0,05616	ADHEr,FUM,LDH_D,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
218	6	4,80931	0,34014	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,TAL,THD2 y/o GLUDy
219	6	4,69982	0,3467	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,RPE,THD2 y/o GLUDy
220	6	4,69121	0,11806	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
221	6	4,64152	0,13706	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
222	6	4,64152	0,13706	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
223	6	4,6299	0,1415	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,PYK,THD2 y/o GLUDy
224	6	4,6299	0,1415	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,PYK,THD2 y/o GLUDy
225	6	4,60999	0,16834	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,RPE,THD2 y/o GLUDy
226	6	4,60999	0,16834	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,RPE,THD2 y/o GLUDy
227	6	4,52953	0,20307	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,RPB,THD2 y/o GLUDy
228	6	4,5125	0,21043	ADHEr,LDH_D,MDH,PYK,RPE,THD2 y/o GLUDy
229	6	4,50129	0,21526	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,RPE
230	6	4,50129	0,21526	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK,RPE
231	6	4,49048	0,21993	ADHEr,GLCpls,LDH_D,PPCK,RPE,THD2 y/o GLUDy
232	6	4,48211	0,22354	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,PYK,RPE
233	6	4,48211	0,22354	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,PYK,RPE
234	6	4,42882	0,24654	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,RPE,THD2 y/o GLUDy
235	6	4,36373	0,24327	ADHEr,FUM,GLUDy,HEX 1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
236	6	4,35757	0,26123	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 y/o GLUDy
237	6	4,31718	0,27765	ADHEr,ASNS2,GLU5K,LDH_D,PPCK,TAL
238	6	4,31718	0,27765	ADHEr,ASNS2,G5SD,LDH_D,PPCK,TAL
239	6	4,2573	0,32058	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 y/o GLUDy
240	6	4,22017	0,33524	ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 y/o GLUDy
241	6	4,17617	0,33499	ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 y/o GLUDy
242	6	4,12454	0,33472	ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,PGDH,THD2 y/o GLUDy
243	6	4,12454	0,33472	ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,THD2 y/o GLUDy
244	6	3,51205	0,21436	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPS,THD2 y/o GLUDy
245	6	3,23372	0,26787	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
246	6	2,95584	0,24016	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,PPS
247	6	2,95584	0,24016	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,PPS
248	7	9,10608	0,01953	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
249	7	9,10608	0,01953	ADHEr,FUM,GLUDy,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
250	7	9,00855	0,03482	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
251	7	8,9957	0,03683	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
252	7	8,9957	0,03683	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
253	7	8,98751	0,03811	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI,THD2 y/o GLUDy
254	7	8,98549	0,03843	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
255	7	8,78817	0,06934	ADHEr,ATPS4r,GLUDy,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
256	7	8,78695	0,06953	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH,THD2 y/o GLUDy
257	7	8,78371	0,07004	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,TAL,THD2 y/o GLUDy
258	7	8,78071	0,07051	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,RPE,THD2 y/o GLUDy
259	7	8,7615	0,07352	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
260	7	8,7615	0,07352	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
261	7	8,5647	0,10435	ADHEr, GLUDy, HEX1, LDH_D, MDH, PFLi, THD2 y/o GLUDy
262	7	8,54703	0,10712	ADHEr, GLCpts, GLUDy, LDH_D, MDH, PFLi, THD2 y/o GLUDy
263	7	8,53424	0,10913	ADHEr, HEX1, LDH_D, MDH, PFLi, PPCK, THD2 y/o GLUDy
264	7	8,53424	0,10913	ADHEr, FUM, HEX1, LDH_D, PFLi, PPCK, THD2 y/o GLUDy
265	7	8,50919	0,10634	ACKr y/o PTAr, ADHEr, LDH_D, MDH, NADH12, NADH6, THD2 y/o GLUDy
266	7	8,50798	0,11324	ADHEr, FUM, GLCpts, LDH_D, PFLi, PPCK, THD2 y/o GLUDy
267	7	8,50798	0,11324	ADHEr, GLCpts, LDH_D, MDH, PFLi, PPCK, THD2 y/o GLUDy
268	7	8,43629	0,12447	ADHEr, HEX1, LDH_D, MDH, NADH6, PFLi, THD2 y/o GLUDy
269	7	8,38405	0,13266	ADHEr, GLCpts, LDH_D, MDH, NADH6, PFLi, THD2 y/o GLUDy
270	7	8,37888	0,03978	ADHEr, LDH_D, NADH12, NADH6, PFLi, PPCK, THD2 y/o GLUDy
271	7	8,29239	0,14702	ADHEr, ATPS4r, HEX1, LDH_D, MDH, PFLi, THD2 y/o GLUDy
272	7	8,27109	0,10802	ADHEr, ATPS4r, GLUDy, LDH_D, MDH, NADH6, THD2 y/o GLUDy
273	7	8,25238	0,15328	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, MDH, NADH12, PFLi, THD2 y/o GLUDy
274	7	8,24277	0,01559	ACKr y/o PTAr, ADHEr, ATPS4r, LDH_D, NADH6, PGI, THD2 y/o GLUDy
275	7	8,13676	0,03579	ADHEr, ATPS4r, GLCpts, LDH_D, MDH, NADH6, THD2 y/o GLUDy
276	7	8,112	0,11376	ADHEr, ATPS4r, FUM, LDH_D, NADH6, PPCK, THD2 y/o GLUDy
277	7	8,112	0,11376	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, MDH, NADH6, PPCK, THD2 y/o GLUDy
278	7	8,02815	0,13154	ADHEr, ATPS4r, GLCpts, LDH_D, MDH, PFLi, THD2 y/o GLUDy
279	7	8,00984	0,13929	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, NADH12, PFLi, PPCK, THD2 y/o GLUDy
280	7	8,0064	0,13951	ADHEr, ATPS4r, FUM, GLCpts, LDH_D, PFLi, PPCK
281	7	8,0064	0,13951	ADHEr, ATPS4r, GLCpts, LDH_D, MDH, PFLi, PPCK
282	7	7,98007	0,18432	ADHEr, HEX1, LDH_D, MDH, NADH12, NADH6, THD2 y/o GLUDy
283	7	7,97463	0,15783	ADHEr, ATPS4r, EDA y/o PGDHY, LDH_D, MDH, NADH6, THD2

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
				y/o GLUDy
284	7	7,90344	0,19562	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 y/o GLUDy
285	7	7,89808	0,01471	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PGI,THD2 y/o GLUDy
286	7	7,89024	0,02802	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
287	7	7,88378	0,02967	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,THD2 y/o GLUDy
288	7	7,88242	0,11605	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 y/o GLUDy
289	7	7,87634	0,01837	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PGL y/o G6PDHy,PYK
290	7	7,87634	0,01837	ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PYK
291	7	7,84906	0,21647	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH12,PFLi,THD2 y/o GLUDy
292	7	7,84582	0,02225	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
293	7	7,81872	0,2081	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PPS
294	7	7,7627	0,0571	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,PYK,THD2 y/o GLUDy
295	7	7,7627	0,0571	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK,PYK,THD2 y/o GLUDy
296	7	7,76232	0,02662	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
297	7	7,74907	0,0281	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 y/o GLUDy
298	7	7,74444	0,06699	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
299	7	7,71368	0,10674	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
300	7	7,69617	0,04384	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
301	7	7,69209	0,0741	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PYK,THD2 y/o GLUDy
302	7	7,61698	0,05527	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,PYK,THD2 y/o GLUDy
303	7	7,58851	0,09902	ADHEr,FUM,HEX1 ,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
304	7	7,55893	0,07788	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,RPE,THD2 y/o GLUDy
305	7	7,55773	0,07778	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,TAL,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
306	7	7,55641	0,07767	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,PGDH,THD2 y/o GLUDy
307	7	7,55604	0,07774	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
308	7	7,52827	0,18666	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,PPS
309	7	7,5043	0,12303	ACKr y/o PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PGDH,THD2 y/o GLUDy
310	7	7,50321	0,07168	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
311	7	7,50183	0,1239	ACKr y/o PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,TAL,THD2 y/o GLUDy
312	7	7,49954	0,12472	ACKr y/o PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,RPE,THD2 y/o GLUDy
313	7	7,44132	0,08061	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
314	7	7,43036	0,11712	ADHEr,EDA y/o PGDHY,GLUDy,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
315	7	7,38132	0,14888	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PRO1z,THD2 y/o GLUDy
316	7	7,37291	0,17014	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLU Dy
317	7	7,37059	0,09082	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
318	7	7,3166	0,16445	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
319	7	7,2905	0,10237	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
320	7	7,24864	0,17893	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PGDH,THD2 y/o GLUDy
321	7	7,2288	0,11128	ADHEr,ASPT,GLUDy,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
322	7	7,22725	0,1115	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 y/o GLUDy
323	7	7,21589	0,1796	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,TAL,THD2 y/o GLUDy
324	7	7,21263	0,18991	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PPCK,TAL
325	7	7,20753	0,1999	ADHEr,GLUDy,LDH_D,PFLi,PPCK,RPE,THD2 y/o GLUDy
326	7	7,20507	0,13919	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
327	7	7,20507	0,13919	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,PPS,THD2 y/o GLUDy
328	7	7,20053	0,0557	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
329	7	7,20053	0,0557	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
330	7	7,19596	0,14141	ADHEr,FUM,HEX1 ,LDH_D,PPS,TAL,THD2 y/o GLUDy
331	7	7,19261	0,19908	ADHEr,GLUDy,LDH_D,PFLi,PPCK,TAL,THD2 y/o GLUDy
332	7	7,18739	0,14349	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,RPE,THD2 y/o GLUDy
333	7	7,18582	0,18022	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,RPE,THD2 y/o GLUDy
334	7	7,18081	0,1906	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PPCK,RPE
335	7	7,17639	0,19819	ADHEr,GLUDy,LDH_D,PFLi,PGDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
336	7	7,17639	0,19819	ADHEr,GLUDy,LDH_D,PFLi,PGL y/o G6PDHy,PPCK,THD2 y/o GLUDy
337	7	7,15844	0,21228	ADHEr,FUM,GLU5K,LDH_D,PFLi,RPE,THD2 y/o GLUDy
338	7	7,15844	0,21228	ADHEr,FUM,G5SD,LDH_D,PFLi,RPE,THD2 y/o GLUDy
339	7	7,15832	0,21231	ADHEr,ASNS2,FUM,LDH_D,PFLi,RPE,THD2 y/o GLUDy
340	7	7,15023	0,12261	ADHEr,ASPT,GLUDy,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
341	7	7,14754	0,30973	ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,THD2 y/o GLUDy
342	7	7,12499	0,05298	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLU Dy
343	7	7,12287	0,13074	ADHEr,ASPT,GLCpts,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
344	7	7,12019	0,22193	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,RPE,THD2 y/o GLUDy
345	7	7,11351	0,16642	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
346	7	6,91657	0,2887	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PGDH,PPS
347	7	6,89939	0,23701	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy,PPS
348	7	6,89939	0,23701	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MALS,MDH,PGL y/o G6PDHy,PPS
349	7	6,89939	0,23701	ADHEr,ATPS4r,ICL,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy,PPS

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
350	7	6,84379	0,18963	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDv
351	7	6,75658	0,30629	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,RPE
352	7	6,62545	0,08375	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
353	7	6,61503	0,30219	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,TAL
354	7	6,5251	0,02706	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
355	7	6,50064	0,04761	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
356	7	6,49117	0,05032	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 y/o GLUDy
357	7	6,49117	0,05032	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PGI,THD2 y/o GLUDy
358	7	6,46411	0,29781	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,PPS
359	7	6,46411	0,29781	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS
360	7	6,37646	0,08322	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
361	7	6,37646	0,08322	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
362	7	6,33505	0,15513	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PGDH,PGI
363	7	6,30836	0,31643	ADHEr,HEX1,LDH_D,MALS,PGL y/o G6PDHy,PPS,THD2 y/o GLUDy
364	7	6,30836	0,31643	ADHEr,HEX1,ICL,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,PPS,THD2 y/o GLUDy
365	7	6,30836	0,31643	ADHEr,HEX1,LDH_D,MALS,PGDH,PPS,THD2 y/o GLUDy
366	7	6,30836	0,31643	ADHEr,HEX1,ICL,LDH_D,PGDH,PPS,THD2 y/o GLUDy
367	7	6,29139	0,03885	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
368	7	6,27848	0,32143	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PPS,THD2 y/o GLUDy
369	7	6,27504	0,1561	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDhH_D,NADH6,PGI,TAL
370	7	6,19234	0,13601	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_ D,MDH,NADH6,PYK,THD2 y/o GLUDy
371	7	6,19234	0,13601	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGL y/o G6PDHy,PYK,THD2 y/o

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
				GLUDy
372	7	6,18835	0,15484	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PYK,RPE,THD2 y/o GLUDy
373	7	6,16073	0,14508	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,PYK
374	7	6,16073	0,14508	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGL y/o G6PDHy,PPCK,PYK
375	7	6,15763	0,16479	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK,RPE
376	7	6,15763	0,16479	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,PYK,RPE
377	7	6,14691	0,14904	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PPCK
378	7	6,14691	0,14904	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK
379	7	6,14046	0,17035	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE,THD2 y/o GLUDy
380	7	6,13285	0,17281	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,RPE,THD2 y/o GLUDy
381	7	6,09969	0,18355	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK,RPE
382	7	6,09969	0,18355	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PPCK,RPE
383	7	6,07495	0,19156	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,RPE,THD2 y/o GLUDy
384	7	6,02503	0,20772	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,RPE,THD2 y/o GLUDy
385	7	5,9952	0,19254	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,THD2 y/o GLUDy
386	7	5,9868	0,32178	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PPS,THD2 y/o GLUDy
387	7	5,98012	0,20938	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,TAL,THD2 y/o GLUDy
388	7	5,94711	0,3261	ADHEr,HEX1,ICL,LDH_D,PPS,TAL,THD2 y/o GLUDy
389	7	5,94711	0,3261	ADHEr,HEX1,LDH_D,MALS,PPS,TAL,THD2 y/o GLUDy
390	7	5,93766	0,22464	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH12,THD2 y/o GLUDy
391	7	5,84213	0,21172	ACKr y/o PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,THD2 y/o GLUDy
392	7	5,77732	0,09217	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PGDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
393	7	5,77732	0,09217	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PGL y/o G6PDFv,PPCK,THD2 y/o GLUDy
394	7	5,7407	0,18622	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,NADH6,THD2

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
				y/o GLUDy
395	7	5,72608	0,09261	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH-D,PPCK,TAL,THD2 y/o GLUDy
396	7	5,67891	0,09302	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH-D,PPCK,RPE,THD2 y/o GLUDy
397	7	5,62569	0,20722	ACKr y/o PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL,THD2 y/o GLUDy
398	7	5,60804	0,32285	ADHEr,GLU5K,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL,THD2 y/o GLUDy
399	7	5,60804	0,32285	ADHEr,G5SD,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL,THD2 y/o GLUDy
400	7	5,60791	0,32289	ADHEr,ASNS2,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL,THD2 y/o GLUDy
401	7	5,59783	0,33545	ADHEr,HEX1,ICL,LDH_D,PPS,RPE,THD2 y/o GLUDy
402	7	5,59783	0,33545	ADHEr,HEX1,LDH_D,MALS ,PPS ,RPE,THD2 y/o GLUDy
403	7	5,58104	0,23062	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PGL y/o G6PDHv,THD2 y/o GLUDy
404	7	5,58104	0,23062	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PGDH,THD2 y/o GLUDy
405	7	5,35846	0,23124	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 y/o GLUDy
406	7	5,27565	0,07793	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PPCK,PYK,THD2 y/o GLUDy
407	7	5,19178	0,1965	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI,TAL
408	7	5,19178	0,1965	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,PGI,TAL
409	7	5,16412	0,3061	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,PPS,TAL,THD2 y/o GLUDy
410	7	5,16412	0,3061	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS,TAL,THD2 y/o GLUDy
411	7	5,15646	0,16031	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI,TAL
412	7	5,14711	0,23182	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 y/o GLUDy
413	7	5,06593	0,18784	ADHEr,LDH-D,PFLi,PGDH,PGI,PPS,THD2 y/o GLUDy
414	7	5,06354	0,16677	ADHEr,ATPS4r,GLYCL,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI
415	7	5,04267	0,18882	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPS,TAL,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
416	7	5,02125	0,18972	ADHEr,LDH-D,PFLi,PGI,PPS,RPE,THD2 y/o GLUDy
417	7	4,56087	0,18955	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 y/o GLUDy
418	7	4,53442	0,18932	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 y/o GLUDy
419	7	4,50549	0,18907	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,THD2 y/o GLUDy
420	7	4,50549	0,18907	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PGDH,THD2 y/o GLUDy
421	7	4,43945	0,24195	ADHEr,FUM,GLUDy,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 y/o GLU Dy
422	7	4,33649	0,2698	ADHEr,ASNS2,FUM,G5SD,LDH_D,TAL,THD2 y/o GLUDy
423	7	4,33649	0,2698	ADHEr,ASNS2,FUM,GLU5K,LDH_D,TAL,THD2 y/o CLUDy
424	7	3,82299	0,23376	ACKr y/o PTAr,ADHEr,CITL,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 y/o GLUDy
425	7	3,40957	0,10927	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PGDH,PPS,TAL,THD2 y/o GLUDy
426	7	3,40957	0,10927	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,PPS,TAL,THD2 y/o GLUDy
427	7	3,30702	0,26731	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,TAL,THD2 y/o GLUDy
428	7	1,7546	0,28013	ACKr y/o PTAr,ADHEr,CITL,FUM,LDH_D,PPS,THD2 y/o GLUDy
429	7	0,1401	0,25687	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS
430	7	0,13962	0,25599	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL
431	7	0,13909	0,25503	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PGDH,SUCOAS
432	7	0,13909	0,25503	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy,SUCOAS
433	3	0,331362284	0,248770484	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI
434	3	4,1886916	0,310192487	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D
435	4	2,773932742	0,386261	ADHEr,ASNS2,ATPS4r,LDH_D
436	4	2,792658751	0,384018912	ADHEr,ATPS4r,CBMK2,LDH_D

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
437	4	5,490131382	0,33737393	ADHEr,CBMK2,LDH_D,NADH6
438	4	6,078666008	0,168610416	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK y/o FBA y/o TPI
440	4	0,406720198	0,247321495	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,TAL
441	4	0,406720198	0,247321495	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,TKT1
442	4	0,541935885	0,244721556	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,TKT2
443	4	4,227003016	0,295544651	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D
444	4	2,774411941	0,386203624	ADHEr,ATPS4r,G5SD,LDH_D
445	4	2,774411941	0,386203624	ADHEr,ATPS4r,GLU5K,LDH_D
446	4	2,552977098	0,152232967	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI
447	4	5,500068328	0,33452449	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6
448	4	4,226362219	0,295789651	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D
449	4	0,999358709	0,388175844	ADHEr,HEX1,LDH_D,TKT1
450	4	1,300899111	0,38573732	ADHEr,HEX1,LDH_D,TKT2
451	4	4,374206544	0,239263432	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH
452	4	4,29486095	0,269600115	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2
453	4	4,488943189	0,195395474	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK
454	4	4,312306765	0,279635371	ADHEr,LDH_D,PPCK,TAL
455	4	4,312306765	0,279635371	ADHEr,LDH_D,PPCK,TKT1
456	4	4,394666553	0,278410255	ADHEr,LDH_D,PPCK,TKT2
457	4	4,290442023	0,306273023	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,RPE
458	4	4,242231032	0,308130129	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,TAL
459	4	3,02411229	0,384504476	ADHEr,ATPS4r,LDH_D, TKT1
460	4	5,556064858	0,338701395	ADHEr,LDH_D,NADH6,TKT1
461	4	4,242231032	0,308130129	ADHEr, FRD y/o SUCD4,LDH_D,TKT1
462	4	3,491738883	0,378757536	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TKT2

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
463	4	5,694356782	0,335394947	ADHEr,LDH_D,NADH6,TKT2
464	4	4,338075359	0,30443817	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,TKT2
465	5	3,269904021	0,380186443	ADHEr,ASNS2,ATPS4r,LDH_D,RPE
466	5	3,035292503	0,383059918	ADHEr,ASNS2,ATPS4r,LDH_D,TAL
467	5	2,786583612	0,384746295	ADHEr,ASNS2,ATPS4r,GLU5K,LDH_D
468	5	3,035292503	0,383059918	ADHEr,ASNS2,ATPS4r,LDH_D,TKT1
469	5	4,891772757	0,345085032	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,ME2,THD2 y/o GLUDy
470	5	4,906959994	0,170872463	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,PFLi
471	5	2,80469336	0,382577993	ADHEr,ASNS2,ATPS4r,CBMK2,LDH_D
472	5	4,199370617	0,306109514	ADHEr,ASNS2,CBMK2,FRD y/o SUCD4,LDH_D
473	5	3,285503322	0,378014123	ADHEr,ATPS4r,CBMK2,LDH_D,RPE
474	5	3,052359629	0,380854732	ADHEr, ATPS4r,CBMK2,LDH_D,TAL
475	5	2,805163465	0,382521707	ADHEr, ATPS4r,CBMK2,G5SD,LDH_D
476	5	4,199487305	0,3060649	ADHEr,CBMK2,FRD y/o SUCD4,G5SD,LDH_D
477	5	2,805163465	0,382521707	ADHEr,A TPS4r,CBMK2,GLU5K,LDH_D
478	5	4,199487305	0,3060649	ADHEr,CBMK2,FRD y/o SUCD4,GLU5K,LDH_D
479	5	5,566341358	0,335567361	ADHEr,CBMK2,LDH_D,NADH6,TAL
480	5	6,853869476	0,27580388	ADHEr,CBMK2,LDH_D,NADH6,PFLi
481	5	3,052359629	0,380854732	ADHEr,ATPS4r,CBMK2,LDH_D,TKT1
482	5	5,566341358	0,335567361	ADHEr,CBMK2,LDH_D,NADH6,TKT1
483	5	3,515194954	0,375215574	ADHEr,A TPS4r,CBMK2,LDH_D,TKT2
484	5	4,886253722	0,208900511	ADHEr,LDH_D,MDH,PFK y/o FBA y/o TPI,PFLi
485	5	4,621960711	0,144538077	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PFK y/o FBA y/o TPI
486	5	6,151957387	0,166626529	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK y/o FBA y/o TPI,RPE
487	5	6,117214665	0,167566962	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK y/o FBA y/o TPI,TAL

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
488	5	0,436376298	0,238196669	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,PGDH,TAL
489	5	6,117214665	0,167566962	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK y/o FBA y/o TPI,TKT1
490	5	0,436376298	0,238196669	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,PGDH,TKT1
491	5	6,186312313	0,165696592	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK y/o FBA y/o TPI,TKT2
492	5	5,556162772	0,318439293	ADHEr,CBMK2,FUM,LDH_D,NADH6
493	5	4,886253722	0,208900511	ADHEr,FUM,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,PFLi
494	5	4,613740943	0,14768079	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI
495	5	6,088195155	0,307660476	ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,THD2 y/o GLUDy
496	5	5,684064939	0,281763084	ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,NADH6
497	5	4,673184878	0,145745102	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,PGI
498	5	4,572772914	0,163344346	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,PPCK
499	5	4,382533025	0,251079405	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TAL
500	5	4,382533025	0,251079405	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TKT1
501	5	4,457618973	0,24945663	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TKT2
502	5	4,374206544	0,239263432	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,ME2
503	5	4,324805294	0,29144049	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,RPE
504	5	4,278495915	0,29338381	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,TAL
505	5	5,619129051	0,319468644	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,TKT1
506	5	1,418161594	0,362515745	ADHEr,FUM,LDH_D,PGDH,TKT1
507	5	1,418161594	0,362515745	ADHEr,FUM,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,TKT1
508	5	4,278495915	0,29338381	ADHEr, FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,TKT1
509	5	5,750964716	0,315868237	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,TKT2
510	5	4,370505222	0,289522745	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,TKT2
511	5	2,786583612	0,384746295	ADHEr,ASNS2,ATPS4r,G5SD,LDH_D
512	5	3,270303172	0,380130859	ADHEr,ATPS4r,G5SD,LDH_D,RPE

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
513	5	3,035729231	0,38300349	ADHEr,ATPS4r,G5SD,LDH_D,TAL
514	5	3,035729231	0,38300349	ADHEr,ATPS4r,G5SD,LDH_D,TKT1
515	5	3,270303172	0,380130859	ADHEr,ATPS4r,GLU5K,LDH_D,RPE
516	5	3,035729231	0,38300349	ADHEr,ATPS4r,GLU5K,LDH_D,TAL
517	5	4,101998016	0,149473222	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI
518	5	5,510369128	0,331570715	ADHEr,CBMK2,HEX1,LDH_D,NADH6
519	5	3,359019108	0,150796918	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFK y/o FBA y/o TPI
520	5	4,301255739	0,267155156	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,HEX1,LDH_D
521	5	4,146125845	0,347209192	ADHEr,FUM,HEX1 ,LDH_D,TKT1
522	5	4,24954345	0,345156537	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TKT2
523	5	5,64062493	0,332159859	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE
524	5	5,573829893	0,333283574	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL
525	5	6,871954799	0,271451843	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
526	5	1,026318237	0,371585169	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGDH,TAL
527	5	1,026318237	0,371585169	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,TAL
528	5	4,321580803	0,292832307	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,RPE
529	5	4,27640137	0,294235511	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,TAL
530	5	4,292100506	0,270655532	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
531	5	5,573829893	0,333283574	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TKT1
532	5	1,026318237	0,371585169	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGDH,TKT1
533	5	1,026318237	0,371585169	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,TKT1
534	5	4,27640137	0,294235511	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,TKT1
535	5	4,093661719	0,368542577	ADHEr,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy,TKT1
536	5	5,706971061	0,331043695	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TKT2
537	5	4,366331362	0,291442423	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,TKT2

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
538	5	4,197378033	0,36914891	ADHEr,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy,TKT2
539	5	6,584217406	0,204283888	ADHEr,ASPT,CBMK2,LDH_D,MDH
540	5	4,679174494	0,143073998	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PGI
541	5	4,572772914	0,163344346	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PPCK
542	5	4,382533025	0,251079405	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,TAL
543	5	4,382533025	0,251079405	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,TKT1
544	5	4,457618973	0,24945663	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,TKT2
545	5	4,450595421	0,237144547	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,RPE
546	5	4,414328365	0,238150528	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,TAL
547	5	6,807575806	0,294019202	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,TKT1
548	5	5,745562276	0,280910173	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TKT1
549	5	4,414328365	0,238150528	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,TKT1
550	5	6,455745341	0,299423269	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,TKT2
551	5	5,856779801	0,27936769	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TKT2
552	5	4,486557371	0,23614703	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,TKT2
553	5	6,254106519	0,315300181	ADHEr,LDH_D,ME2,NADH6,THD2 y/o GLUDy
554	5	4,339242812	0,268682419	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,TAL
555	5	6,224794308	0,229694348	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,THD2 y/o GLUDy
556	5	6,876353164	0,277060587	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,TAL
557	5	7,122630133	0,211129547	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,PFLi
558	5	4,216706856	0,262624991	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PFLi,THD2 y/o GLUDy
559	5	5,563197905	0,034931763	ADHEr,EDA y/o PGDHY,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PGI
560	5	5,66839105	0,263566425	ADHEr,LDH_D,ME2,PGL y/o G6PDHy,THD2 y/o GLUDy
561	5	4,552158784	0,193305823	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,RPE
562	5	4,522175259	0,194296957	ADHEr, FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,TAL

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
563	5	5,924716044	0,226273464	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TKT1
564	5	5,265518204	0,241270472	ADHEr, LDH_D,PFLi,PPCK,TKT1
565	5	4,522175259	0,194296957	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,TKT1
566	5	6,01594542	0,224464061	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TKT2
567	5	5,456414614	0,240407987	ADHEr,LDH_D,PFLi,PPCK,TKT2
568	5	4,581837961	0,192324751	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH-D,PPCK,TKT2
569	5	3,352437372	0,115790546	ADHEr,FADH4,LDH_D,PPS,THD2 y/o GLUDy
570	5	4,568751314	0,164881948	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,PYK
571	5	4,379456454	0,26785091	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,RPE
572	5	3,035729231	0,38300349	ADHEr,ATPS4r,GLU5K,LDH_D,TKT1
573	5	6,876353164	0,277060587	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,TKT1
574	5	4,339242812	0,268682419	ADHEr, FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,TKT1
575	5	4,419421961	0,267024532	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,TKT2
576	5	6,185324416	0,166037364	ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI,TKT2
577	5	6,936871903	0,274483161	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,TKT2
578	6	7,614634412	0,238178822	ADHEr,ATPS4r,CBMK2,LDH_D,MDH,NADH6
579	6	7,603679301	0,239793337	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH-D,ME2,NADH6
580	6	7,269154045	0,188693079	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK,TKT2
581	6	7,539172655	0,163831584	ADHEr,ASNS2,CBMK2,HEX1,LDH_D,PGI
582	6	7,539312732	0,163809352	ADHEr,CBMK2,G5SD,HEXI,LDH_D,PGI
583	6	7,539312732	0,163809352	ADHEr,CBMK2,GLU5K,HEX1,LDH_D,PGI
584	6	7,497875069	0,097945448	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH-D,MDH,THD2 y/o GLUDy
585	6	7,316598461	0,164453176	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2 y/o GLUDy
586	6	7,269154045	0,188693079	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,TKT2
587	6	7,389036066	0,088156259	ADHEr,ASPT,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	Adipato. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
588	6	8,258765764	0,152284822	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,PFLi,THD2 y/o GLUDy
589	6	8,999143093	0,036289126	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy

Tabla 16. Diseños de cepas con inactivación para el aumento de la producción de HMDA, mostrando los rendimientos de HMDA y biomasa.

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
1	3	2,32302	0,35737	ADHEr,LDH_D,NADH6
2	3	2,12864	0,28397	ADHEr,LDH_D,PPCK
3	3	1,2553	0,38773	ADHEr,ATPS4r,LDH_D
4	3	1,11254	0,26898	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D
5	3	0,67068	0,37924	ADHEr,FUM,LDH_D
6	3	0,57155	0,26988	ADHEr,LDH_D,PGI
7	3	0,27747	0,38953	ADHEr,HEX1,LDH_D
8	4	4,46145	0,20591	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH
9	4	4,38802	0,23398	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D
10	4	4,03852	0,23697	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGI
11	4	3,73656	0,30662	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi
12	4	3,05653	0,20692	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,PPCK
13	4	2,59406	0,20532	ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI
14	4	2,58406	0,27187	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH
15	4	2,46512	0,26229	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK
16	4	2,41847	0,29351	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6
17	4	2,38828	0,35417	ADHEr,LDH_D,NADH6,RPE
18	4	2,29878	0,17947	ADHEr,LDH_D,PGI,PPCK
19	4	2,17588	0,24785	ADHEr,FUM,LDH_D,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
20	4	2,14745	0,26084	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PGI
21	4	2,03987	0,35185	ADHEr,FUM,HEX1 ,LDH_D
22	4	1,48168	0,38161	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,RPE
23	4	1,47082	0,28924	ADHEr,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
24	4	1,3746	0,3845	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TAL
25	4	1,26025	0,2616	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,SUCOAS
26	4	0,939	0,26603	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI
27	4	0,76149	0,2867	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D
28	4	0,38353	0,38695	ADHEr,HEX1 ,LDH D,RPE
29	4	0,33312	0,38818	ADHEr,HEX1,LDH_D,TAL
30	5	5,53962	0,16718	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH
31	5	5,40224	0,22385	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI
32	5	5,13405	0,1802	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi
33	5	5,0304	0,08351	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK
34	5	4,96585	0,07704	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
35	5	4,88127	0,20295	ADHFr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,NADH6,PGI
36	5	4,78114	0,2037	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6, PGI
37	5	4,75518	0,09361	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D, PCK, PYK
38	5	4,61203	0,20383	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI
39	5	4,60391	0,15144	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
40	5	4,56119	0,16777	ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH
41	5	4,52834	0,20359	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,RPE
42	5	4,51845	0,20259	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,SUCOAS
43	5	4,46585	0,23056	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,RPE
44	5	4,45522	0,22919	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,SUCOAS

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
45	5	4,44183	0,21341	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
46	5	4,44155	0,21352	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D
47	5	4,42059	0,20565	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,SUCOAS
48	5	4,36907	0,15859	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PGI,PPCK
49	5	4,36067	0,16481	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PGI
50	5	4,33827	0,24026	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
51	5	4,24585	0,21569	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH
52	5	4,24585	0,21569	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH
53	5	4,24585	0,21569	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH
54	5	4,21843	0,08488	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
55	5	4,18265	0,21782	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH
56	5	4,13301	0,24796	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D
57	5	4,03737	0,23515	ACKr y/o PTAr,ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PGI
58	5	4,02056	0,22023	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
59	5	4,0188	0,18437	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
60	5	3,96576	0,20734	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK
61	5	3,96576	0,20734	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
62	5	3,96266	0,23773	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6
63	5	3,92623	0,22446	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
64	5	3,81332	0,27196	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D
65	5	3,81332	0,27196	ACKr y/o PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH
66	5	3,79273	0,28229	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
67	5	3,77686	0,28031	ACKr y/o PTAr,ADHEr,HBX1,LDH_D,NADH6
68	5	3,74717	0,3358	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,THD2 y/o GLUDy
69	5	3,69789	0,22154	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
70	5	3,69693	0,23186	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH
71	5	3,57925	0,1851	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK
72	5	3,55622	0,22164	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
73	5	3,55622	0,22164	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
74	5	3,51036	0,26322	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6
75	5	3,44912	0,18587	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK
76	5	3,44912	0,18587	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK
77	5	3,23914	0,31877	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6
78	5	3,23669	0,2512	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PFLi,PGI
79	5	3,22027	0,23733	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK
80	5	3,21813	0,22145	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PPCK
81	5	3,20482	0,28717	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,SUCOAS
82	5	3,19987	0,14763	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
83	5	3,04087	0,23963	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK
84	5	3,04087	0,23963	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK
85	5	3,01019	0,28849	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
86	5	2,94161	0,20506	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGI
87	5	2,88011	0,33864	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6
88	5	2,85293	0,25411	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6
89	5	2,75034	0,26847	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
90	5	2,74759	0,33105	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6
91	5	2,67997	0,17637	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PGI,PPCK
92	5	2,67853	0,21976	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK
93	5	2,65374	0,15874	ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI,PPCK
94	5	2,65207	0,23435	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
95	5	2,64298	0,23937	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK
96	5	2,63715	0,26997	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,RPE
97	5	2,60095	0,33049	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D
98	5	2,52584	0,22167	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK
99	5	2,5171	0,22752	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK
100	5	2,48801	0,24981	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
101	5	2,47253	0,25734	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
102	5	2,47049	0,29207	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
103	5	2,38845	0,0995	ADHEr,LDH_D,PGI,PPCK,THD2 y/o GLUDy
104	5	2,3823	0,10498	ADHEr,FUM,LDH_D,PGI,THD2 y/o GLUDy
105	5	2,3823	0,10498	ADHEr,LDH_D,MDH,PGI,THD2 y/o GLUDy
106	5	2,37356	0,34412	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL
107	5	2,36643	0,29114	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH
108	5	2,33103	0,23832	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
109	5	2,32447	0,13422	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
110	5	2,29184	0,29402	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,TAL
111	5	2,282	0,28884	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
112	5	2,22251	0,2967	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,RPE
113	5	2,22197	0,24001	ADHEr,LDH_D,MDH,RPE,THD2 y/o GLUDy
114	5	2,21206	0,24857	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PPCK,RPE
115	5	2,20561	0,23941	ADHEr,LDH_D,MDH,TAL,THD2 y/o GLUDy
116	5	2,20149	0,22826	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,PYK
117	5	2,20149	0,22826	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,PYK
118	5	2,19372	0,24909	ADHEr, GLCpts,LDH_D,PPCK,TAL
119	5	2,19132	0,23604	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
120	5	2,19132	0,23604	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK
121	5	2,18792	0,26941	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,RPE
122	5	2,18792	0,26941	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,RPE
123	5	2,18777	0,23875	ADHEr,LDH_D,MDH,PGDH,THD2 y/o GLUDy
124	5	2,09486	0,34975	ADHEr,FUM,HEX1 ,LDH_D,RPE
125	5	1,89618	0,34765	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
126	5	1,74629	0,36027	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS
127	5	1,73743	0,3202	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi
128	5	1,73543	0,31113	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi
129	5	1,69405	0,23402	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI
130	5	1,68439	0,23524	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,TAL
131	5	1,67549	0,23637	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,RPE
132	5	1,66962	0,16853	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PGI
133	5	1,66579	0,35584	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 y/o GLUDy
134	5	1,44831	0,25358	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,SUCOAS
135	5	1,40898	0,31979	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH
136	5	1,33078	0,25859	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,LDH_D,SUCOAS
137	5	1,28594	0,26157	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FRD y/o SUCD4,ICL,LDH_D
138	5	1,28594	0,26157	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MALS
139	5	1,15083	0,26676	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,SUCOAS
140	5	1,08556	0,26021	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI
141	5	1,08281	0,26394	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI
142	5	0,81325	0,32358	ACKr y/o PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS
143	5	0,73764	0,26814	ADHEr,LDH_D,MDH,PGI,THD5
144	5	0,73764	0,26814	ADHEr,FUM,LDH_D,PGI,THD5

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
145	6	6,49204	0,11612	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
146	6	6,18999	0,07445	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH
147	6	6,1414	0,1578	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGL y/o G6PDHy
148	6	5,80857	0,1099	ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PYK
149	6	5,62948	0,09192	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI
150	6	5,60131	0,13875	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
151	6	5,59693	0,15008	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
152	6	5,56181	0,13846	ADHEr,EDA y/o PGDHY,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
153	6	5,52668	0,15619	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
154	6	5,52416	0,10076	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,PGI
155	6	5,44943	0,16764	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,SUCOAS
156	6	5,43906	0,17387	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,MDH
157	6	5,43906	0,17387	ADHEr,ASPT,ATPS4r,ICL,LDH_D,MDH
158	6	5,43906	0,17387	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MALS,MDH
159	6	5,4269	0,11474	ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PGI
160	6	5,39974	0,15728	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
161	6	5,39974	0,15728	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
162	6	5,36516	0,17457	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
163	6	5,29594	0,12992	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,PYK
164	6	5,28218	0,07163	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,PPCK
165	6	5,28218	0,07163	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PGDH,PPCK
166	6	5,27982	0,10569	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy,PYK
167	6	5,27077	0,07217	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,TAL
168	6	5,26177	0,14053	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
169	6	5,26021	0,07267	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,RPE
170	6	5,22996	0,24218	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
171	6	5,22996	0,24218	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2 y/o GLUDy
172	6	5,10795	0,18114	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy
173	6	5,07418	0,20379	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,PPS
174	6	5,05205	0,12049	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,NADH6,PGI,PPCK
175	6	5,02318	0,17043	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK
176	6	5,02318	0,17043	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
177	6	4,96023	0,0152	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PYK,THD2 y/o GLUDy
178	6	4,96019	0,14703	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
179	6	4,95227	0,18511	ACKr y/o PTAr,ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,NADH6,PGI
180	6	4,94767	0,18905	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
181	6	4,94078	0,08876	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK
182	6	4,88378	0,08315	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
183	6	4,88138	0,0499	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
184	6	4,8705	0,04951	ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLCpts,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
185	6	4,86653	0,05103	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MALS,MDH,THD2 y/o GLUDy
186	6	4,86653	0,05103	ADHEr,FRD y/o SUCD4,ICL,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
187	6	4,85555	0,05127	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
188	6	4,81179	0,07918	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
189	6	4,80834	0,05481	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
190	6	4,80834	0,05481	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,THD2 y/o GLUDy
191	6	4,80546	0,08184	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
192	6	4,79254	0,05156	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,THD2 y/o

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
				GLUDy
193	6	4,7879	0,08109	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MALS,PPCK,THD2 y/o GLUDy
194	6	4,7879	0,08109	ADHEr,FRD y/o SUCD4,ICL,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
195	6	4,7863	0,15759	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
196	6	4,78022	0,08403	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,MALS,THD2 y/o GLUDy
197	6	4,78022	0,08403	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,ICL,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
198	6	4,75362	0,1717	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS
199	6	4,74482	0,14204	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
200	6	4,74482	0,14204	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,PPCK
201	6	4,71665	0,15772	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
202	6	4,71665	0,15772	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGI
203	6	4,67938	0,12258	ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
204	6	4,67056	0,08187	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
205	6	4,65509	0,08572	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
206	6	4,65177	0,09959	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,PPCK,PYK
207	6	4,64856	0,19942	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
208	6	4,64527	0,14923	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
209	6	4,62501	0,24401	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PELi,THD2 y/o GLUDy
210	6	4,61569	0,16588	ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH,RPE
211	6	4,58364	0,20034	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS
212	6	4,54149	0,17531	ADHEr,ASPT,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PYK
213	6	4,53277	0,1423	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH-D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
214	6	4,53052	0,2259	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,RPE,SUCOAS
215	6	4,52789	0,16756	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,SUCOAS

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
216	6	4,52733	0,16694	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH
217	6	4,50564	0,17546	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK,SUCOAS
218	6	4,48785	0,20333	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS
219	6	4,45673	0,0937	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PGI,PPCK
220	6	4,44964	0,1574	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
221	6	4,38551	0,17574	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MALS,MDH
222	6	4,38551	0,17574	ADHEr,ASPT,FUM,GLCpts,LDH_D,MDH
223	6	4,38551	0,17574	ADHEr,ASPT,GLCpts,ICL,LDH_D,MDH
224	6	4,3659	0,18135	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,PYK
225	6	4,3659	0,18135	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,PYK
226	6	4,3659	0,18135	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,PYK
227	6	4,35016	0,23064	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,SUCOAS
228	6	4,34833	0,1713	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
229	6	4,34286	0,23323	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D,SUCOAS
230	6	4,33401	0,17749	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH
231	6	4,31842	0,21314	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,RPE
232	6	4,31842	0,21314	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,RPE
233	6	4,31842	0,21314	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,RPE
234	6	4,31517	0,18251	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK
235	6	4,27405	0,08431	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,RPE,THD2 y/o GLUDy
236	6	4,25521	0,17069	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,PYK
237	6	4,25521	0,17069	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,PYK
238	6	4,23738	0,22036	ADHEr,FUM,HEX1,LDH-D,PGI,THD5
239	6	4,23738	0,22036	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PGI,THD5
240	6	4,21937	0,24412	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D,RPE

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
241	6	4,20848	0,22638	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
242	6	4,1949	0,21515	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6
243	6	4,193	0,22615	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D
244	6	4,18464	0,18833	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
245	6	4,17022	0,12602	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
246	6	4,15452	0,23423	ACKr y/o PTAr,ACS,ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PGI
247	6	4,13958	0,1401	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
248	6	4,12806	0,09037	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
249	6	4,10281	0,14798	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
250	6	4,09944	0,14944	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
251	6	4,09149	0,20644	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6
252	6	4,08305	0,24974	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6
253	6	4,07707	0,21283	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
254	6	4,07083	0,2483	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FDH2,HEX1,LDH_D,NADH6
255	6	4,0547	0,15755	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PGDH,PGI
256	6	4,04976	0,14332	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI,PPCK
257	6	4,04925	0,17118	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
258	6	4,04925	0,17118	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK
259	6	4,04921	0,20443	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK
260	6	4,04921	0,20443	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
261	6	4,04701	0,15816	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,TAL
262	6	4,04276	0,14386	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,TAL
263	6	4,03993	0,15872	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,RPE
264	6	4,03632	0,14436	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,RPE
265	6	4,01325	0,18677	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
266	6	3,99577	0,19434	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi
267	6	3,97712	0,21218	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
268	6	3,96781	0,21154	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
269	6	3,95767	0,21085	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGL y/o G6PDHy,PPCK
270	6	3,95767	0,21085	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGDH,PPCK
271	6	3,95117	0,22396	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
272	6	3,94143	0,22325	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
273	6	3,93082	0,22248	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH
274	6	3,92007	0,30764	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,THD2 y/o GLUDy
275	6	3,90761	0,02965	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PGI,THD2 y/o GLUDy
276	6	3,90761	0,02965	ADHEr,EDA y/o PGDHY,FUM,LDH_D,PGI,THD2 y/o GLUDy
277	6	3,88276	0,27815	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
278	6	3,87622	0,18142	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PGI
279	6	3,85591	0,25493	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi
280	6	3,85214	0,25656	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
281	6	3,80756	0,28917	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,RPE
282	6	3,80403	0,29078	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE
283	6	3,80376	0,2909	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE
284	6	3,79095	0,29004	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,TAL
285	6	3,78678	0,29189	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,TAL
286	6	3,74504	0,18693	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK
287	6	3,66618	0,23348	ADHEr,ATPS4r,PDH2,LDH_D,MDH,NADH6
288	6	3,65047	0,29574	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH12,NADH6
289	6	3,64636	0,29624	ADHEr,ATPS4r,FDH2,GLCpts,LDH_D,NADH6
290	6	3,61821	0,2978	ADHEr,ATPS4r,FDH2,FUM,LDH_D,NADH6

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
291	6	3,59369	0,11801	ADHEr,EDA y/o PGDHY,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
292	6	3,56749	0,21671	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
293	6	3,56467	0,20357	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
294	6	3,56467	0,20357	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK
295	6	3,54915	0,24121	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
296	6	3,54182	0,17698	ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PGI,THD5
297	6	3,52871	0,18935	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK
298	6	3,52871	0,18935	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK
299	6	3,48585	0,20551	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PPCK
300	6	3,46875	0,14666	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
301	6	3,39774	0,24244	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
302	6	3,34501	0,09944	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PGI
303	6	3,21571	0,21219	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,SUCOAS
304	6	3,13882	0,32432	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PGL y/o G6PDHy
305	6	3,13882	0,32432	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PGDH
306	6	3,10937	0,32483	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL
307	6	3,08568	0,30099	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6
308	6	3,08242	0,32529	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE
309	6	3,05396	0,31324	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 y/o GLUDy
310	6	3,04084	0,1442	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,PGI,PPCK
311	6	3,0331	0,26033	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH
312	6	2,95572	0,06686	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGI,THD2 y/o GLUDy
313	6	2,95209	0,20166	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PYK
314	6	2,93749	0,26369	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,TAL

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
315	6	2,93137	0,23554	ADHEr,EDA y/o PGDHY,FUM,LDH_D,PGI,THD5
316	6	2,93119	0,19434	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,THD2 y/o GLUDy
317	6	2,92428	0,21637	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
318	6	2,90707	0,25203	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
319	6	2,88032	0,10845	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK,THD2 y/o GLUDy
320	6	2,85872	0,13782	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PGI
321	6	2,83622	0,13278	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
322	6	2,83037	0,25344	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
323	6	2,73678	0,18763	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,PYK
324	6	2,73413	0,26033	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy
325	6	2,70842	0,20327	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK
326	6	2,68773	0,20429	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PGI,THD5
327	6	2,68773	0,20429	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGI, THD5
328	6	2,6871	0,26683	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,RPE
329	6	2,64071	0,07956	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
330	6	2,61399	0,16269	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 y/o GLUDy
331	6	2,60256	0,17034	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK,THD2 y/o GLUDy
332	6	2,56541	0,1952	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,THD2 y/o GLUDy
333	6	2,53808	0,13335	ADHEr,ATPS4r,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
334	6	2,53559	0,33664	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 y/o GLUDy
335	6	2,53316	0,24472	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,RPE
336	6	2,53316	0,24472	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
337	6	2,53266	0,21711	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,THD2 y/o GLUDy
338	6	2,50897	0,31991	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PPS,THD2 y/o GLUDy
339	6	2,47564	0,27754	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH,TAL

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
340	6	2,37424	0,3231	ADHEr, GLU5K, HEX1, LDH_D, NADH6, THD2 y/o GLUDy
341	6	2,37424	0,3231	ADHEr, G5SD, HEX1, LDH_D, NADH6, THD2 y/o GLUDy
342	6	2,37418	0,32314	ADHEr, ASNS2, HEX1, LDH_D, NADH6, THD2 y/o GLUDy
343	6	2,35165	0,11344	ADHEr, FUM, LDH_D, PPCK, PYK, THD2 y/o GLUDy
344	6	2,35165	0,11344	ADHEr, LDH_D, MDH, PPCK, PYK, THD2 y/o GLUDy
345	6	2,28934	0,18186	ADHEr, HEX1, LDH_D, PPS, RPE, THD2 y/o GLUDy
346	6	2,28203	0,17727	ADHEr, HEX1, LDH_D, PPS, TAL, THD2 y/o GLUDy
347	6	2,27443	0,17249	ADHEr, HEX1, LDH_D, PGDH, PPS, THD2 y/o GLUDy
348	6	2,27443	0,17249	ADHEr, HEX1, LDH_D, PGL y/o G6PDHy, PPS, THD2 y/o GLUDy
349	6	2,23539	0,22843	ADHEr, HEX1, LDH_D, PPCK, RPE, THD2 y/o GLUDy
350	6	2,2276	0,23515	ADHEr, FUM, HEX1, LDH_D, RPE, THD2 y/o GLUDy
351	6	2,22058	0,22724	ADHEr, HEX1, LDH_D, PPCK, TAL, THD2 y/o GLUDy
352	6	2,20452	0,22594	ADNEr, HEX1, LDH_D, PGDH, PPCK, THD2 y/o GLUDy
353	6	2,20452	0,22594	ADHEr, HEX1, LDH_D, PGL y/o G6PDHy, PPCK, THD2 y/o GLUDy
354	6	2,10135	0,3242	ADHEr, FUM, HEX1, LDH_D, TAL, THD2 y/o GLUDy
355	6	2,02123	0,34714	ADHEr, ATPS4r, HEX1, LDH_D, RPE, THD2 y/o GLUDy
356	6	1,98114	0,30095	ACKr y/o PTAr, ADHEr, ATPS4r, FUM, LDH_D, THD2 y/o GLUDy
357	6	1,96512	0,30664	ADHEr, ATPS4r, HEX1, LDH_D, MDH, PFLi
358	6	1,96163	0,34738	ADHEr, ATPS4r, HEX1, LDH_D, TAL, THD2 y/o GLUDy
359	6	1,94766	0,26881	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, MDH, PGL y/o G6PDHy, PPS
360	6	1,84554	0,35787	ADHEr, HEX1, LDH_D, PFLi, PPS, RPE
361	6	1,84094	0,27637	ACKr y/o PTAr, ADHEr, ASPT, ATPS4r, FUM, LDH_D
362	6	1,82413	0,31504	ADHEr, ATPS4r, HEX1, LDH_D, PFLi, RPE
363	6	1,82134	0,30945	ADHEr, HEX1, LDH_D, MDH, PFLi, RPE
364	6	1,79836	0,35901	ADHEr, HEX1, LDH_D, PFLi, PPS, TAL

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
365	6	1,74423	0,2066	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,PGL,THD5
366	6	1,63108	0,27824	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PGDH,SUCOAS
367	6	1,63108	0,27824	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy,SUCOAS
368	6	1,59283	0,279	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL
369	6	1,55776	0,2797	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS
370	6	1,35784	0,33828	ADHEr,FUM,LDH_D,PPS,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
371	6	1,3281	0,25919	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,SUCOAS
372	6	1,25004	0,31142	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
373	6	1,16323	0,25946	ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLYCL,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,TAL
374	6	1,16323	0,25946	ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLYCL,LDH_D,PGDH,TAL
375	6	0,94735	0,32316	ACKr y/o PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,RPE
376	6	0,88343	0,32336	ACKr y/o PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,TAL
377	6	0,83542	0,27562	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,PGDH,TAL
378	6	0,83542	0,27562	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,TAL
379	6	0,81371	0,28445	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,FUM,ICL,LDH_D
380	6	0,81371	0,28445	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MALS
381	6	0,40293	0,37998	ACKr y/o PTAr,ADHEr,CITL,ICL,LDH_D,SUCOAS
382	6	0,40293	0,37998	ACKr y/o PTAr,ADHEr,CITL,LDH_D,MALS,SUCOAS
383	7	6,87929	0,03662	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,PGL y/o G6PDHy,PYK
384	7	6,87929	0,03662	ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PFLi,PYK
385	7	6,82182	0,04856	ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
386	7	6,7498	0,06331	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
387	7	6,70416	0,07266	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
388	7	6,67113	0,07943	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
389	7	6,65401	0,08294	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,PGL y/o G6PDHy
390	7	6,45147	0,12443	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGL y/o G6PDHy
391	7	6,44861	0,08805	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MALS,MDH,PGL y/o G6PDHy
392	7	6,44861	0,08805	ADHEr,ASPT,ATPS4r,ICL,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy
393	7	6,44861	0,08805	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy
394	7	6,15823	0,07915	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MALS,MDH
395	7	6,15823	0,07915	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,ICL,LDH_D,MDH
396	7	6,15823	0,07915	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,MDH
397	7	6,14605	0,07491	ADHEr,ASPT,ATPS4r,CLCpts,LDH_D,MDH,SUCOAS
398	7	6,1414	0,1578	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH
399	7	6,09037	0,16006	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
400	7	6,08683	0,10358	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
401	7	6,0464	0,06183	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PGI
402	7	6,04253	0,16218	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
403	7	5,86291	0,1062	ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,ICL,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
404	7	5,86291	0,1062	ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MALS,MDH,THD2 y/o GLUDy
405	7	5,79637	0,08575	ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PGI
406	7	5,74642	0,10456	ADHEr,EDA y/o PGDHY,FRD y/o SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
407	7	5,71711	0,12348	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
408	7	5,71588	0,18172	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,PPS
409	7	5,71588	0,18172	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS
410	7	5,70575	0,12457	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi
411	7	5,69395	0,07981	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PPCK

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
412	7	5,68826	0,10159	ADHEr,EDA y/o PGDHY,GLCpts,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
413	7	5,6857	0,18276	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,PPS,TAL
414	7	5,67373	0,1078	ACKr y/o PTAr,ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
415	7	5,67231	0,09516	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH
416	7	5,65788	0,18372	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,PPS,RPE
417	7	5,65108	0,11748	ADHEr,EDA y/o PGDHY,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
418	7	5,64055	0,12198	ACKr y/o PTAr,ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
419	7	5,63038	0,12633	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
420	7	5,63037	0,14151	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,PPS,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
421	7	5,61946	0,14377	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,SUCOAS
422	7	5,61946	0,14377	ADHEr,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS
423	7	5,60713	0,15264	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,MALS,PPS,THD2 y/o GLUDy
424	7	5,60713	0,15264	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,ICL,LDH_D,PPS,THD2 y/o GLUDy
425	7	5,60017	0,14365	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PGDH,SUCOAS
426	7	5,59518	0,14138	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
427	7	5,59117	0,14212	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,MDH,PGDH
428	7	5,58992	0,13977	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PGDH,TAL
429	7	5,57521	0,1433	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PPS,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
430	7	5,57521	0,1433	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
431	7	5,56382	0,059	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI,PPS,THD2 y/o GLUDy
432	7	5,55714	0,14423	ADIIr,ASPT,EDA y/o PGDIY,FUM,LDII_D,MDII,TIID2 y/o GLUDy
433	7	5,5551	0,14719	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
434	7	5,54832	0,1485	ADHEr,ASPT,HEX1,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
435	7	5,54749	0,08705	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
436	7	5,54	0,14449	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH,SUCOAS
437	7	5,53962	0,15019	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,SUCOAS
438	7	5,53831	0,08799	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
439	7	5,53831	0,08799	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
440	7	5,53405	0,05732	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PGI
441	7	5,52463	0,06237	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PGI
442	7	5,51713	0,16489	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS
443	7	5,51587	0,14532	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS,TAL
444	7	5,51034	0,14586	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGDH
445	7	5,51034	0,14586	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH
446	7	5,5014	0,07482	ADHEr,ASPT,EDA y/o PGDHY,GLCpts,LDH_D,MDH,PGI
447	7	5,49363	0,14609	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,RPE,SUCOAS
448	7	5,49315	0,18499	ACKr y/o PTAr,ADHEr,EDA y/o PGDHY,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI
449	7	5,48581	0,14671	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,TAL
450	7	5,48581	0,14671	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
451	7	5,47686	0,19195	ADHEr,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PGI,THD5
452	7	5,47123	0,12153	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
453	7	5,47123	0,12153	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
454	7	5,46318	0,14749	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
455	7	5,46318	0,14749	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,RPE
456	7	5,43967	0,13732	ADHEr,GLCpts,LDH D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 y/o GLUDy
457	7	5,41442	0,15603	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
458	7	5,41442	0,15603	ADHEr,ASPT,HEX1,LDH_D,MALS,MDH,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
459	7	5,41442	0,15603	ADHEr,ASPT,HEX1,ICL,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
460	7	5,32088	0,07204	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,PPCK,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
461	7	5,29376	0,07385	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,MALS,PPCK,THD2 y/o GLUDy
462	7	5,29376	0,07385	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,ICL,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
463	7	5,29342	0,0731	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PPCK,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
464	7	5,29342	0,0731	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PPCK,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
465	7	5,20741	0,07603	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,PGDH,PPCK
466	7	5,20741	0,07603	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,PGL y/o G6PDHy,PPCK
467	7	5,20289	0,16585	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,RPE
468	7	5,19469	0,07664	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,TAL
469	7	5,18818	0,16709	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,TAL
470	7	5,18292	0,0772	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,RPE
471	7	5,18092	0,10975	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
472	7	5,18092	0,10975	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,PPCK
473	7	5,18025	0,13169	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
474	7	5,18025	0,13169	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK
475	7	5,17526	0,14527	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi
476	7	5,15999	0,12483	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGI
477	7	5,15742	0,1471	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
478	7	5,13283	0,14064	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,PPCK
479	7	5,13283	0,14064	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
480	7	5,11128	0,1487	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
481	7	5,10917	0,0835	ADHEr,EDA y/o PGDHY,GLCpts,LDH_D,NADH6,PGI,PPCK
482	7	5,10795	0,18114	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,PGDH

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
483	7	5,08422	0,18199	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,TAL
484	7	5,08162	0,15602	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
485	7	5,08154	0,15604	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGI
486	7	5,07957	0,15652	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
487	7	5,06238	0,18278	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA y/o PGDHY,LDH_D,MDH,RPE
488	7	5,04933	0,08188	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PPCK,SUCOAS
489	7	5,04086	0,10883	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH,PGI
490	7	5,03782	0,10979	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGI,TAL,
491	7	5,03499	0,11069	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGI,RPE
492	7	5,0347	0,123	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS
493	7	5,02325	0,08242	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,SUCOAS
494	7	5,02325	0,08242	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,SUCOAS
495	7	5,02233	0,1115	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 y/o GLUDy
496	7	5,00367	0,01301	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
497	7	5,00099	0,08371	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,SUCOAS
498	7	4,9785	0,07565	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
499	7	4,97218	0,04755	ADHEr,EDA y/o PGDHY,HEX1,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 y/o GLUDy
500	7	4,96921	0,01295	ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLUDy,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
501	7	4,96716	0,01165	ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
502	7	4,96611	0,01426	ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
503	7	4,96543	0,01322	ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLUDy,ICL,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
504	7	4,96543	0,01322	ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLUDy,LDH_D,MALS,MDH,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
505	7	4,96335	0,01401	ADHEr,AKGD,FRD y/o SUCD4,ICL,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
506	7	4,96335	0,01401	ADHEr,AKGD,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MALS,PPCK,THD2 y/o GLUDy
507	7	4,96309	0,0131	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
508	7	4,96271	0,01323	ADHEr,ASPT,GLUDy,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
509	7	4,96187	0,01458	ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLCpts,LDH_D,MALS,MDH,THD2 y/o GLUDy
510	7	4,96187	0,01458	ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLCpts,ICL,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
511	7	4,95873	0,01465	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
512	7	4,95686	0,01531	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
513	7	4,95085	0,01406	ADHEr,ASPT,GLUDy,LDH_D,MALS,MDH,THD2 y/o GLUDy
514	7	4,95085	0,01406	ADHEr,ASPT,GLUDy,ICL,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
515	7	4,94529	0,0136	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
516	7	4,94524	0,01566	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MALS,MDH,THD2 y/o GLUDy
517	7	4,94524	0,01566	ADHEr,ASPT,GLCpts,ICL,LDH-D,MDH,THD2 y/o GLUDy
518	7	4,94393	0,07737	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
519	7	4,94353	0,01615	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,PYK,THD2 y/o GLUDy
520	7	4,94353	0,01615	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,PYK,THD2 y/o GLUDy
521	7	4,94353	0,01615	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,PYK,THD2 y/o GLUDy
522	7	4,94073	0,01473	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
523	7	4,9406	0,01618	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PYK,THD2 y/o GLUDy
524	7	4,93746	0,13888	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
525	7	4,93038	0,19331	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH
526	7	4,92604	0,19438	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,TAL

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
527	7	4,92485	0,04913	ACKr y/o PTA _r ,ADHE _r ,HEX1,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 y/o GLUDy
528	7	4,92203	0,19537	ACKr y/o PTA _r ,ADHE _r ,ATPS4 _r ,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
529	7	4,89572	0,18301	ACKr y/o PTA _r ,ADHE _r ,ASPT,ATPS4 _r ,LDH_D,MDH,PGDH
530	7	4,88586	0,18375	ACKr y/o PTA _r ,ADHE _r ,ASPT,ATPS4 _r ,LDH_D,MDH,TAL
531	7	4,8768	0,18443	ACKr y/o PTA _r ,ADHE _r ,ASPT,ATPS4 _r ,LDH_D,MDH,RPE
532	7	4,87463	0,19612	ACKr y/o PTA _r ,ADHE _r ,LDH_D,MDH,NADH6,PGI,THD5
533	7	4,87463	0,19612	ACKr y/o PTA _r ,ADHE _r ,FUM,LDH_D,NADH6,PGI,THD5
534	7	4,85806	0,05038	ADHE _r ,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
535	7	4,85603	0,21579	ADHE _r ,ASPT,ATPS4 _r ,FUM,HEX1,LDH_D,PPS
536	7	4,84975	0,05712	ADHE _r ,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PGL y/o G6PDHy,PPCK,PYK
537	7	4,84975	0,05712	ADHE _r ,EDA y/o PGDHY,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PPCK,PYK
538	7	4,81569	0,05271	ADHE _r ,ASPT,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
539	7	4,81323	0,1198	ADHE _r ,ATPS4 _r ,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
540	7	4,81194	0,09049	ADHE _r ,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,PYK,RPE,SUCOAS
541	7	4,81179	0,07918	ADHE _r ,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
542	7	4,79812	0,05498	ACKr y/o PTA _r ,ADHE _r ,FUM,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
543	7	4,79812	0,05498	ACKr y/o PTA _r ,ADHE _r ,LDH_D,MALS,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
544	7	4,79812	0,05498	ACKr y/o PTA _r ,ADHE _r ,ICL,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
545	7	4,79409	0,12192	ADHE _r ,ATPS4 _r ,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK
546	7	4,79101	0,05495	ACKr y/o PTA _r ,ADHE _r ,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
547	7	4,78296	0,12315	ADHE _r ,ATPS4 _r ,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK
548	7	4,78296	0,12315	ADHE _r ,ATPS4 _r ,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
549	7	4,77588	0,08569	ADHEr,AKGD,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MALS,MDH,THD2 y/o GLUDy
550	7	4,77588	0,08569	ADHEr,AKGD,FRD y/o SUCD4,ICL,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
551	7	4,77561	0,07964	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
552	7	4,77561	0,07964	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
553	7	4,77329	0,08047	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
554	7	4,77329	0,08047	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,PPCK,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
555	7	4,7705	0,16052	ADHEr,ATPS4r,FDH2,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
556	7	4,76518	0,08334	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
557	7	4,76374	0,0222	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
558	7	4,76264	0,08425	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
559	7	4,74028	0,09218	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK,SUCOAS
560	7	4,74028	0,09218	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,PYK,SUCOAS
561	7	4,73717	0,09329	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,PYK,SUCOAS
562	7	4,73717	0,09329	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,PPCK,PYK,SUCOAS
563	7	4,71257	0,12092	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
564	7	4,69803	0,08636	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MALS,PPCK,THD2 y/o GLUDy
565	7	4,69803	0,08636	ADHEr,ASPT,FUM,ICL,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
566	7	4,69803	0,08636	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
567	7	4,69803	0,08636	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 y/o GLUDy
568	7	4,68998	0,14917	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
569	7	4,68111	0,0912	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D,MALS,THD2 y/o GLUDy
570	7	4,68111	0,0912	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,ICL,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
571	7	4,68063	0,05195	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
572	7	4,67974	0,09159	ADHEr,AKGD,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,THD2 y/o GLUDy
573	7	4,67974	0,09159	ADHEr,AKGD,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
574	7	4,6782	0,13538	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
575	7	4,67079	0,08656	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,FUM,LDH _D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
577	7	4,66526	0,1329	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
578	7	4,65177	0,09959	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,PPCK,PYK
579	7	4,65177	0,09959	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,PPCK,PYK
580	7	4,65148	0,09163	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
581	7	4,64795	0,13132	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
582	7	4,64717	0,13258	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL,THD2 y/o GLUDy
583	7	4,63555	0,16411	ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL
584	7	4,62743	0,13223	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PGDH,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
585	7	4,62722	0,10661	ADHEr,AKGD,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,PYK
586	7	4,62722	0,10661	ADHEr,AKGD,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,PYK
587	7	4,61442	0,12597	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
588	7	4,60692	0,10476	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGI
589	7	4,60239	0,15202	ADHEr,AKGD,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,MALS,THD2 y/o GLUDy
590	7	4,60239	0,15202	ADHEr,AKGD,FRD y/o SUCD4,HEX1,ICL,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
591	7	4,59777	0,03574	ACKr y/o PTAr,ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
592	7	4,59693	0,17398	ADHEr,ASPT,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PYK,RPE
593	7	4,59408	0,12607	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK
594	7	4,588	0,17333	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PYK,SUCOAS

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
595	7	4,58269	0,16568	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS
596	7	4,5614	0,17413	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK,RPE,SUCOAS
597	7	4,55514	0,12723	ADHEr,ASPT,FUM,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
598	7	4,54823	0,19006	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
599	7	4,54674	0,19069	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,SUCOAS
600	7	4,53866	0,20774	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,SUCOAS,TAL,THD2 y/o GLUDy
601	7	4,53699	0,1728	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,MDH,PYK,TAL
602	7	4,53586	0,209	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,HEX1 ,LDH_D,SUCOAS,TAL
603	7	4,51849	0,13149	ADHEr,ATPS4r,FDH2,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK
604	7	4,51845	0,20259	ADHEr,FDH2,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,SUCOAS
605	7	4,50909	0,20652	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
606	7	4,50549	0,20804	ADHEr,FRD y/o SUCD4,GLU5K,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
607	7	4,50549	0,20804	ADHEr,FRD y/o SUCD4,G5SD,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
608	7	4,50543	0,20807	ADHEr,ASNS2,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
609	7	4,50378	0,20876	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
610	7	4,50198	0,20952	ADHEr,ATPS4r,FDH2,HEX1,LDH_D,NADH6,SUCOAS
611	3	0,669528208	0,263200019	ADHEr,FADH4,LDH_D
612	3	0,110808857	0,249569497	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI
613	4	0,93088625	0,384018912	ADHEr,ATPS4r,CBMK2,LDH_D
614	4	1,163912961	0,378757536	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TKT2
615	4	4,552254757	0,171189177	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH
616	4	0,710935568	0,257359864	ADHEr,FADH4,LDH_D,RPE

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
617	4	0,702400877	0,260125701	ADHEr,FADH4,LDH_D,TAL
618	4	0,719290675	0,254652225	ADHEr,FADH4,LDH_D,TKT2
619	4	2,283994469	0,165173433	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,PPCK
620	4	0,18159615	0,246009686	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,TKT2
621	4	4,555303308	0,170023606	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2
622	4	0,710935568	0,257359864	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,RPE
623	4	0,702400877	0,260125701	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,TAL
624	4	0,753832099	0,262897433	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
625	4	0,719290675	0,254652225	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,TKT2
626	4	2,165485624	0,255793845	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK
627	4	2,279039418	0,168962421	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI
628	4	0,24281895	0,340878264	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH
629	4	2,165485624	0,255793845	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK
630	4	4,555303308	0,170023606	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2
631	4	2,575639756	0,188350402	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK y/o FBA y/o TPI
632	4	2,359364668	0,333057496	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6
633	4	2,365271913	0,329105029	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6
634	4	2,381170653	0,338701395	ADHEr,LDH_D,NADH6,TAL
635	4	2,440438621	0,335394947	ADHEr,LDH_D,NADH6,TKT2
636	4	0,303924042	0,270354967	ADHEr,LDH_D,PPCK,TKT2
637	4	0,276184314	0,387717801	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS
638	4	0,158957458	0,24714816	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,RPE
639	4	0,268683115	0,271077634	ADHEr,LDH_D,PPCK,RPE
640	4	2,268133298	0,177302028	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI
641	4	2,303972218	0,174839451	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PGI

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
642	4	2,202777355	0,227277897	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK
643	4	0,136108259	0,248297219	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,TAL
644	4	0,233253283	0,271804175	ADHEr,LDH_D,PPCK,TAL
645	4	0,753832099	0,262897433	ADHEr,FADH4,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
646	4	1,00803743	0,384504476	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TKT1
647	4	0,702400877	0,260125701	ADHEr,FADH4,LDH_D,TKT1
648	4	0,136108259	0,248297219	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,TKT1
649	4	0,702400877	0,260125701	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,TKT1
650	4	2,381170653	0,338701395	ADHEr,LDH_D,NADH6,TKT1
651	4	0,233253283	0,271804175	ADHEr,LDH_D,PPCK,TKT1
652	5	0,506864978	0,275350379	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,TKT2
653	5	2,69303784	0,249064654	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,TKT2
654	5	4,367851715	0,180794605	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,ME2
655	5	0,41729748	0,278421057	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,RPE
656	5	0,325709758	0,281560994	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,TAL
657	5	2,645877173	0,251090969	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,TAL
658	5	0,746129455	0,280922235	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
659	5	1,038232852	0,250484522	ADHEr,ATPS4r,FADH4,LDH_D,SUCOAS
660	5	1,091156432	0,260562519	ADHEr,ATPS4r,FADH4,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
661	5	3,468709118	0,171072336	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2
662	5	1,635653331	0,170872463	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,PFLi
663	5	0,971889592	0,254878539	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,PYK
664	5	2,773151559	0,15594541	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PGI
665	5	0,794188757	0,220436537	ADHEr,FADH4,HEX1,LDH_D,TKT2
666	5	4,635305085	0,167733685	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,TKT2

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
667	5	0,726213349	0,222710178	ADHEr,FADH4,HEX1,LDH_D,RPE
668	5	4,60885325	0,168834272	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,RPE
669	5	4,600497528	0,168070055	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,SUCOAS
670	5	4,582051994	0,169949398	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,TAL
671	5	1,218736747	0,252980412	ADHEr,FADH4,LDH_D,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
672	5	2,323324205	0,162516565	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,PPCK,TKT2
673	5	0,794188757	0,220436537	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,TKT2
674	5	1,080064187	0,261131964	ADHEr,FRD y/o SUCD4,ICL,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
675	5	1,080064187	0,261131964	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MALS,THD2 y/o GLUDy
676	5	4,635305085	0,167733685	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,TKT2
677	5	4,611480051	0,167700442	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,RPE
678	5	4,603168381	0,166946432	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,SUCOAS
679	5	4,584877196	0,168800591	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,TAL
680	5	4,692124349	0,117711987	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,THD2 y/o GLUDy
681	5	4,637738386	0,16661454	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,TKT2
682	5	4,582051994	0,169949398	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,TAL
683	5	1,218736747	0,252980412	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
684	5	2,22459069	0,253337321	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TKT2
685	5	2,084553651	0,317680271	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,GLU5K,LDH_D
686	5	2,319043241	0,166454441	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,TKT2
687	5	0,379133409	0,337257295	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TKT2
688	5	0,379133409	0,337257295	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,TKT2
689	5	1,080064187	0,261131964	ADHEr,FADH4,ICL,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
690	5	1,080064187	0,261131964	ADHEr,FADH4,LDH_D,MALS,THD2 y/o GLUDy
691	5	2,22459069	0,253337321	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,TKT2

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
692	5	4,611480051	0,167700442	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,RPE
693	5	4,603168381	0,166946432	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,SUCOAS
694	5	4,584877196	0,168800591	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,TAL
695	5	4,692124349	0,117711987	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,THD2 y/o GLUDy
696	5	4,637738386	0,16661454	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,TKT2
697	5	2,871064894	0,268281645	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,ME2,NADH6
698	5	2,165924808	0,255458013	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,ME2
699	5	4,328684855	0,179395311	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2
700	5	1,421860815	0,279607649	ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,THD2 y/o GLUDy
701	5	2,626697246	0,185479991	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK y/o FBA y/o TPI,TKT2
702	5	2,515320971	0,228708985	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK
703	5	2,3870222	0,31455217	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6
704	5	2,452754421	0,325482265	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TKT2
705	5	2,515320971	0,228708985	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
706	5	2,517581576	0,273304492	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TKT2
707	5	2,44490357	0,275824433	ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,NADH6
708	5	2,6103794	0,186397367	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK y/o FBA y/o TPI,RPE
709	5	2,555986853	0,242393036	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TKT2
710	5	2,421064631	0,329399782	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,RPE
711	5	2,424713593	0,326643472	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE
712	5	2,535155189	0,243219368	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
713	5	2,593899337	0,187323863	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK y/o FBA y/o TPI,TAL
714	5	2,391804455	0,331134392	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,TAL
715	5	2,470792173	0,274926806	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
716	5	2,514181006	0,244051353	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
717	5	0,318612958	0,180159999	ACKr y/o PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PFK y/o FBA y/o TPI
718	5	2,298067641	0,164222738	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,PPCK,TAL
719	5	1,630847318	0,197351873	ADHEr,LDH_D,MDH,PFK y/o FBA y/o TPI,PFLi
720	5	4,068156517	0,116307981	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,PFLi,PPCK
721	5	1,630847318	0,197351873	ADHEr,FUM,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,PFLi
722	5	1,732749142	0,29901565	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi
723	5	1,717432965	0,229711682	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPCK
724	5	3,998783556	0,193038233	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,PFLi
725	5	4,075902556	0,129526478	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK y/o FBA y/o TPI,PFLi
726	5	3,837085522	0,275765851	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE
727	5	3,820196202	0,277060587	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,TAL
729	5	3,839632897	0,261974412	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PFLi,THD2 y/o GLUDy
730	5	4,393030474	0,140852085	ADHEr,EDA y/o PGDHY,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PGI
731	5	0,430495607	0,382946425	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,TKT2
732	5	0,381078242	0,384474433	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,RPE
733	5	0,331264934	0,386014683	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,TAL
734	5	0,331264934	0,386014683	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,TKT1
735	5	0,318612958	0,180159999	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI
736	5	2,310761865	0,163365197	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,PPCK,RPE
737	5	2,306254619	0,167256205	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPT,RPE
738	5	0,335428873	0,338418234	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,RPE
739	5	2,674115155	0,222196435	ADHEr,ASPT,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH
740	5	2,310408468	0,174397201	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,TKT2
741	5	2,084492611	0,317726946	ADHEr,ASNS2,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D
742	5	2,086878053	0,315902866	ADHEr,CBMK2,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
743	5	2,084553651	0,317680271	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,G5SD,LDH_D
744	5	2,221671127	0,212830356	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,PPCK
745	5	2,110766092	0,297636347	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,HEX1,LDH_D
746	5	2,221671127	0,212830356	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PPCK
747	5	2,29690811	0,175324843	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,RPE
748	5	2,283263365	0,176262405	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,TAL
749	5	2,799273371	0,150483141	ACKr y/o PTAr,ADHEr,rRD y/o SUCD4,LDH_D,PGI
750	5	2,255979533	0,224464061	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,TKT2
751	5	4,330026614	0,179036754	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH
752	5	2,238942691	0,225365131	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,RPE
753	5	2,119938959	0,309086971	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,TAL
754	5	2,221768517	0,226273464	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,TAL
755	5	2,186545813	0,254918542	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TAL
756	5	2,293342202	0,16806573	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,TAL
757	5	0,29142241	0,339587193	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TAL
758	5	0,29142241	0,339587193	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,TAL
759	5	2,186545813	0,254918542	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,TAL
760	5	3,603753429	0,189374217	ADHEr,FADH4,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
761	5	4,688321717	0,11916587	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
762	5	3,879826068	0,057433556	ADHEr,FADH4,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
763	5	2,092923946	0,31127974	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
764	5	1,181362879	0,252361787	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
765	5	0,325709758	0,281560994	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,TKT1
766	5	2,645877173	0,251090969	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,TKT1
767	5	4,582051994	0,169949398	ADHEr,FADH4,LDH_D,DH,TKT1

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
768	5	2,298067641	0,164222738	ADHEr,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,PPCK,TKT1
769	5	4,582051994	0,169949398	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,TKT1
770	5	4,584877196	0,168800591	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,TKT1
771	5	2,186545813	0,254918542	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TKT1
772	5	2,293342202	0,16806573	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,TKT1
773	5	0,29142241	0,339587193	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TKT1
774	5	0,29142241	0,339587193	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,TKT1
775	5	2,186545813	0,254918542	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,TKT1
776	5	4,584877196	0,168800591	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,TKT1
777	5	2,593899337	0,187323863	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK y/o FBA y/o TPI,TKT1
778	5	2,391804455	0,331134392	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,TKT1
779	5	2,396471968	0,327812994	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TKT1
780	5	2,470792173	0,274926806	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TKT1
781	5	2,514181006	0,244051353	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TKT1
782	5	3,820196202	0,277060587	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,TKT1
783	5	2,283263365	0,176262405	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PFK y/o FBA y/o TPI,TKT1
784	5	2,119938959	0,309086971	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,TKT1
785	5	2,221768517	0,226273464	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,TKT1
786	6	4,63815309	0,138347146	ADHEr,ASPT,FADH4,LDH_D,MDH,PYK
787	6	4,459389393	0,176944819	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,TKT2
788	6	4,380192095	0,177265253	ADHEr,ASPT,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MALS,MDH
789	6	4,40071793	0,179412355	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,TAL
790	6	4,60130813	0,167781976	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,SUCOAS,TKT2
791	6	4,459389393	0,176944819	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,ME2,TKT2
792	6	4,430256792	0,178170044	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,ME2,RPE

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
793	6	4,40071793	0,179412355	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,ME2,TAL
794	6	4,563806878	0,124751372	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,ME2,THD2 y/o GLUDy
795	6	4,380192095	0,177265253	ADHEr,ASPT,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,MDH
796	6	4,380192095	0,177265253	ADHEr,ASPT,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,ME2
797	6	4,40071793	0,179412355	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,TAL
798	6	4,547590285	0,169998972	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL
799	6	4,32598859	0,179624623	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
800	6	4,503409516	0,124027245	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,TKT2
801	6	4,55209485	0,121669936	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH
802	6	4,519337222	0,123256037	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,RPE
803	6	4,535068073	0,12249436	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,TAL
804	6	5,189612621	0,143792027	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,PFLi
805	6	4,321178853	0,120168187	ADHEr,ATPS4r,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PGI
806	6	4,555303308	0,170023606	ADHEr,DAAD,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,PRO1z
807	6	4,552254757	0,171189177	ADHEr,DAAD,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PRO1z
808	6	4,611166872	0,137118286	ADHEr,FADH4,FUM,LDH_D,MDH,PYK
809	6	4,681108251	0,164738111	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,SUCOAS,TKT2
810	6	4,655427003	0,165799614	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS
811	6	4,62941265	0,166874885	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL
812	6	4,57471951	0,178914826	ADHEr,FADH4,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
813	6	4,72140048	0,117206382	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
814	6	5,77503303	0,099302315	ADHEr,EDA y/o PGDHY,FADH4,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy
815	6	4,802404267	0,049107371	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FADH4,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
816	6	4,611166872	0,137118286	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,MDH,PYK
817	6	4,681108251	0,164738111	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,SUCOAS,TKT2

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
818	6	4,640728933	0,137362308	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,ME2,PYK
819	6	4,657699713	0,164706045	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,RPE,SUCOAS
820	6	4,683198197	0,163658455	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MH2,SUCOAS,TKT2
821	6	4,63187269	0,165767133	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,SUCOAS,TAL
822	6	5,443882794	0,111598427	ADHEr,FRD y/o SUCD4,HEX1,LDH_D,ME2,THD2 y/o GLUDy
823	6	4,714403301	0,10919394	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,THD2 y/o GLUDy
824	6	4,727966085	0,117420509	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,RPE,THD2 y/o GLUDy
825	6	4,724744313	0,115799637	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
826	6	4,710892193	0,11755936	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,TAL,THD2 y/o GLUDy
827	6	4,744999691	0,117281986	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,THD2 y/o GLUDy,TKT2
828	6	4,62941265	0,166874885	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL
829	6	4,74186178	0,118725202	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy,TKT2
830	6	4,512318137	0,052959973	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,PPCK,PYK,THD2 y/o GLUDy
831	6	4,724614564	0,118867157	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,RPE,THD2 y/o GLUDy
832	6	4,707326054	0,119009453	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,TAL,THD2 y/o GLUDy
833	6	4,459389393	0,176944819	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,TKT2
834	6	4,380192095	0,177265253	ADHEr,ASPT,FRD y/o SUCD4,ICL,LDH_D,MDH
835	6	4,40071793	0,179412355	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,TAL
836	6	4,874048363	0,048155873	ADHEr,FADH4,ICL,LDH_D,PPCK,THD2 y/o GLUDy
837	6	4,520685593	0,183259208	ADHEr,FADH4,HEX1,ICL,LDH_D,THD2 y/o GLUDy
838	6	4,459389393	0,176944819	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,TKT2
839	6	4,520685593	0,183259208	ADHEr,FADH4,HEX1,LDH_D,MALS,THD2 y/o GLUDy
840	6	4,874048363	0,048155873	ADHEr,FADH4,LDH_D,MALS,PPCK,THD2 y/o GLUDy
841	6	4,517532821	0,171239478	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,ME2,SUCOAS

ES 2 749 423 T3

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
842	6	4,640728933	0,137362308	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,ME2,PYK
843	6	4,657699713	0,164706045	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,RPE,SUCOAS
844	6	4,683198197	0,163658455	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,SUCOAS,TKT2
845	6	4,63187269	0,165767133	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,SUCOAS,TAL
846	6	4,724744313	0,115799637	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
847	6	4,744999691	0,117281986	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,THD2 y/o GLUDy,TKT2
848	6	4,526462669	0,168070055	ADHEr,FRD y/o SUCD4,FUM,LDH_D,ME2,SUCOAS
849	6	5,443882794	0,111598427	ADHEr,FADH4,HEX1,LDH_D,ME2,THD2 y/o GLUDy
850	6	4,714403301	0,10919394	ACKr y/o PTAr,ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,THD2 y/o GLUDy
851	6	4,727966085	0,117420509	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,RPE,THD2 y/o GLUDy
852	6	4,710892193	0,11755936	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,TAL,THD2 y/o GLUDy
853	6	4,33071542	0,180983121	ACKr y/o PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6
854	6	4,313819364	0,203396482	ACKr y/o PTAr,ADIHEr,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 y/o GLUDy
855	6	4,836109146	0,120863498	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,PFLi,PGI
856	6	5,044438059	0,165184738	ACKr y/o PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI
857	6	5,168015107	0,134224131	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,PFLi,THD2 y/o GLUDy
858	6	5,320455827	0,059323173	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 y/o GLUDy
859	6	4,74186178	0,118725202	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy,TKT2
860	6	4,512318137	0,052959973	ADHEr,FADH4,LDH_D,PPCK,PYK,THD2 y/o GLUDy
861	6	4,724614564	0,118867157	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,RPE,THD2 y/o GLUDy
862	6	4,888461627	0,046924032	ADHEr,FADH4,LDH_D,PPCK,SUCOAS,THD2 y/o GLUDy
863	6	4,707326054	0,119009453	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,TAL,THD2 y/o GLUDy
864	6	4,40071793	0,179412355	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,TKT1
865	6	4,547590285	0,169998972	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,SUCOAS,TKT1
866	6	4,535068073	0,12249436	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,TKT1

Id. de diseño nuevo	Cant. de KO	HMDA. Rendimiento	Biomasa	Rxnlist
867	6	4,62941265	0,166874885	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,SUCOAS,TKT1
868	6	4,63187269	0,165767133	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,SUCOAS,TKT1
869	6	4,710892193	0,11755936	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,ME2,THD2 y/o GLUDy,TKT1
870	6	4,62941265	0,166874885	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,SUCOAS,TKT1
871	6	4,707326054	0,119009453	ADHEr,FRD y/o SUCD4,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy,TKT1
872	6	4,40071793	0,179412355	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,TKT1
873	6	4,40071793	0,179412355	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,TKT1
874	6	4,40071793	0,179412355	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,ME2,TKT1
875	6	4,63187269	0,165767133	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,SUCOAS,TKT1
876	6	4,710892193	0,11755936	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,THD2 y/o GLUDy,TKT1
877	6	4,707326054	0,119009453	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,THD2 y/o GLUDy,TKT1

Conjuntos de eliminaciones de genes mínimos para la producción mejorada de 6-ACA. Anteriormente se describieron estrategias para mejorar la producción de 6-aminocaproato (6-ACA) en microorganismos que poseen la vía de 6-ACA a través de acetil-CoA y succinil-CoA. En función de un análisis extenso de los diseños de cepas para la producción de 6-ACA que se describieron en la Tabla 14, se ha identificado un conjunto mínimo de eliminaciones que se necesita para la producción de 6-ACA acoplada al desarrollo. Cabe destacar que se asumió que la fosfoenolpiruvato carboxicinas (PPCK) era reversible.

En resumen, se necesitan eliminaciones en la acetaldeshidrogenasa (ADHEr) y lactato deshidrogenasa (LDH_D) para impedir la formación de subproductos en competencia, etanol y lactato. Por lo tanto, el conjunto de eliminaciones mínimo comprende la eliminación de acetaldeshidrogenasa (ADHEr) y lactato deshidrogenasa (LDH_D). Otras cepas de eliminación incluyen cepas que carecen de al menos una de las siguientes actividades además de la ADHEr y LDH_D: malato deshidrogenasa (MDH), aspartasa (ASPT), NAD(P) transhidrogenasa (THD2) y glutamato deshidrogenasa (GLUDy). Esas eliminaciones adicionales producen un acoplamiento mucho más estrecho de la producción al desarrollo celular. Las Figuras 28-31 muestran el 6-ACA calculado con respecto a los rendimientos de desarrollo para mutantes de eliminación con al menos una eliminación de ADHEr y LDH_D (Figura 28). Los rendimientos calculados para las cepas con eliminaciones adicionales se muestran en las Figuras 29-31.

Un conjunto mínimo adicional de eliminaciones incluye la fosfoglucoisomerasa (PGI). Este diseño se concentra en generar equivalentes de reducción a través de la vía de pentosa fosfato. Otras eliminaciones beneficiosas incluyen cualquiera de los siguientes: acetaldeshidrogenasa (ADHEr), hexocinasa (HEX1), 2-deshidro-3-desoxi-fosfogluconato aldolasa (EDA) y fosfogluconato deshidratasa (PGDH_y). Las Figuras 32-34 muestran el 6-ACA calculado con respecto a los rendimientos de desarrollo para mutantes de eliminación con al menos una eliminación de PGI; otros ejemplos de mutantes se muestran en las Figuras 32-34.

Cada una de estas cepas puede complementarse con eliminaciones adicionales si se determina que los diseños de cepas previstos no acoplan de manera suficiente la formación del producto a la formación de biomasa o para un aumento de la eficiencia del acoplamiento de la formación del producto a la formación de biomasa. De manera alternativa, algunas otras enzimas que hasta donde se sabe no poseen actividad significativa en las condiciones de desarrollo pueden volverse activas debido a la evolución adaptativa o mutagénesis aleatoria. Esas actividades enzimáticas también pueden inactivarse. Por ejemplo, la succinato deshidrogenasa que oxida succinato para formar fumarato y se sabe que presenta actividad solamente en condiciones aerobias puede asumir una actividad significativa incluso en condiciones anaerobias y, por lo tanto, esa actividad puede inactivarse. Sin embargo, la lista de conjuntos de eliminación de genes que se proporciona en la presente memoria sirve como un buen punto de partida para la construcción de cepas de producción de 6-ACA acoplada al desarrollo con alto rendimiento.

Conjuntos de eliminaciones de genes mínimos para la producción mejorada de adipato. Anteriormente se describieron estrategias de diseño de cepas para mejorar la producción de adipato en microorganismos que poseen la vía de adipato a través de acetil-CoA y succinil-CoA. En función de un análisis extenso de los diseños de cepas para la producción de adipato que se describieron en la Tabla 15, se ha identificado un conjunto mínimo de eliminaciones que se necesita para la producción de adipato acoplada al desarrollo en la red. Cabe destacar que se asumió que la fosfoenolpiruvato carboxicina (PPCK) era reversible en la red.

En resumen, se necesitan eliminaciones en la acetaldéhid deshidrogenasa (ADHEr) y lactato deshidrogenasa (LDH_D) para impedir la formación de subproductos en competencia, etanol y lactato. Por lo tanto, el conjunto de eliminaciones mínimo comprende la eliminación de acetaldéhid deshidrogenasa (ADHEr) y lactato deshidrogenasa (LDH_D). Otras cepas de eliminación incluyen una cepa que carece de al menos una de las siguientes actividades además de la acetaldéhid deshidrogenasa (ADHEr) y lactato deshidrogenasa (LDH_D): fumarasa (FUM), fosfogluconato isomerasa (PGI), PEP carboxicina (PPCK), hexocinasa (HEX1), malato deshidrogenasa (MDH) y NADH deshidrogenasa (NADH6).

Se han identificado eliminaciones adicionales mediante el marco OptKnock para mejorar la formación acoplada al desarrollo de adipato. Estas incluyen una o más de las siguientes: enzima málica (ME2), aspartato transaminasa (ASPT), acetato cinasa (ACKr), fosfotransacetilasa (PTAr), piruvato formiato liasa (PFL), transhidrogenasa (THD2) y glutamato deshidrogenasa (GLUDy) y el sistema PTS de absorción de glucosa (GLCpts). Se pueden lograr mejoras adicionales en los rendimientos mediante eliminaciones adicionales en cualquiera de las siguientes enzimas: ATP sintasa (ATPS4r), fosfogluconato deshidratasa (PGDHY), 2-deshidro-3-desoxi-fosfogluconato aldolasa (EDA), 6-fosfogluconolactonasa (PGL), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDHY) y fosfogluconato deshidrogenasa (PGDH).

Cada una de estas cepas puede complementarse con eliminaciones adicionales si se determina que los diseños de cepas previstos no acoplan de manera suficiente la formación del producto a la formación de biomasa o para un aumento de la eficiencia del acoplamiento de la formación del producto a la formación de biomasa. De manera alternativa, algunas otras enzimas que hasta donde se sabe no poseen actividad significativa en las condiciones de desarrollo pueden volverse activas debido a la evolución adaptativa o mutagénesis aleatoria. Esas actividades enzimáticas también pueden inactivarse. Sin embargo, la lista de conjuntos de eliminación de genes que se proporciona en la presente memoria sirve como un buen punto de partida para la construcción de cepas de producción de adipato acoplada al desarrollo con alto rendimiento.

Conjuntos de eliminaciones de genes mínimos para la producción mejorada de HMDA. Anteriormente se describieron estrategias de diseño de cepas para mejorar la producción de hexametildiamina (HMDA) en microorganismos que poseen la vía de HMDA a través de acetil-CoA y succinil-CoA. En función de un análisis extenso de los diseños de cepas para la producción de HMDA que se describieron en la Tabla 16, se ha identificado un conjunto mínimo de eliminaciones que se necesita para la producción de HMDA acoplada al desarrollo en la red. Cabe destacar que se asumió que la fosfoenolpiruvato carboxicina (PPCK) era reversible en la red.

En resumen, se necesitan eliminaciones en la acetaldéhid deshidrogenasa (ADHEr) y lactato deshidrogenasa (LDH_D) para impedir la formación de subproductos en competencia, etanol y lactato. Por lo tanto, el conjunto de eliminaciones mínimo comprende la eliminación de acetaldéhid deshidrogenasa (ADHEr) y lactato deshidrogenasa (LDH_D). Otras cepas de eliminación incluyen una cepa que carece de al menos una de las siguientes actividades además de la acetaldéhid deshidrogenasa (ADHEr) y lactato deshidrogenasa (LDH_D): fumarato reductasa (FRD2), fumarasa (FUM), fosfogluconato isomerasa (PGI) o PEP carboxicina (PPCK).

Se han identificado eliminaciones adicionales mediante el marco OptKnock para mejorar la formación acoplada al desarrollo de HMDA. Estas incluyen una o más de las siguientes: hexocinasa (HEX1), enzima málica (ME2), malato deshidrogenasa (MDH), aspartato transaminasa (ASPT), acetato cinasa (ACKr), fosfotransacetilasa (PTAr), piruvato formiato liasa (PFL) y piruvato cinasa (PYK). Los rendimientos de HMDA pueden mejorarse además mediante la eliminación adicional de una o más de las siguientes enzimas: transhidrogenasa (THD2), glutamato deshidrogenasa (GLUDy), ATP sintasa (ATPS4r), GLCpts (sistema PTS de absorción de glucosa), PGDHY (fosfogluconato deshidratasa) y EDA (2-deshidro-3-desoxi-fosfogluconato aldolasa).

Cada una de estas cepas puede complementarse con eliminaciones adicionales si se determina que los diseños de cepas previstos no acoplan de manera suficiente la formación del producto a la formación de biomasa o para un aumento de la eficiencia del acoplamiento de la formación del producto a la formación de biomasa. De manera alternativa, algunas otras enzimas que hasta donde se sabe no poseen actividad significativa en las condiciones de desarrollo pueden volverse activas debido a la evolución adaptativa o mutagénesis aleatoria. Esas actividades enzimáticas también pueden inactivarse. Por ejemplo, la succinato deshidrogenasa que oxida succinato para formar fumarato y se sabe que presenta actividad solamente en condiciones aerobias puede asumir una actividad significativa incluso en condiciones anaerobias y, por lo tanto, esa actividad puede inactivarse. Sin embargo, la lista de conjuntos de eliminación de genes que se proporciona en la presente memoria sirve como un buen punto de partida para la construcción de cepas de producción de HMDA acoplada al desarrollo con alto rendimiento.

Diseño de cepas Optknock para la producción acoplada al desarrollo de ácido adípico. A continuación, se describirá

una ejemplificación adicional de una estrategia de eliminación para modificar genéticamente una cepa para sintetizar adipato mediante el uso de una vía de succinil-CoA. Todos los diseños acoplados al desarrollo de alta prioridad para la síntesis de adipato se construyen sobre la base de una cepa que carece de actividades de acetilaldehído-CoA deshidrogenasa (ADHEr) y lactato deshidrogenasa (LDH_D) para impedir la formación de subproductos de fermentación, como se describió anteriormente. La eliminación adicional de malato deshidrogenasa (MDH) también reduce la producción de subproductos. La Figura 35 muestra características de la producción de adipato acoplada al desarrollo de cepas de alta prioridad (en gris) en comparación con las de la *E. coli* de tipo salvaje (en negro). Se presupone una tasa de absorción de glucosa de 10 mmol/gDW/h. Se prevé que una cepa con deficiencia en las actividades de ADHEr, LDH_D y MDH (Diseño 1 en la Figura 35) logre un rendimiento de adipato de 0,51 gramos de adipato por gramo de glucosa utilizado (g/g) con el rendimiento máximo de biomasa.

Los Diseños 2-4 se construyen con el Diseño 1 como un diseño base. El Diseño 2 implica la remoción de fosfoenolpiruvato carboxicinas (PPCK). Este diseño mejora el rendimiento de adipato hasta 3,6 g/g con el rendimiento máximo de biomasa. La eliminación adicional de la actividad de piruvato formiato liasa (PFLi) en el Diseño 3 mejora de manera adicional el rendimiento mediante la prevención de la secreción de formiato como un subproducto. El rendimiento de adipato previsto de este diseño es de 5,8 g/g. El Diseño 4 presenta la eliminación de NAD(P) transhidrogenasa (TIID2) además de ADHEr, LDH_D, MDH, PPCK y PFLi. Esto produce un rendimiento de adipato de 6,8 g/g con una tasa de desarrollo de 0,117 1/h. El Diseño 4 sirve para acoplar estrechamente la producción de adipato al desarrollo celular y lograr al mismo tiempo un 91 % del rendimiento máximo teórico.

Ejemplo XXXI

Biosíntesis de adipato semialdehído a partir de adipato y 6-aminocaproato semialdehído a partir de 6-aminocaproato

Este Ejemplo describe la producción biosintética de adipato semialdehído a partir de adipato y de 6-aminocaproato semialdehído a partir de 6-aminocaproato.

La transformación de adipato a adipato semialdehído (Figura 25, etapa X) puede ser catalizada por las ácido carboxílico reductasas (CAR). Esto es demostrado por los siguientes resultados: Células químicamente competentes de *E. coli*, cepa ECKh-422 ($\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta pflB$, $\Delta lpdA$, $lpaA$ integrado de *Klebsiella pneumoniae*:E354K, Δmdh , $\Delta arcA$, $gltA$ -R163L) con pKJ33s se transformaron con plásmidos pZs*13s que albergan diversos genes CAR (Tabla 17) o un plásmido de control sin ningún gen CAR. Se seleccionaron colonias individuales de las transformaciones y se desarrollaron durante la noche en LB a 37 °C con 100 µg/mL de carbenicilina y 10 µg/mL de cloranfenicol. Las células se subcultivaron con una relación de 1:50 y se indujeron con IPTG 200 µM con una OD600 de 0,6. Las células se incubaron durante 5 horas a 37 °C antes de recolectarse. Los cultivos celulares se dividieron en alícuotas en muestras de 15 mL y se peletizaron. Los pelets celulares se almacenaron a -80 °C hasta usarse para el ensayo.

Tabla 17. Genes CAR usados en este ejemplo.

Proteína	N.º GenBank	Número GI	Organismo
720	AAR91681.1	40796035	<i>Nocardia iowensis</i>
889	YP_887275.1	118473501	<i>Mycobacterium smegmatis</i> cepa MC2 155
890	YP_889972.1	118469671	<i>Mycobacterium smegmatis</i> cepa MC2 155
891	NP_959974.1	41407138	<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i> K-10
892	YP_001850422.1	183982131	<i>Mycobacterium marinum</i> M

Los pelets celulares se lisaron mediante la adición de 500 µL de B-PER con 0,5 µL de lisozima y benzonasa. Se midió la actividad de CAR mediante la adición de 2 µL de lisado bruto a la solución de ensayo de Tris 50 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, glicerol al 10 % (v/v), ATP 1 mM, NADPH 0,5 mM y adipato 20 mM o 6-aminocaproato 50 mM en una microplaca con formato de 96 pocillos con un volumen total de 250 µL. La oxidación de NADPH para formar NADP⁺ se supervisó con una absorbancia de 340 nm durante 30 minutos a temperatura ambiente. La tasa de eliminación de NADPH se usó para calcular la actividad de las diversas proteínas CAR. La concentración total de proteína de cada lisado se determinó mediante Bradford, y la actividad se normalizó hasta la concentración de proteína total (Unidades/mg).

Transformación de adipato en adipato semialdehído (Figura 24, etapa). Como se muestra en la Figura 36, se observaron actividades de CAR significativas mediante el uso de adipato como sustrato con los genes CAR 889 y

891, mientras que el lisado de control no mostró actividad de CAR.

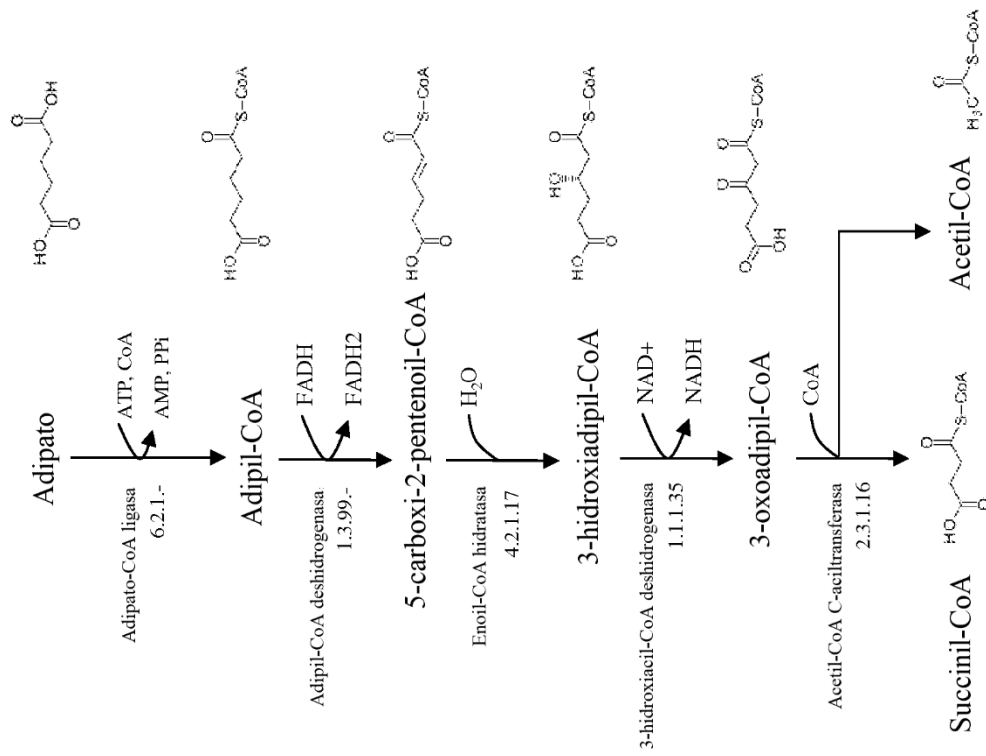
Además, se configuró una reacción que consistió en 500 µL de Tris 50 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, glicerol al 10 % (v/v), ATP 5 mM, NADPH 3 mM y adipato 20 mM. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se detuvo mediante la adición de ácido fórmico al 1 %. Luego la muestra se centrifugó y el sobrenadante se analizó mediante LC-MS. Se detectó un nivel bajo de adipato semialdehído en mM que confirmó la transformación de adipato a adipato semialdehído.

Transformación de 6-aminocaproato a 6-aminocaproato semialdehído. Como se muestra en la Figura 37, se observaron actividades de CAR significativas mediante el uso de 6-aminocaproato como sustrato con varios genes CAR 720, 889, 890, 891 y 892, mientras que el lisado de control no mostró actividad de CAR. Estos resultados indican la transformación de 6-aminocaproato a 6-aminocaproato semialdehído.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un organismo microbiano de origen no natural con una vía de hexametilendiamina que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la vía de hexametilendiamina expresada en una cantidad suficiente como para producir hexametilendiamina, en donde dicha vía de hexametilendiamina comprende convertir 6-aminocaproato en hexametilendiamina a través de semialdehído 6-aminocaproico, mediante el uso de las siguientes enzimas:
- A)
- a) 6-aminocaproil-CoA/acil-CoA transferasa o 6-aminocaproil-CoA sintasa;
- b) 6-aminocaproil-CoA reductasa (formadora de aldehído); y
- 10 c) hexametilendiamina transaminasa o hexametilendiamina deshidrogenasa; o
- B)
- a') una 6-aminocaproato reductasa; y
- b') un semialdehído 6-aminocaproico aminotransferasa o una semialdehído 6-aminocaproico oxidoreductasa (de aminación).
- 15 **2.** El organismo microbiano de origen no natural de la reivindicación 1, alternativa A, en donde dicho organismo microbiano comprende además una vía de ácido 6-aminocaproico.
- 3.** El organismo microbiano de origen no natural de la reivindicación 2, en donde dicha vía de ácido 6-aminocaproico comprende aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA; y transaminasa o 6-aminocaproato deshidrogenasa.
- 20 **4.** El organismo microbiano de origen no natural de la reivindicación 2, en donde dicha vía de ácido 6-aminocaproico comprende
- a) 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA tiolasa;
- b) 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA/acil-CoA transferasa, 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA sintasa o 3-oxo-6-aminohexanoil-CoA hidrolasa;
- c) 3-oxo-6-aminohexanoato reductasa;
- 25 d) 3-hidroxi-6-aminohexanoato deshidratasa; y
- e) 6-aminohex-2-enoato reductasa.
- 5.** El organismo microbiano de origen no natural de la reivindicación 1, en donde la vía de ácido 6-aminocaproico y la vía de hexametilendiamina juntas comprenden:
- a) 3-oxoadipil-CoA tiolasa,
- 30 b) 3-oxoadipil-CoA reductasa,
- c) 3-hidroxiadipil-CoA deshidratasa,
- d) 5-carboxi-2-pentenoil-CoA reductasa,
- e) adipil-CoA reductasa (formadora de aldehído),
- f) 6-aminocaproato transaminasa o 6-aminocaproato deshidrogenasa,
- 35 g) 6-aminocaproil-CoA/acil-CoA transferasa o 6-aminocaproil-CoA sintasa,
- h) 6-aminocaproil-CoA reductasa (formadora de aldehído) e
- i) hexametilendiamina transaminasa o hexametilendiamina deshidrogenasa.
- 6.** El organismo microbiano de origen no natural de la reivindicación 1, en donde dicho organismo microbiano de origen no natural comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la vía de hexametilendiamina.
- 40 **7.** El organismo microbiano de origen no natural de la reivindicación 6, en donde dicho organismo microbiano de origen no natural comprende ácidos nucleicos exógenos que codifican cada una de las enzimas según la alternativa A o B de la reivindicación 1.

8. El organismo microbiano de origen no natural de la reivindicación 1, en donde dicho al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.
9. El organismo microbiano de origen no natural de la reivindicación 1, en donde dicho organismo microbiano de origen no natural se encuentra en un medio de cultivo sustancialmente anaerobio.
- 5 10. Un método para producir hexametilendiamina, que comprende cultivar el organismo microbiano de origen no natural de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en condiciones y durante un período de tiempo suficiente como para producir hexametilendiamina.
11. El método de la reivindicación 10, en donde dichas condiciones comprenden además un osmoprotector.
12. El método de la reivindicación 11, en donde dicho osmoprotector es glicina betaína.

**FIGURA 1**

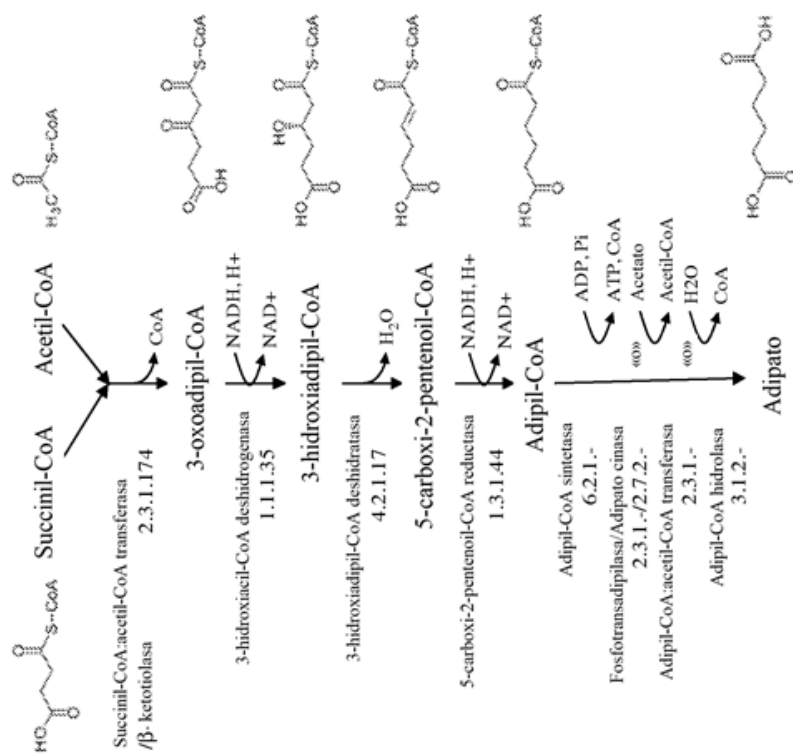


FIGURA 2

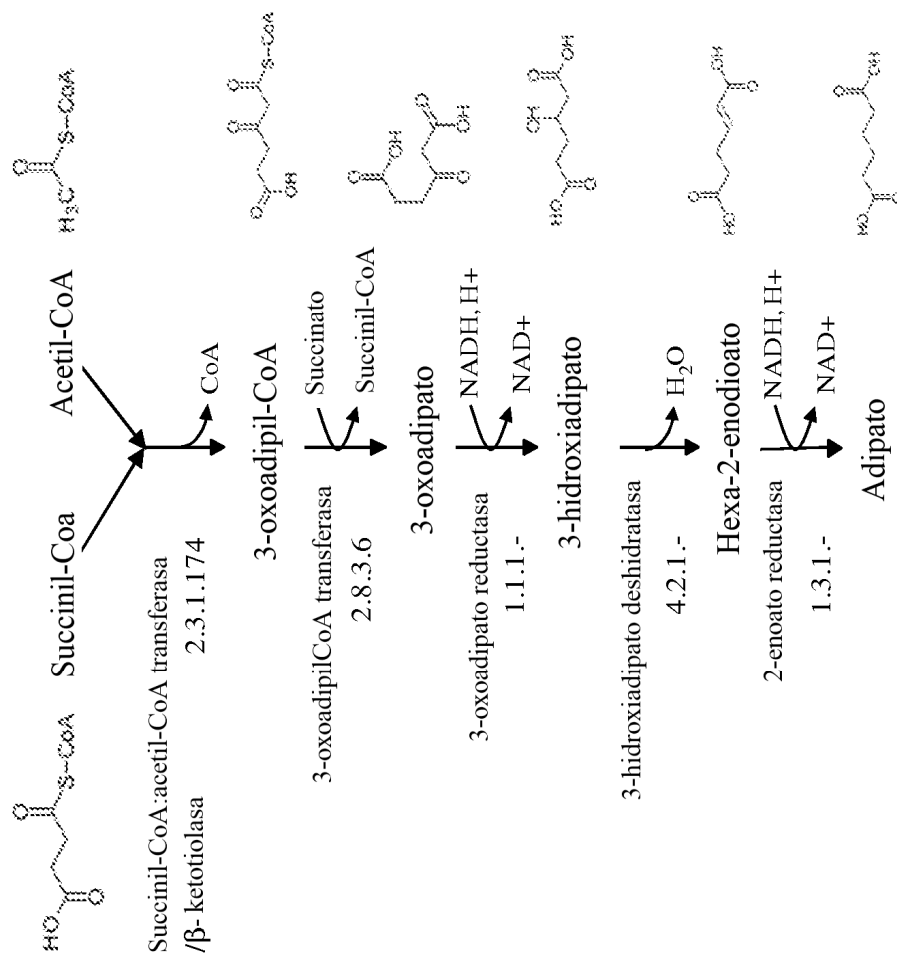


FIGURA 3

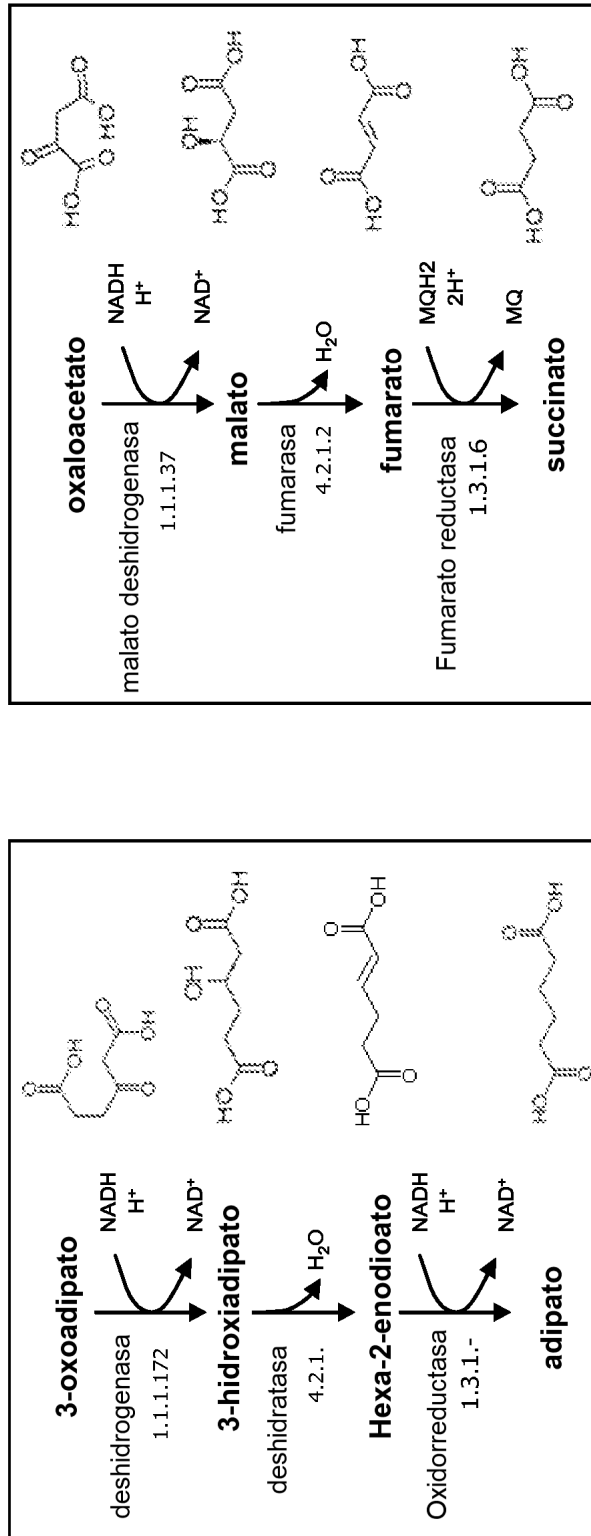


FIGURA 4

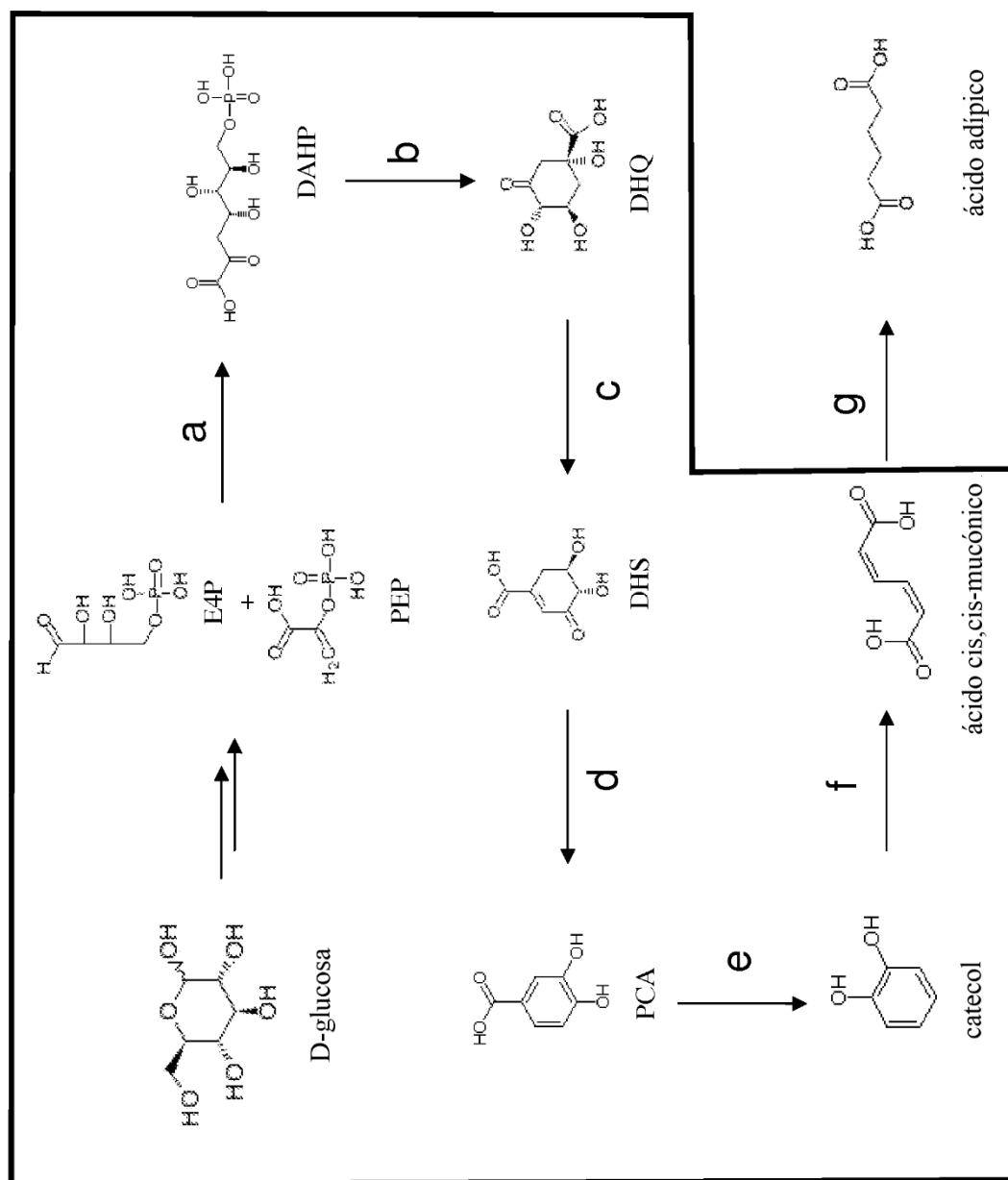


FIGURA 5

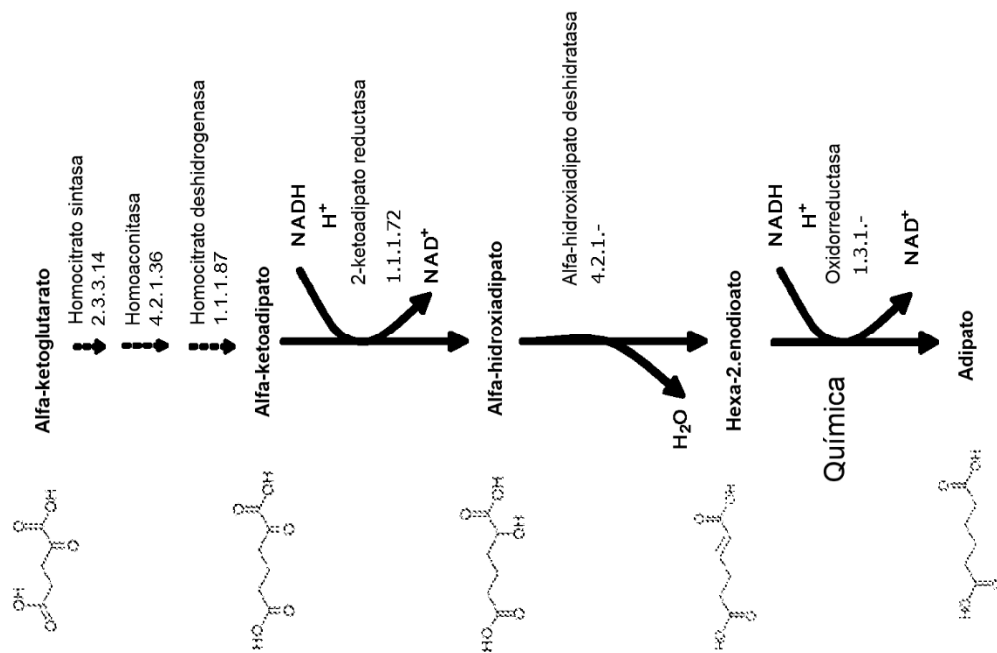


FIGURA 6

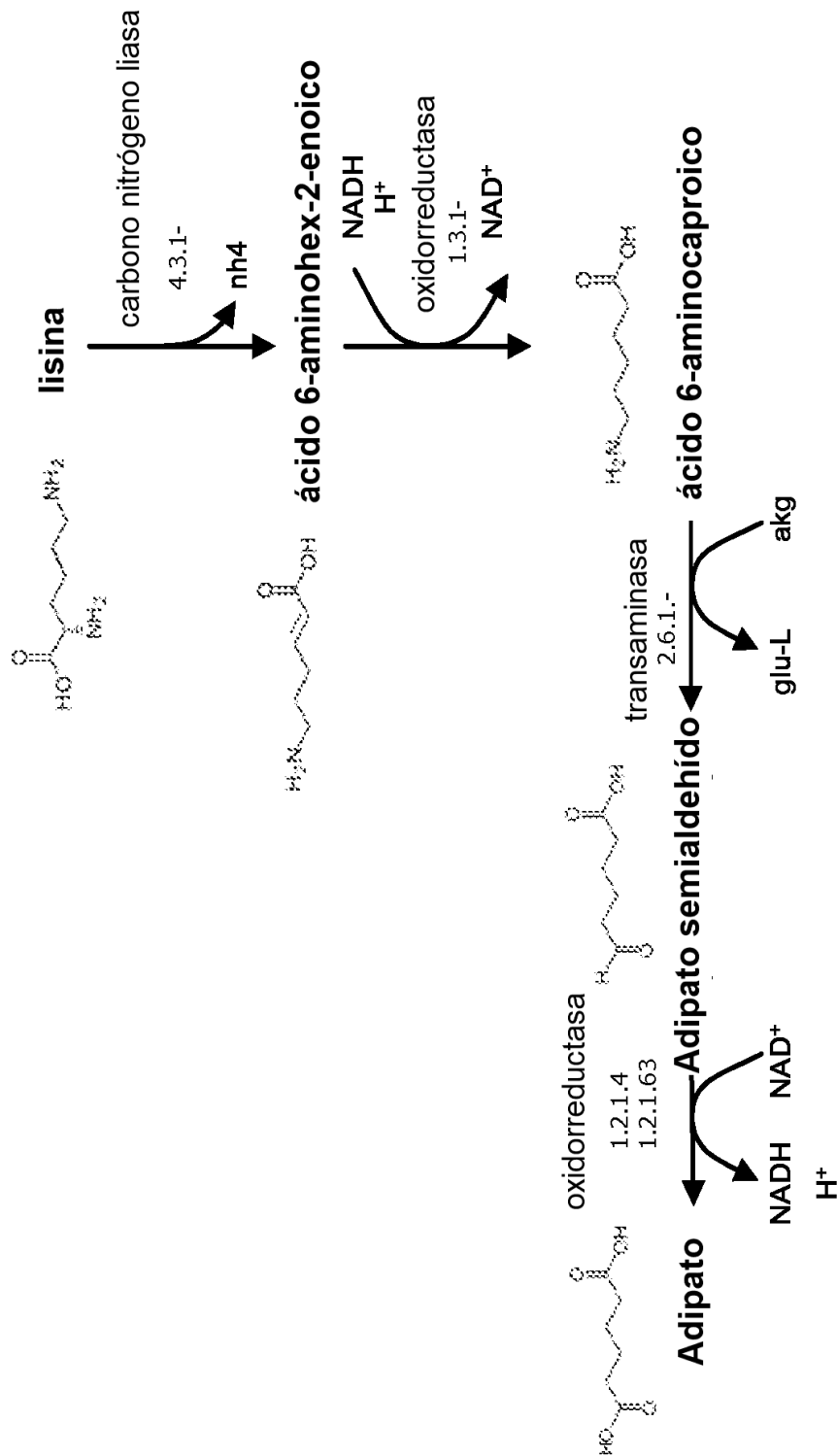


FIGURA 7

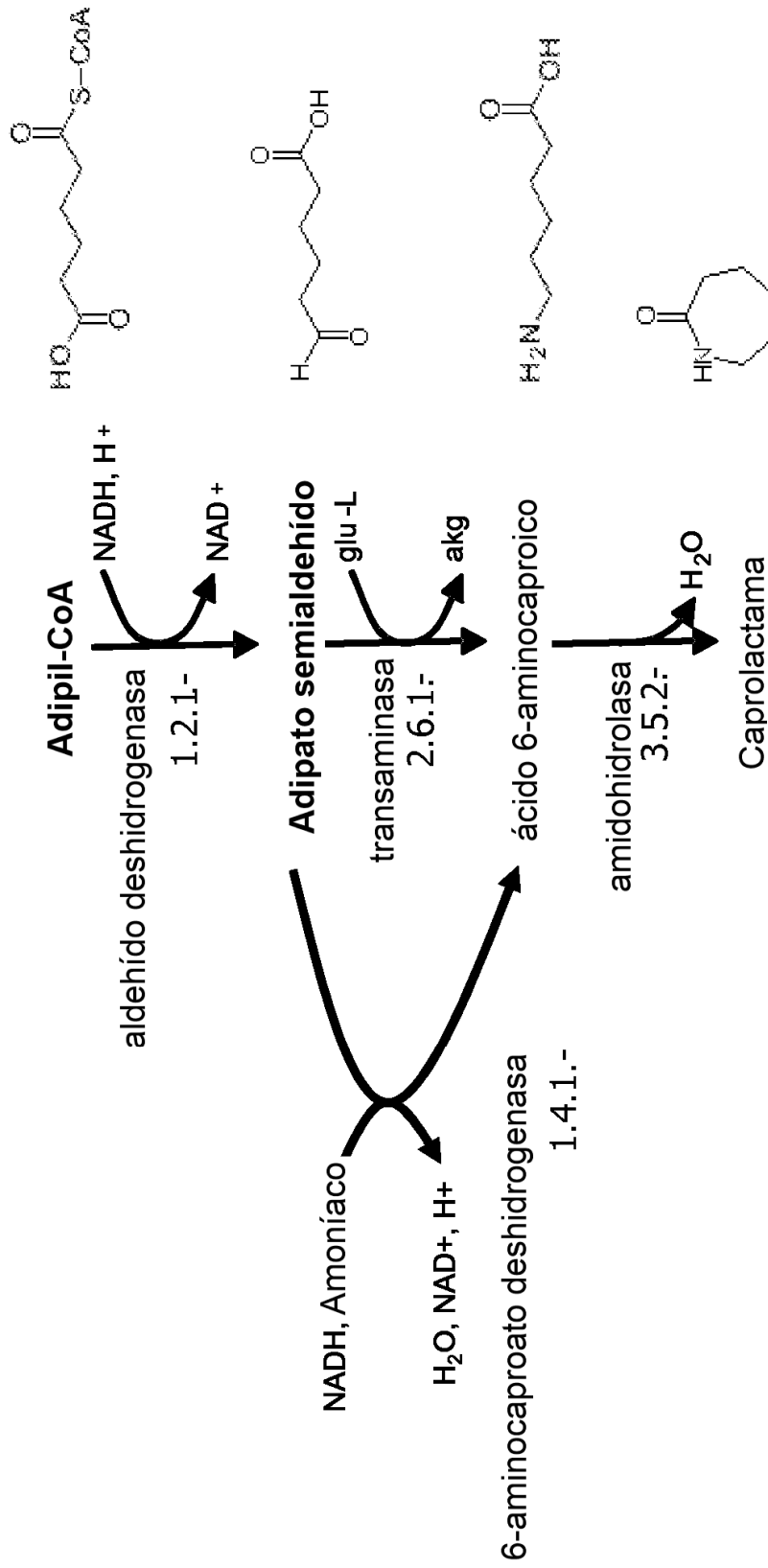


FIGURA 8

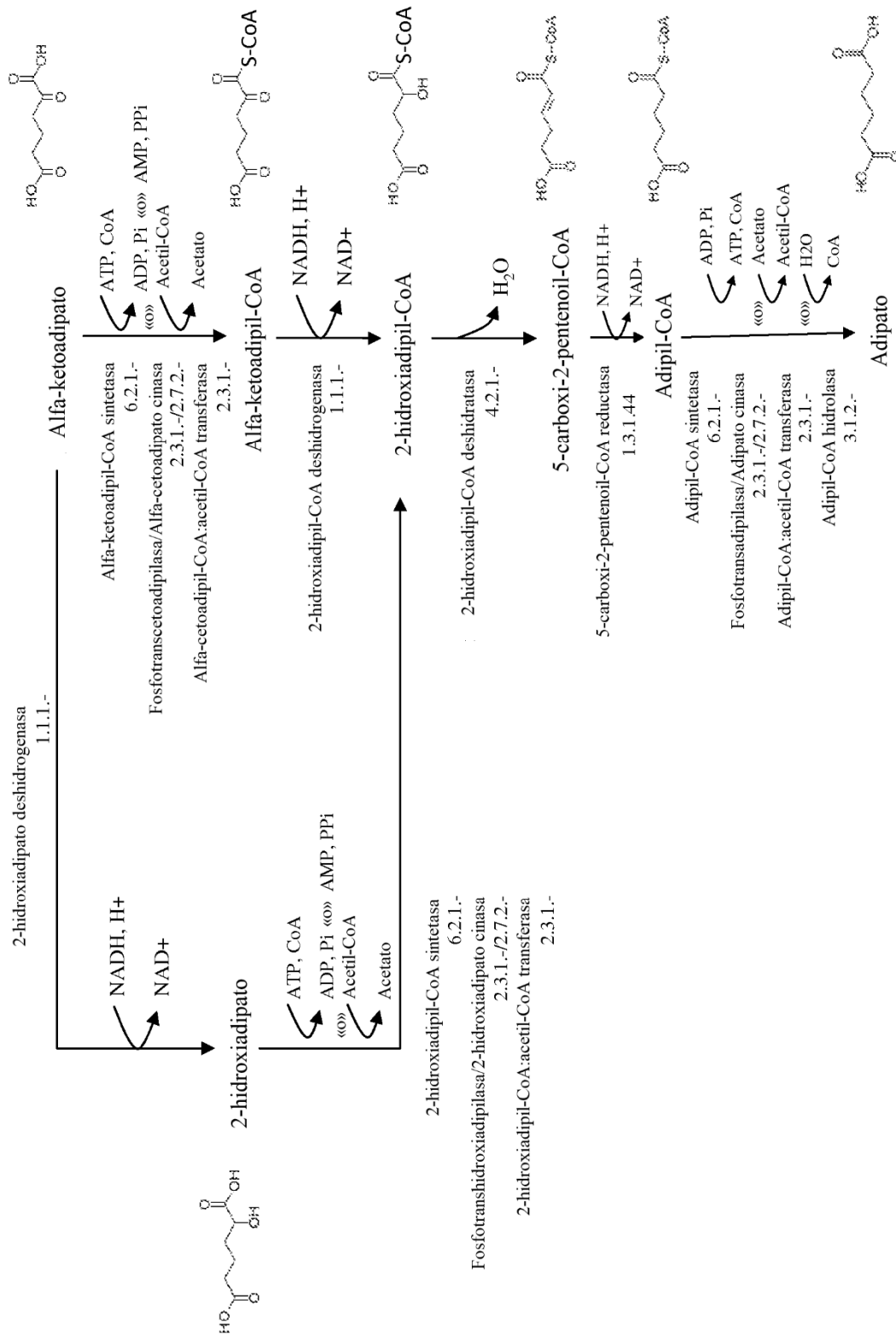


FIGURA 9

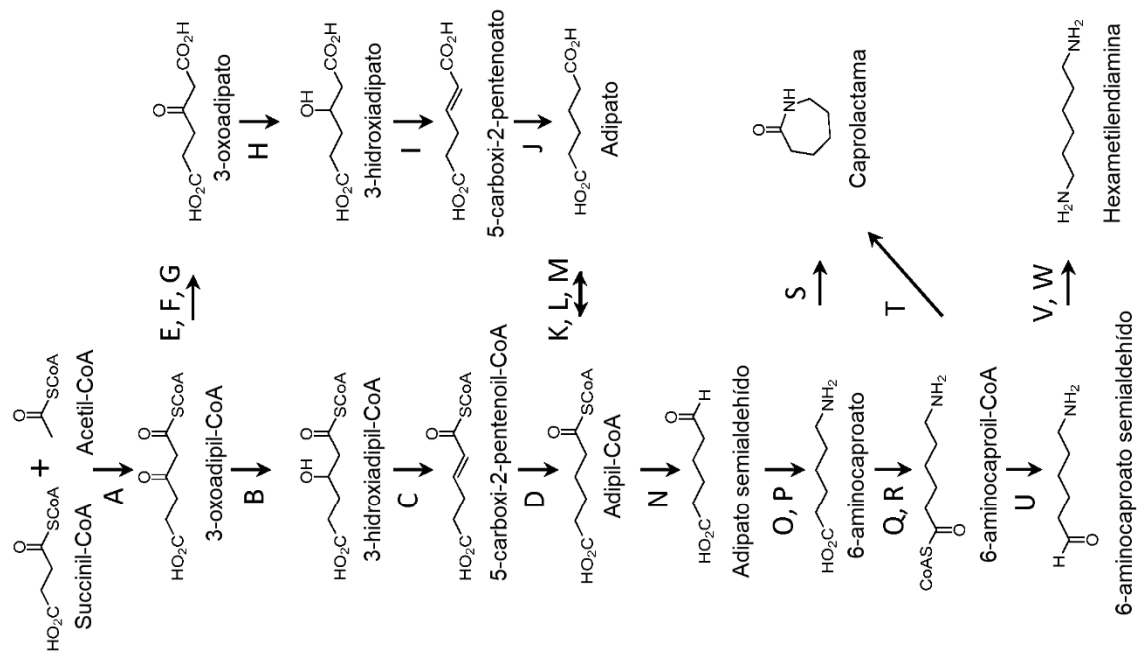


FIGURA 10

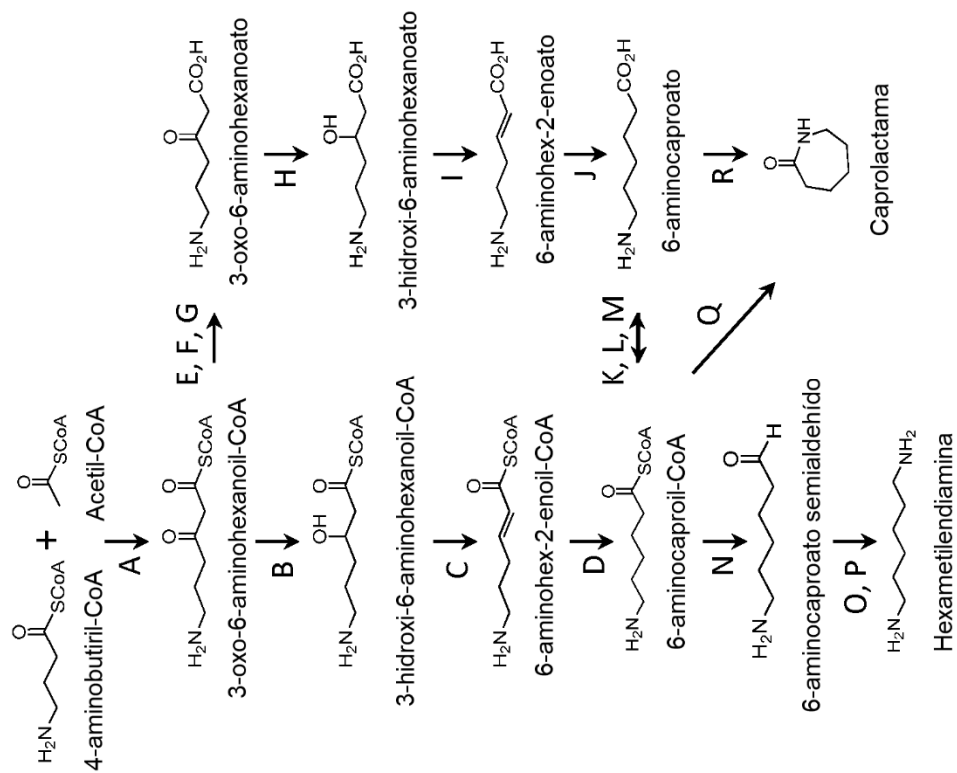


FIGURA 11

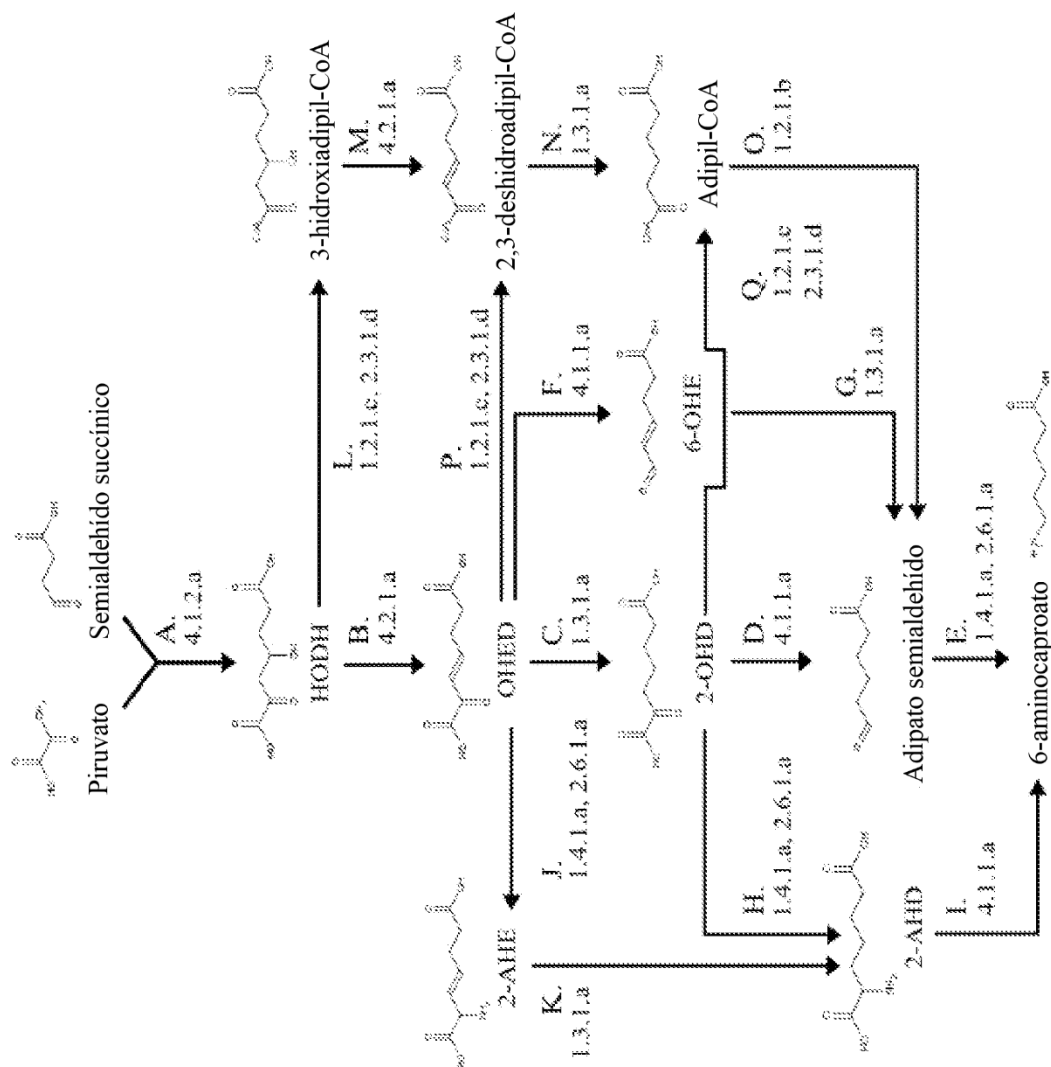


FIGURA 12

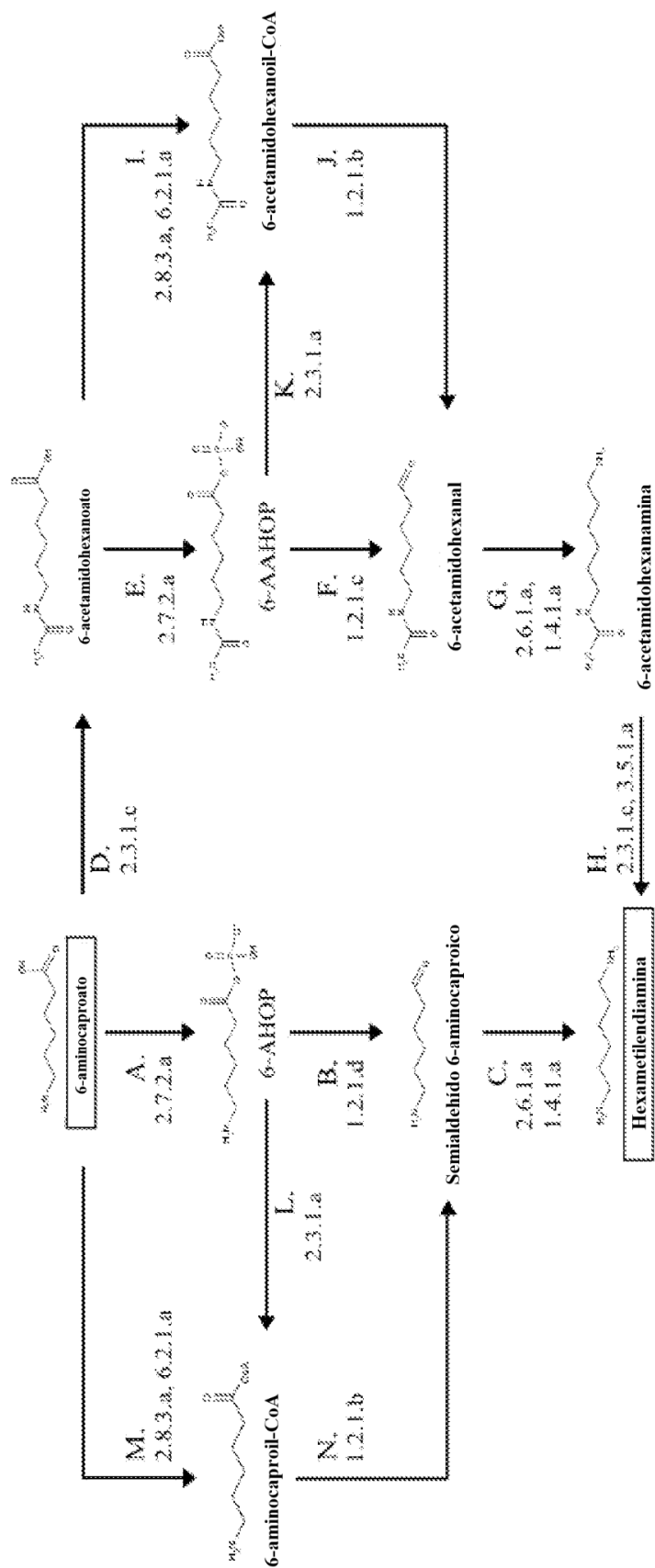


FIGURA 13

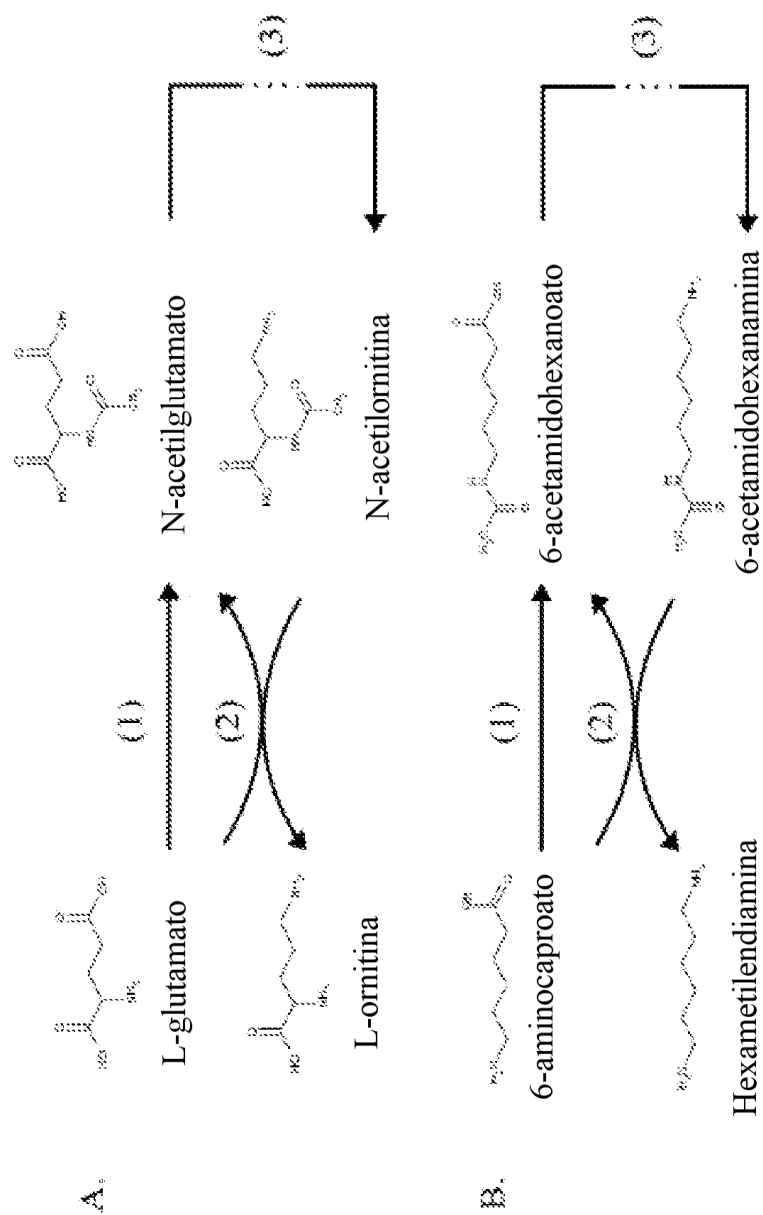


FIGURA 14

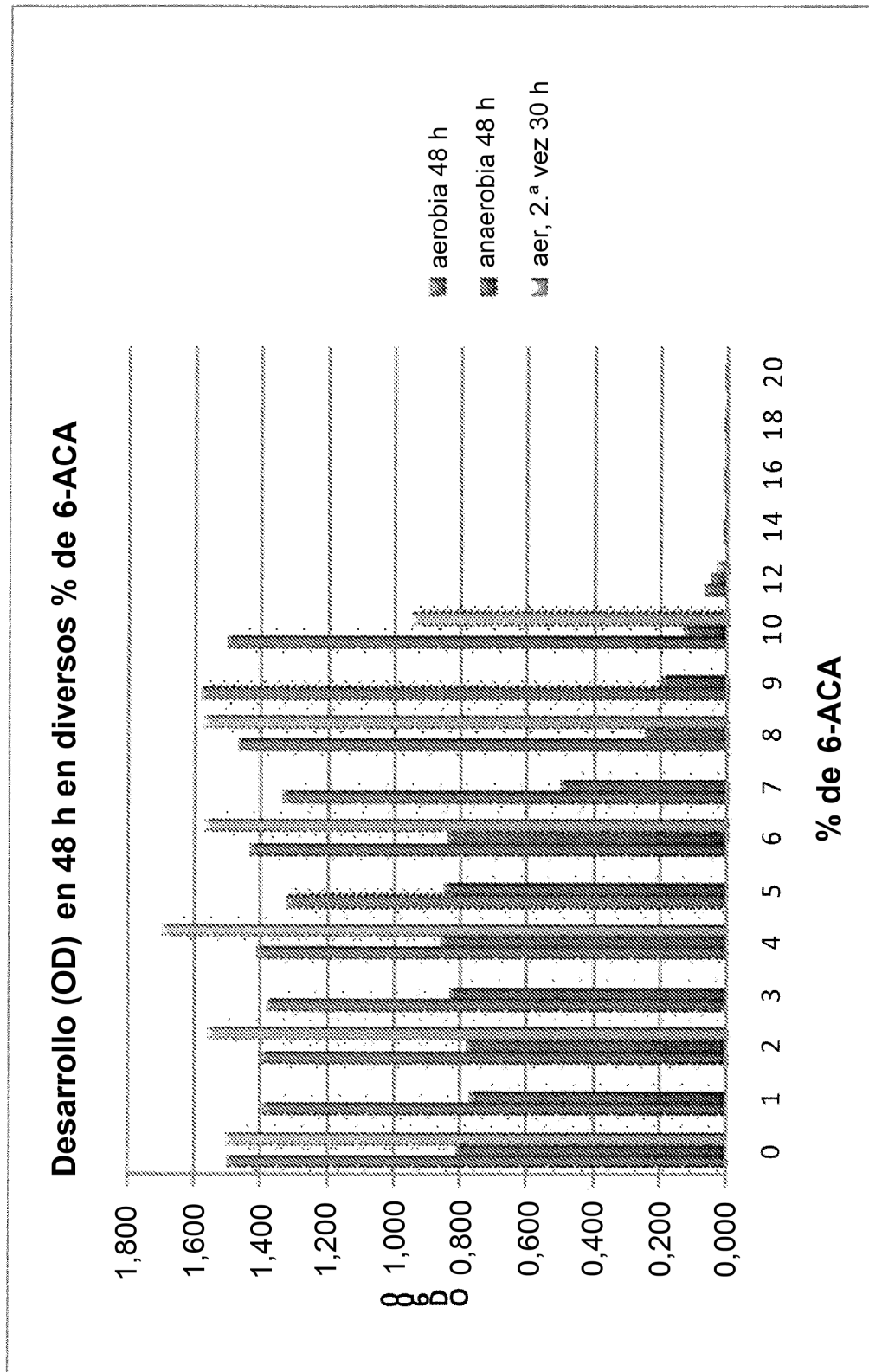


FIGURA 15

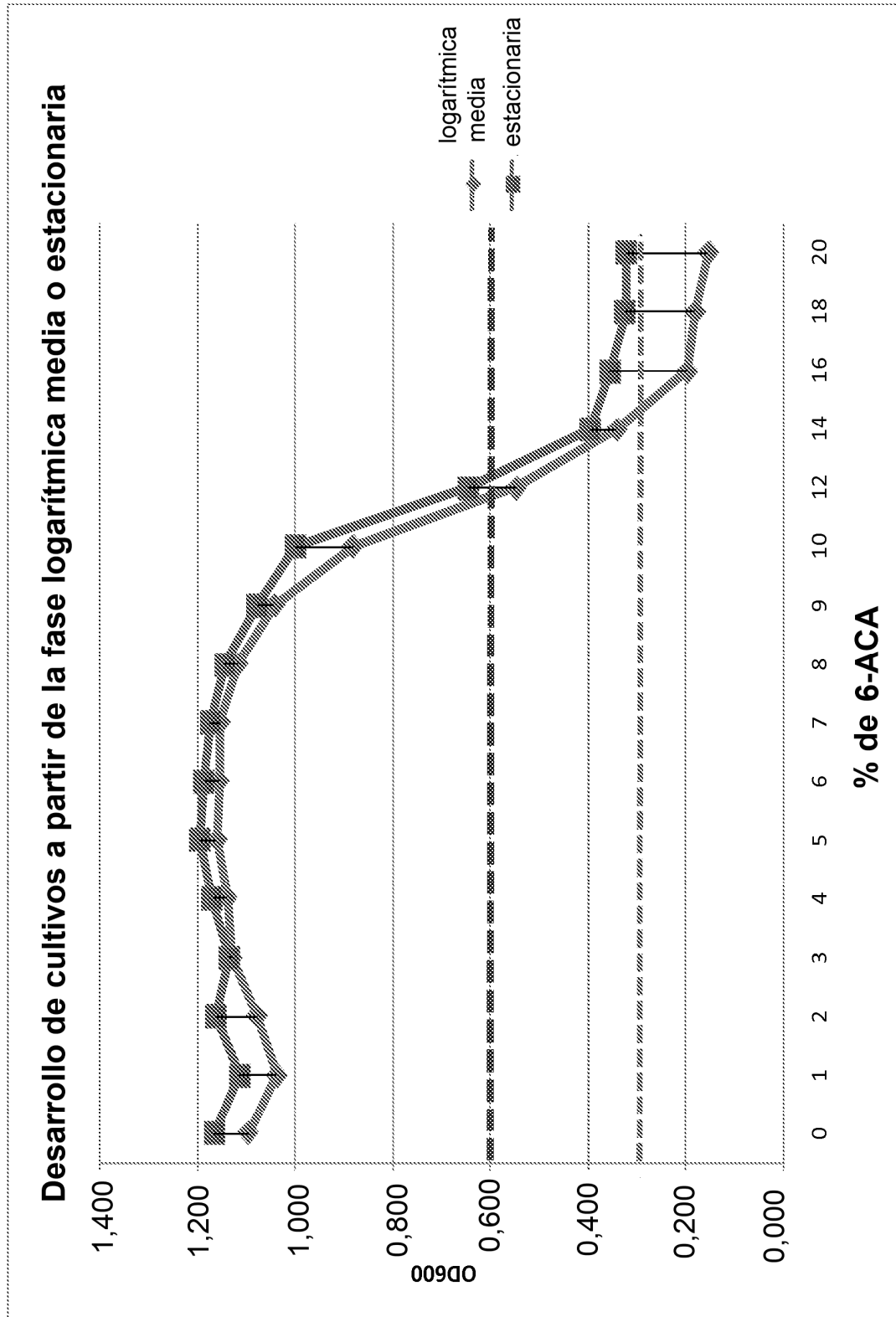


FIGURA 16

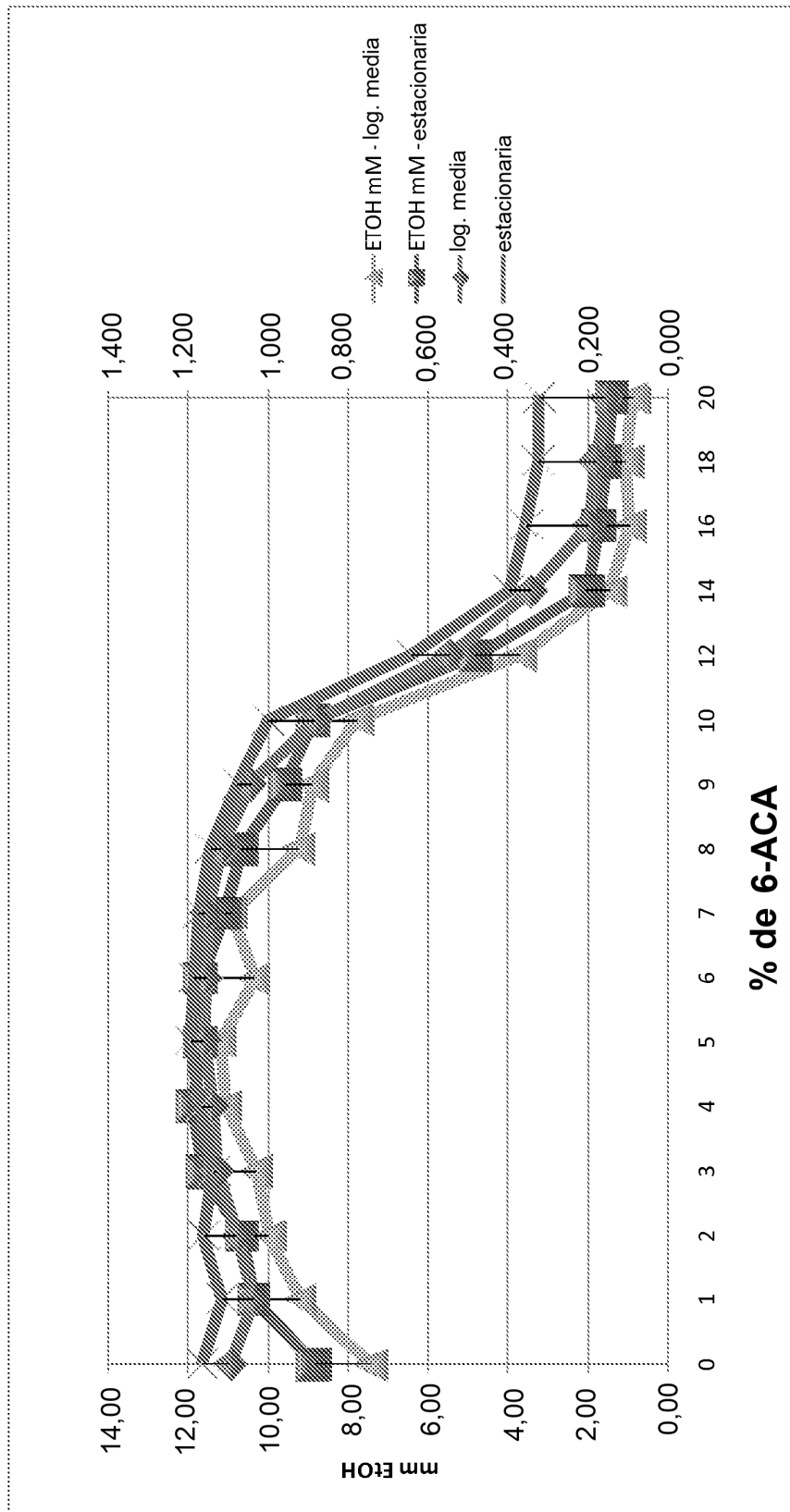
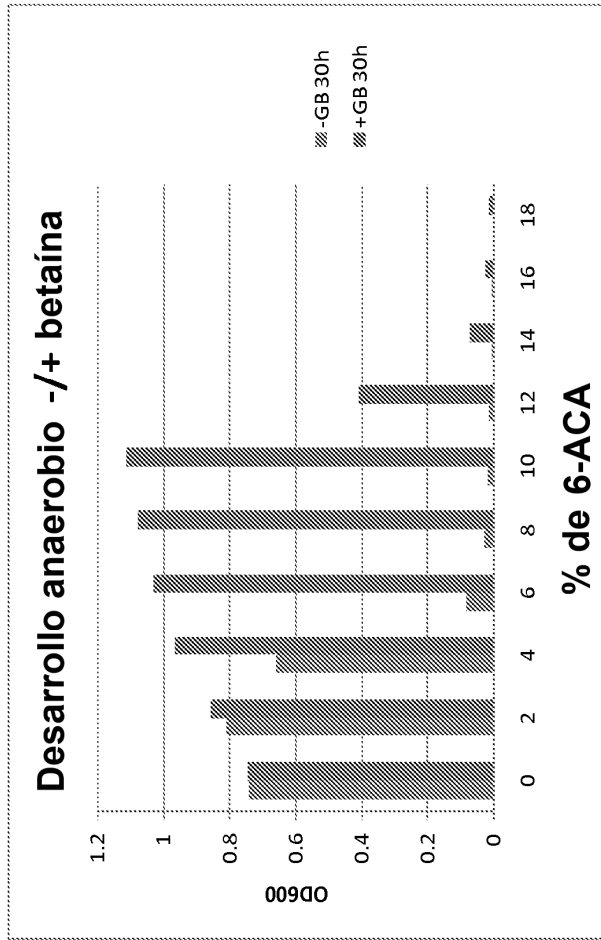


FIGURA 17

A



B

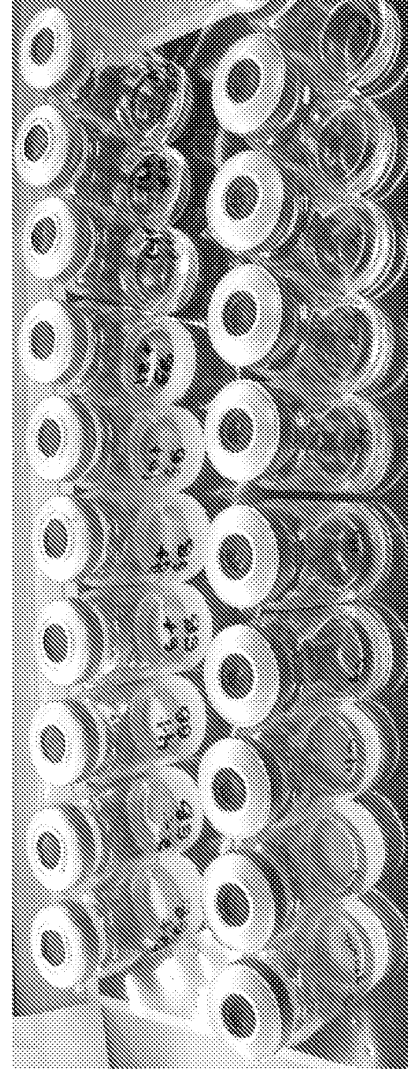


FIGURA 18

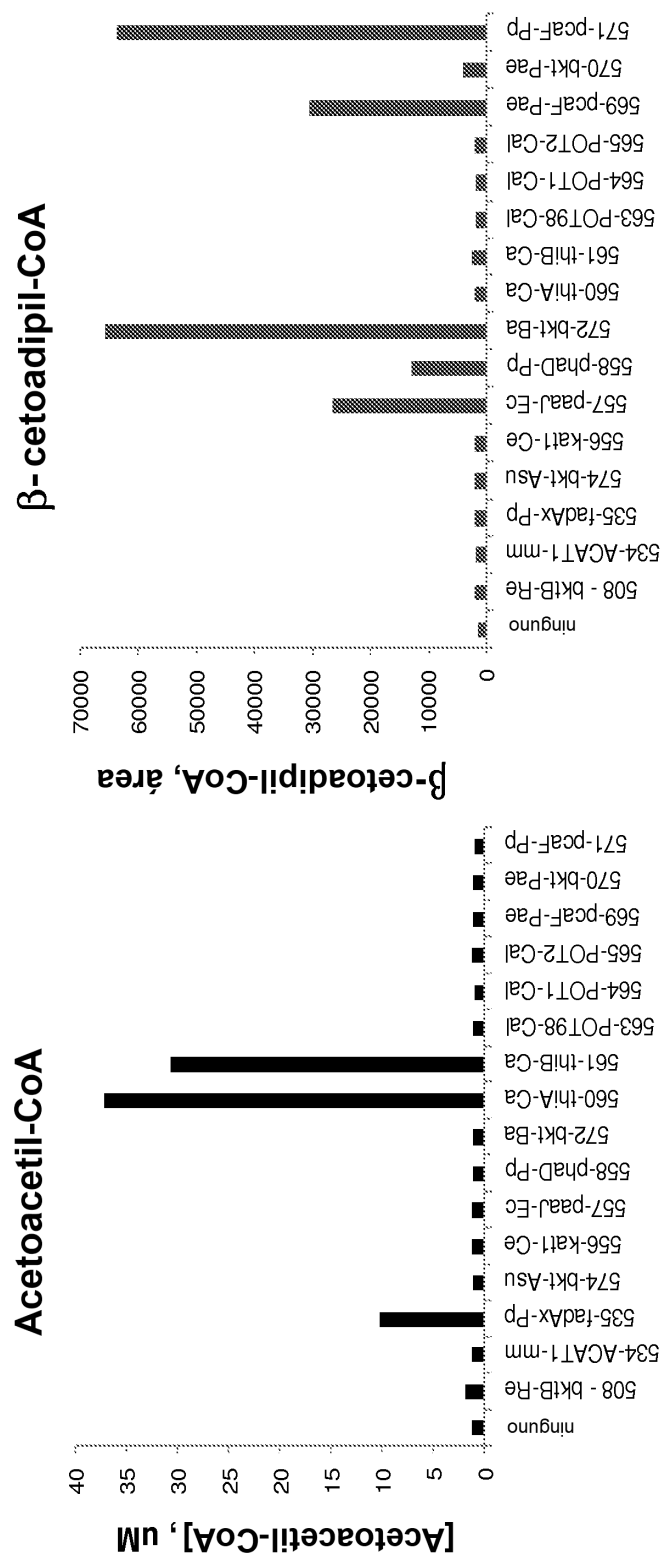


FIGURA 19

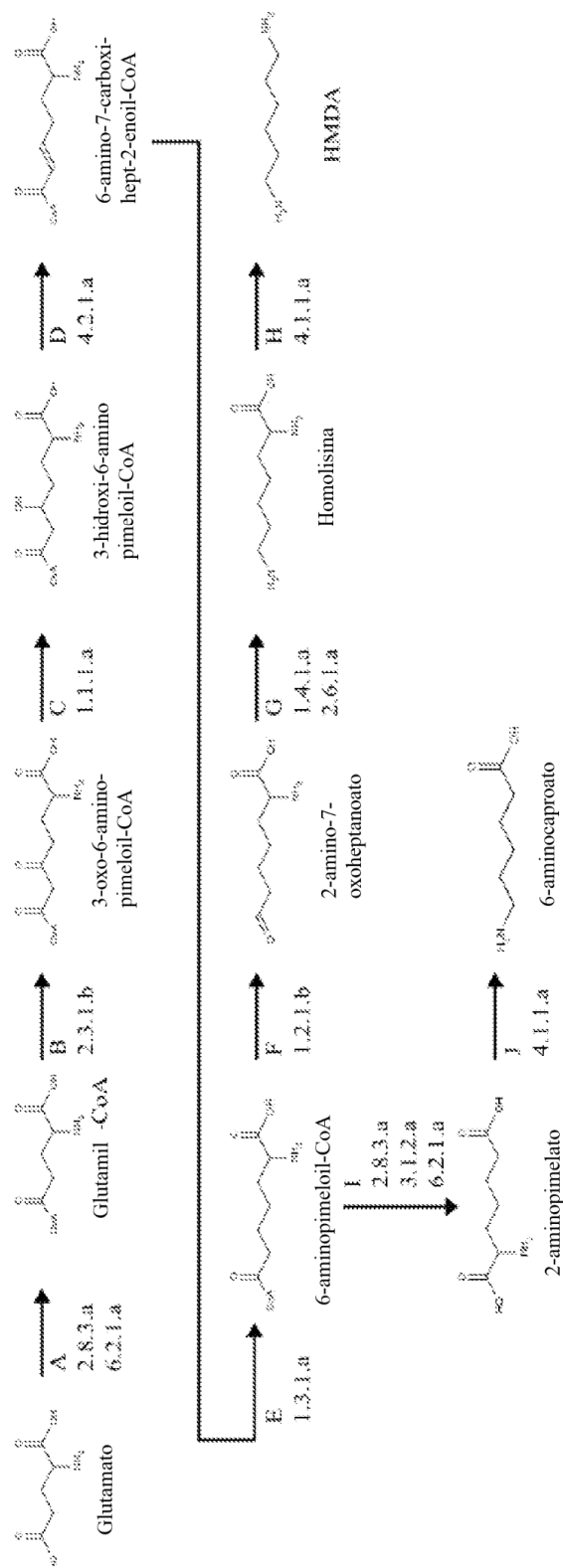


FIGURA 20

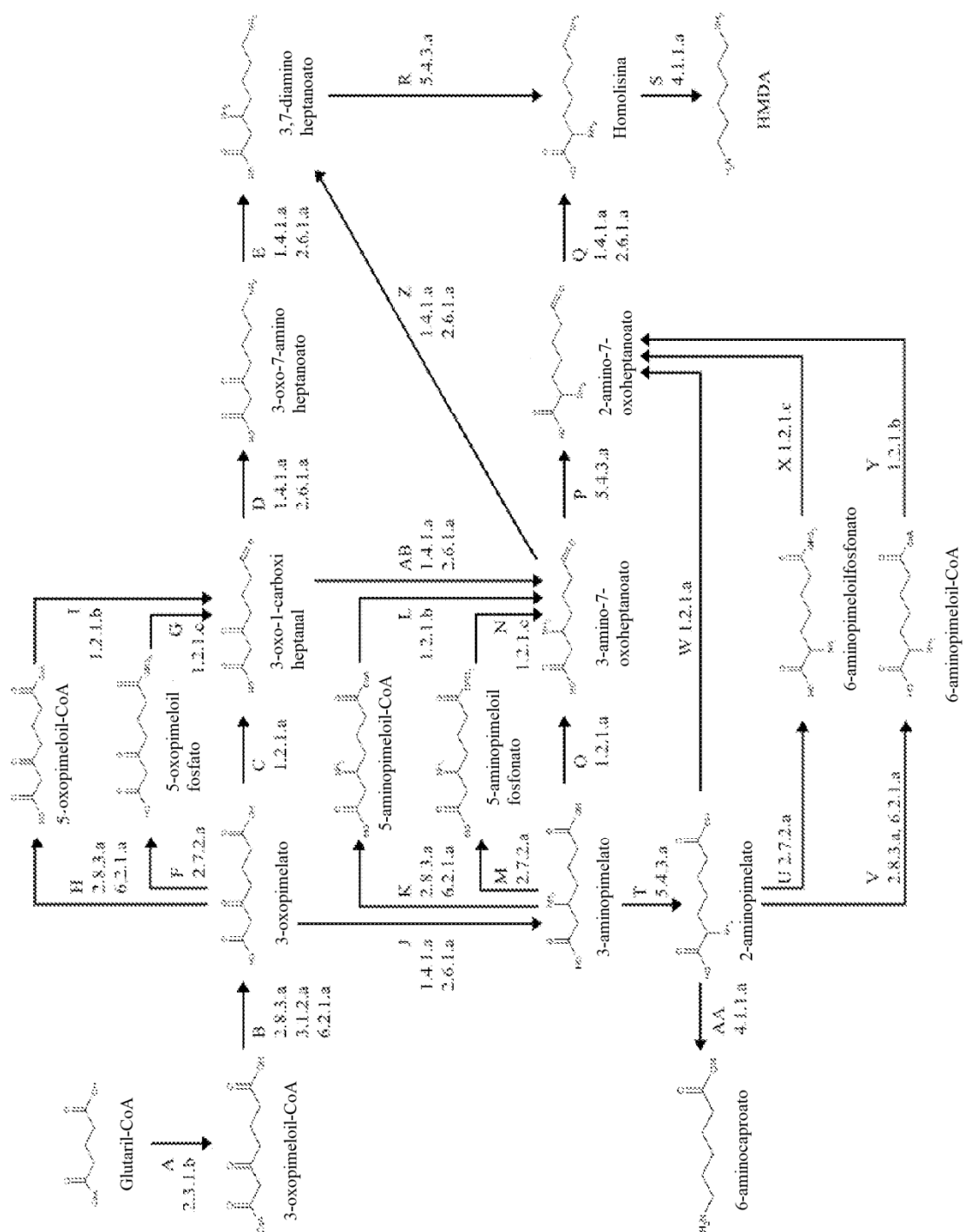


FIGURA 21

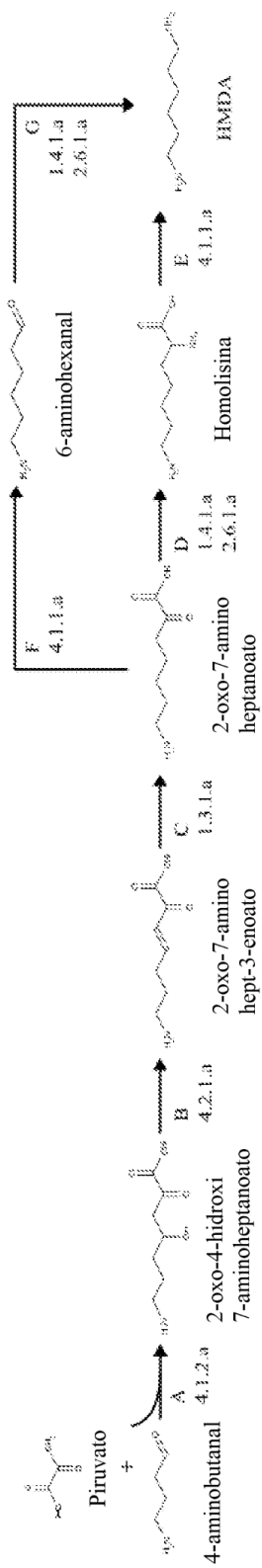
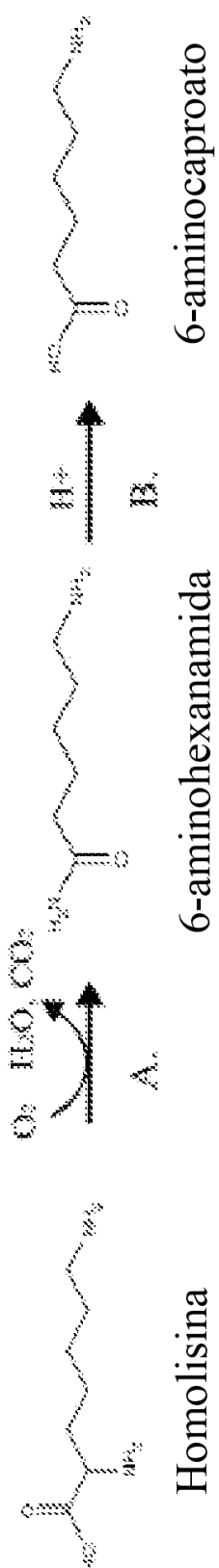


FIGURA 22

**FIGURA 23**

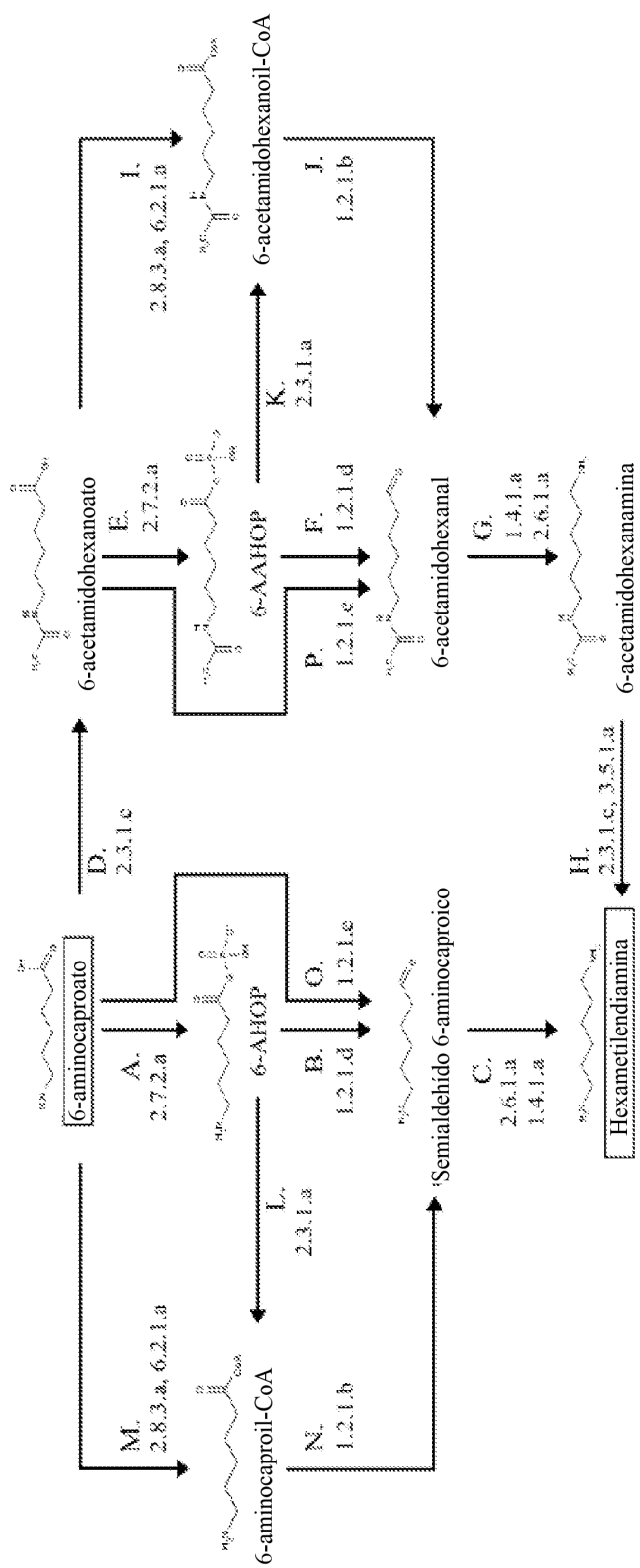


FIGURA 24

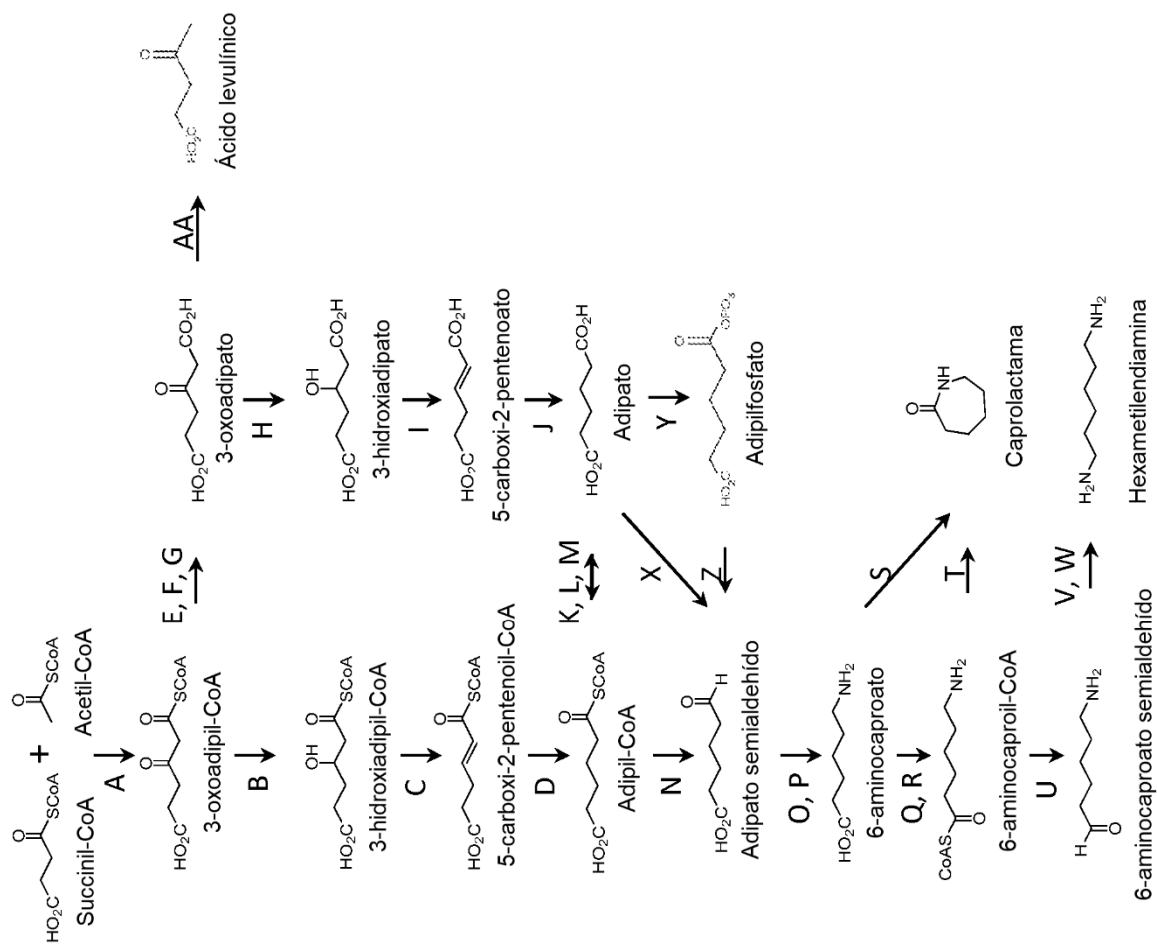


FIGURA 25

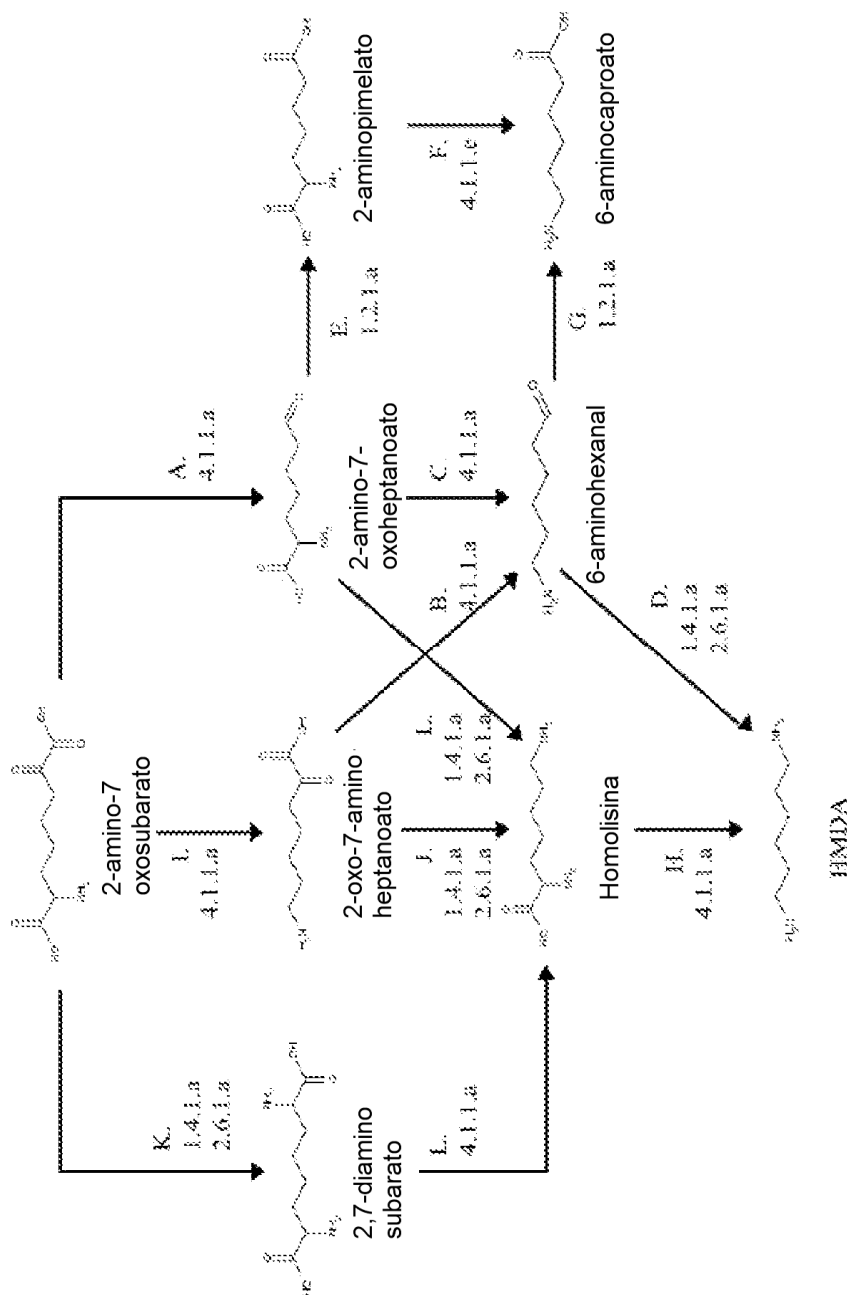


FIGURA 26

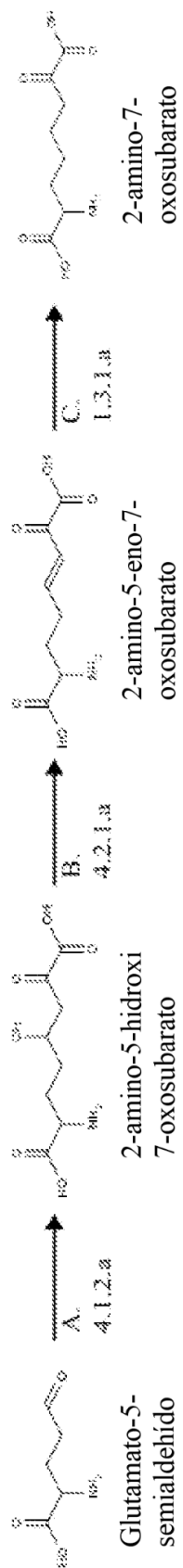


FIGURA 27

ADHER, LDH_D

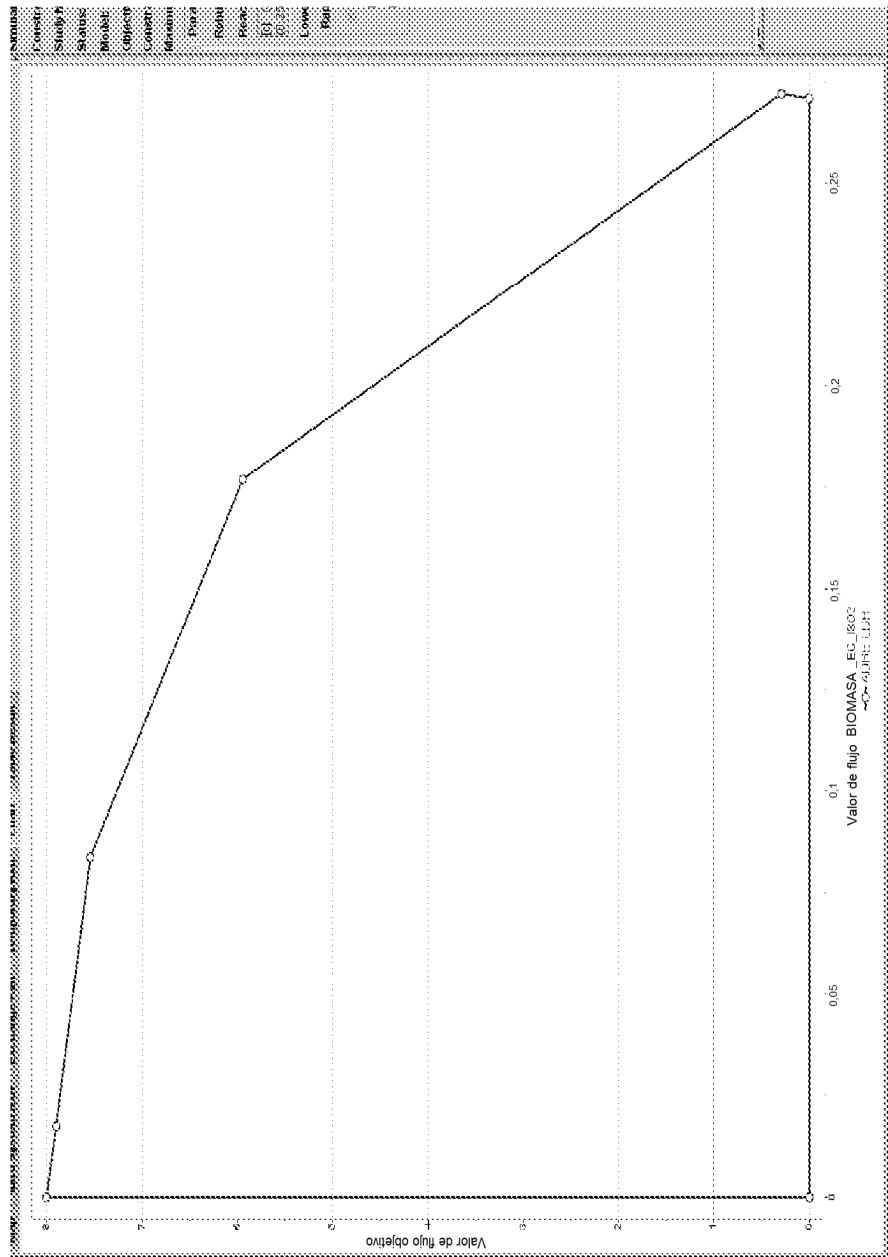


FIGURA 28

ADHER, MDH, ASPT, LDH_D

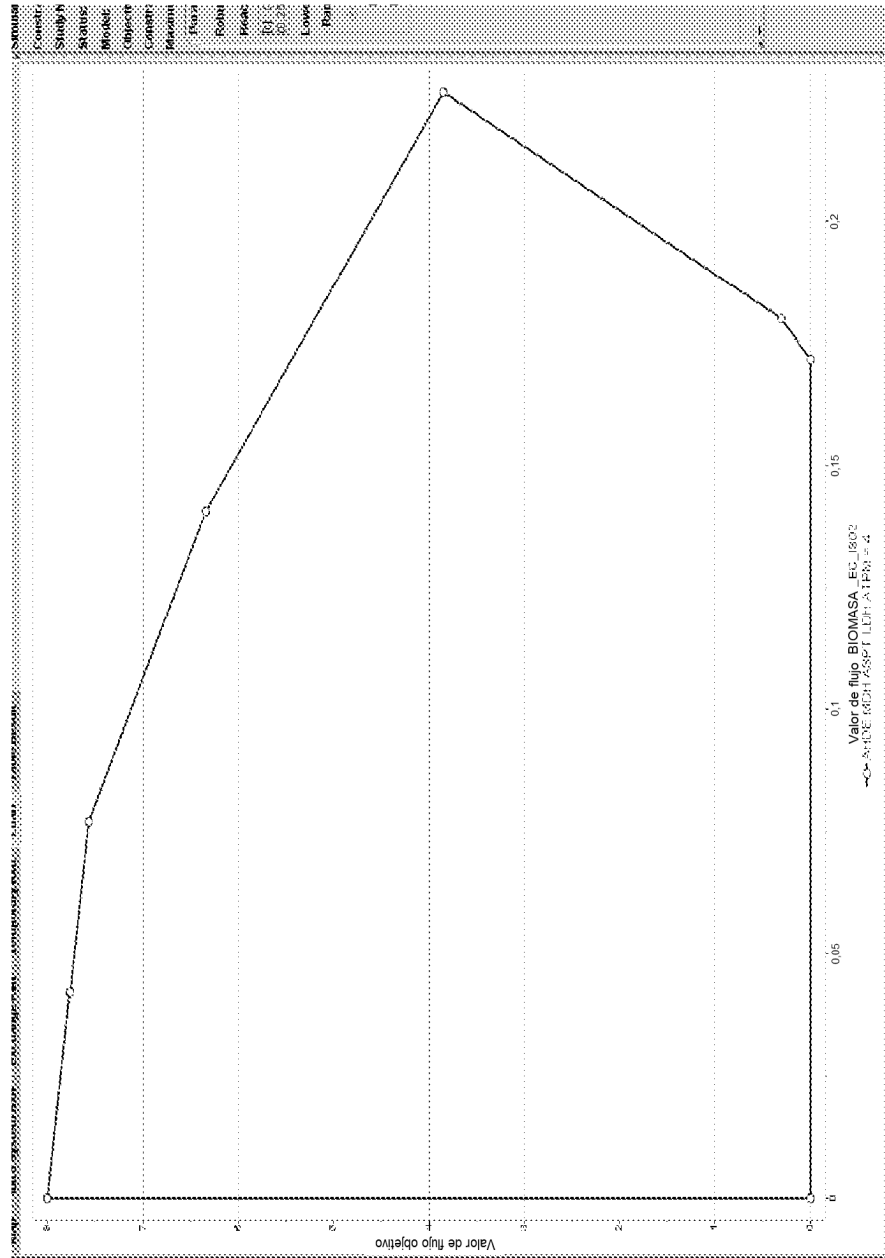


FIGURA 29

ADHER, MDH, ASPT, LDH_D, THD2

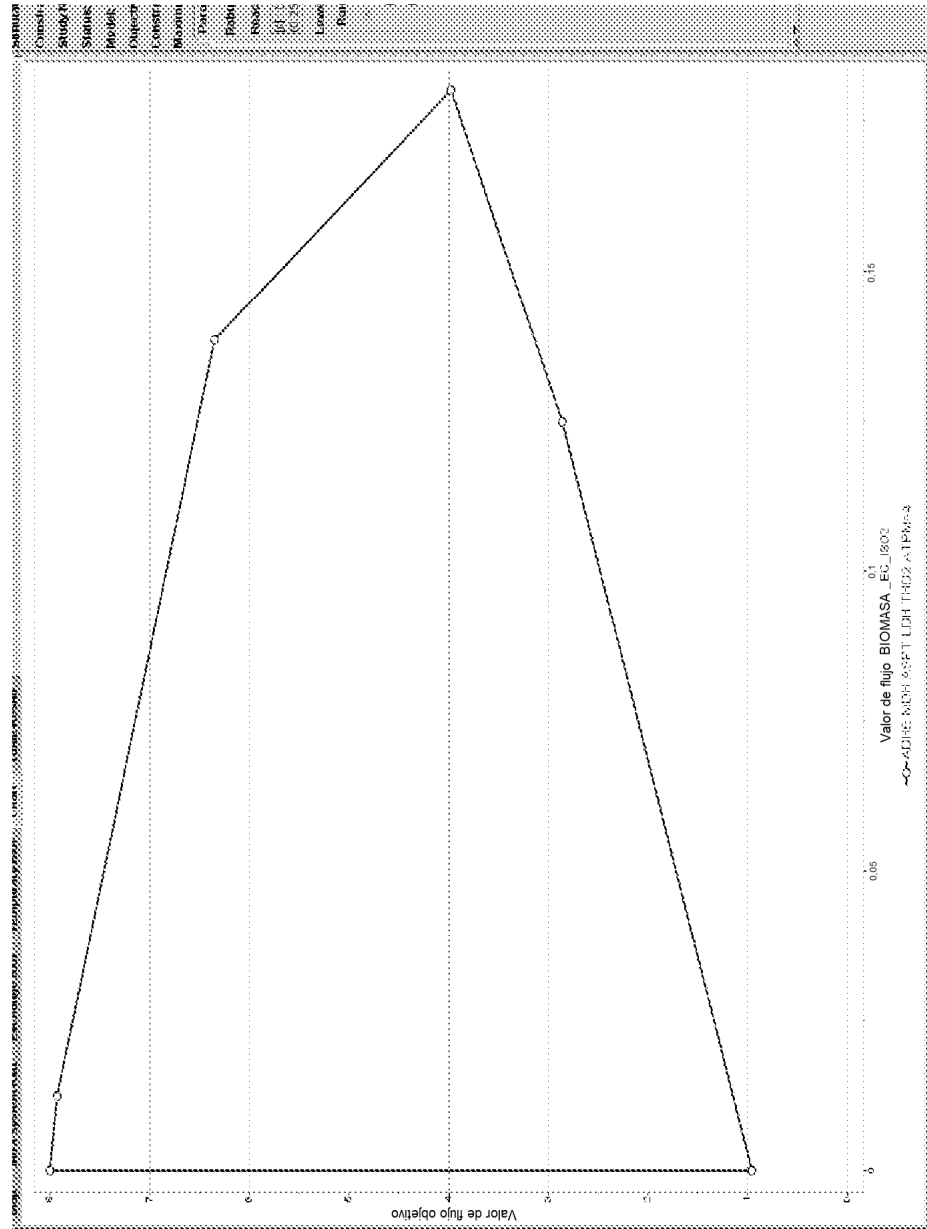


FIGURE 30

ADHER, MDH, ASPT, LDH_D, GLUDy

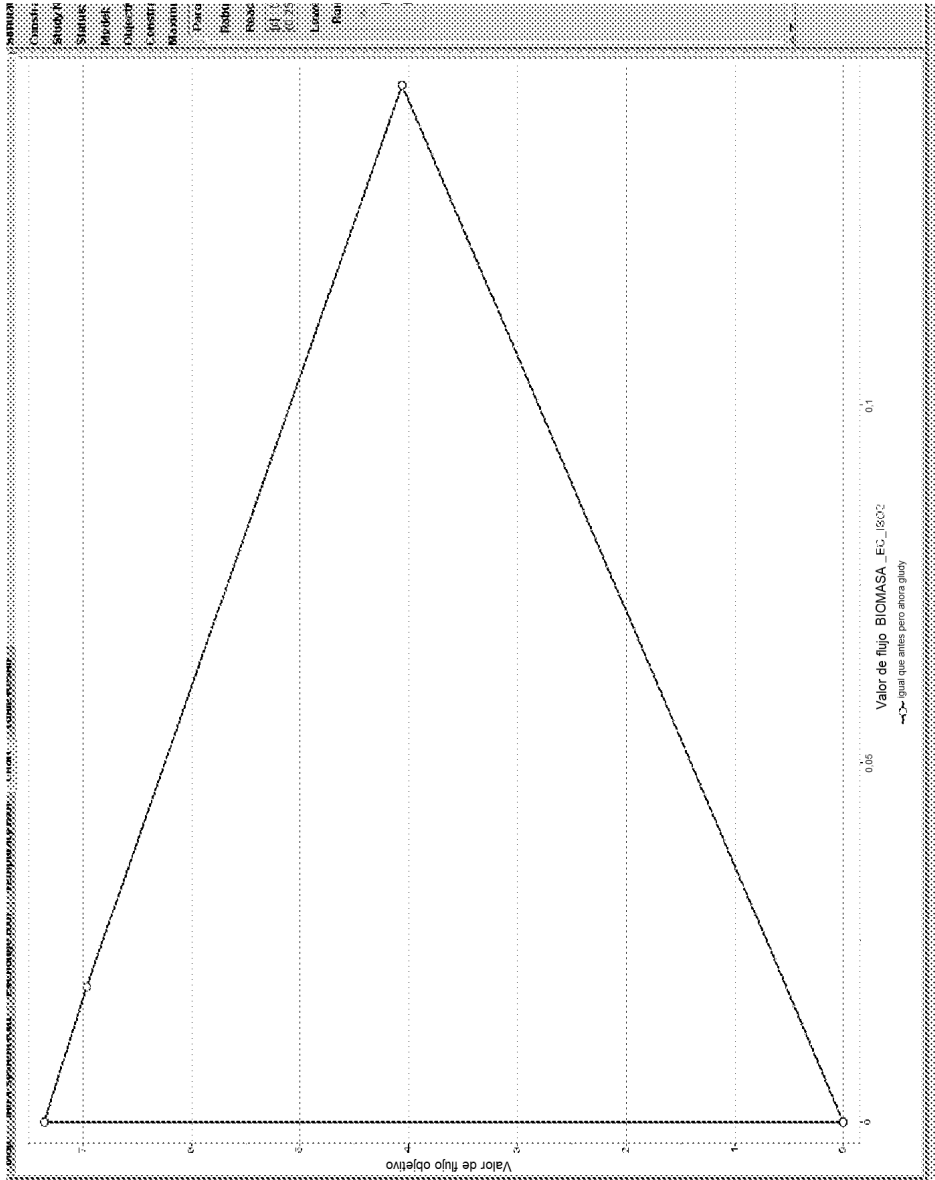


FIGURA 31

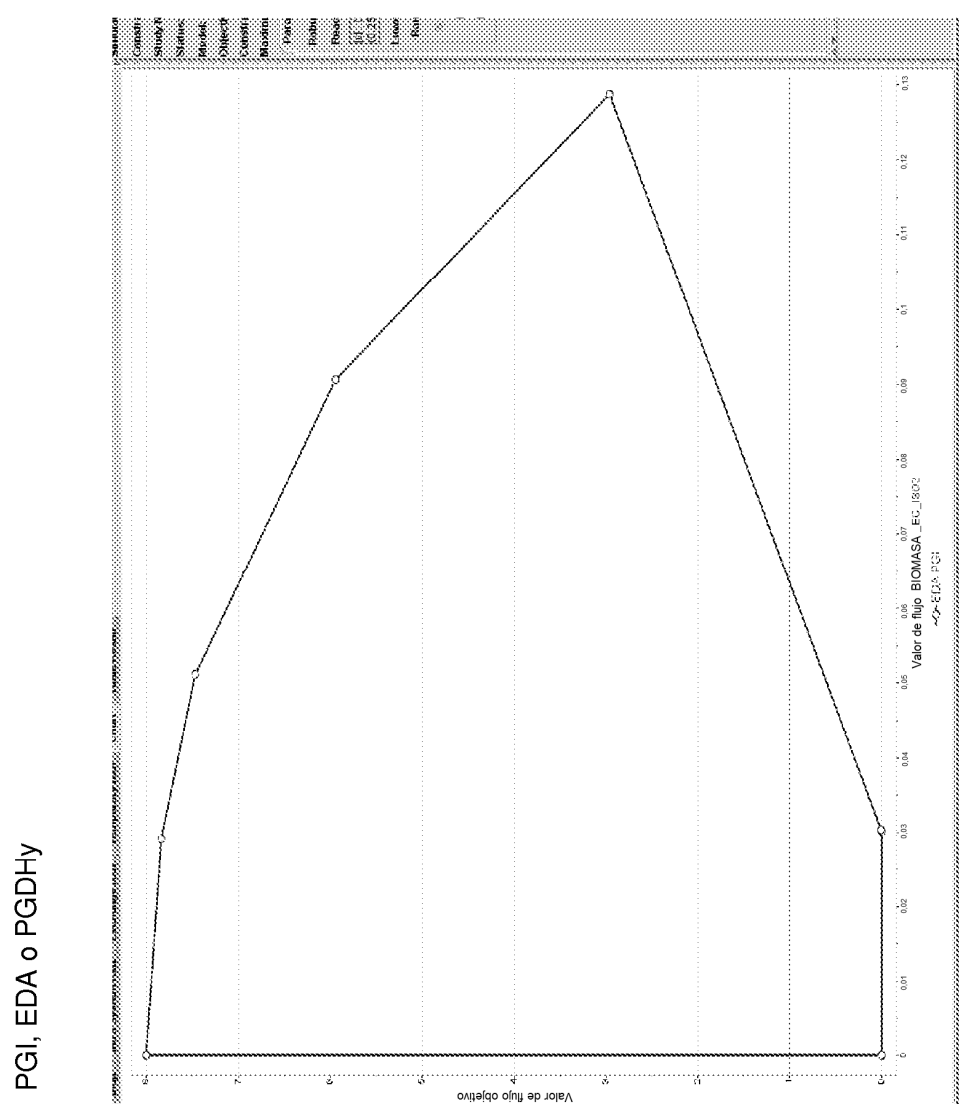


FIGURA 32

PGI, EDA o PGDHy, ADHER

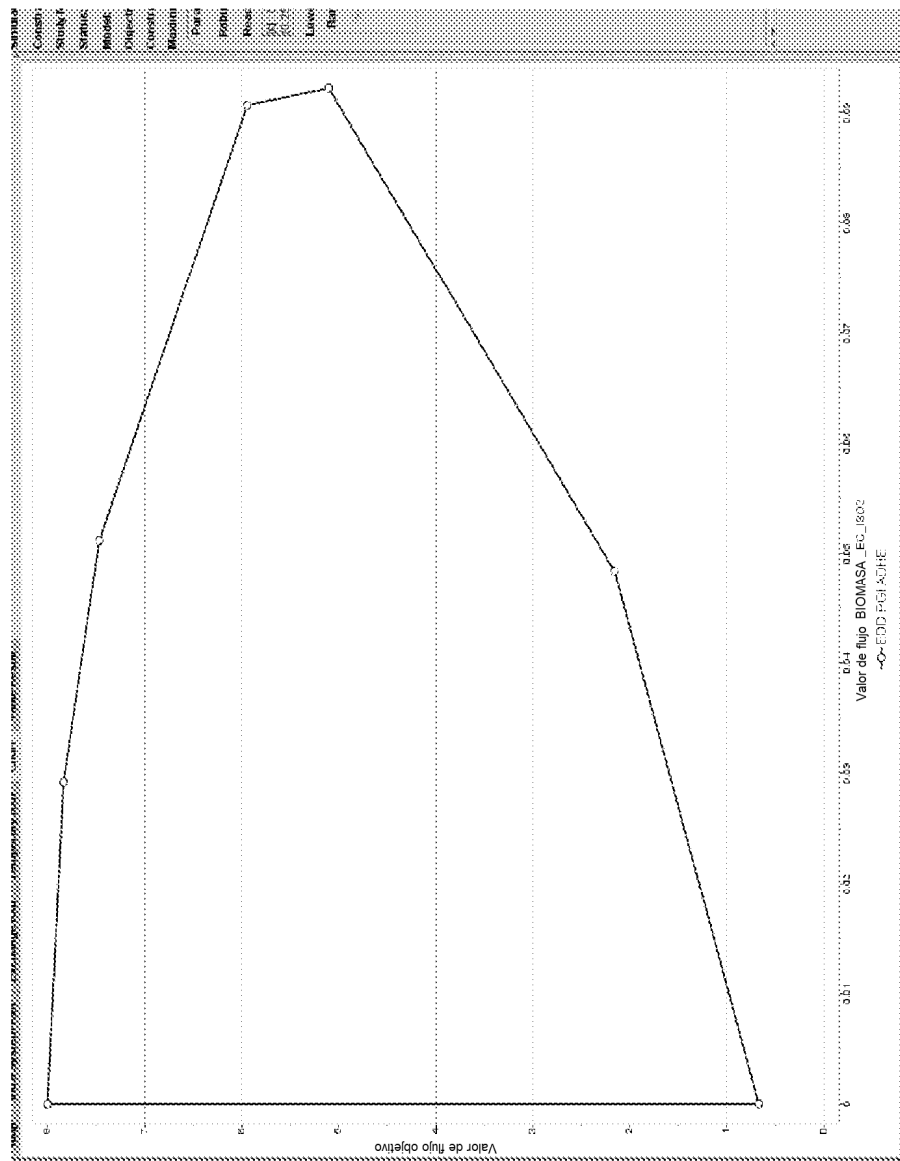


FIGURA 33

Título: MICROORGANISMOS Y MÉTODOS PARA LA BIOSÍNTESIS...

ADHER, PGI, HEX1

Inventores: Burk, Mark J., et al.

N.º de expediente: 066662-0303

N.º de cliente: 41552

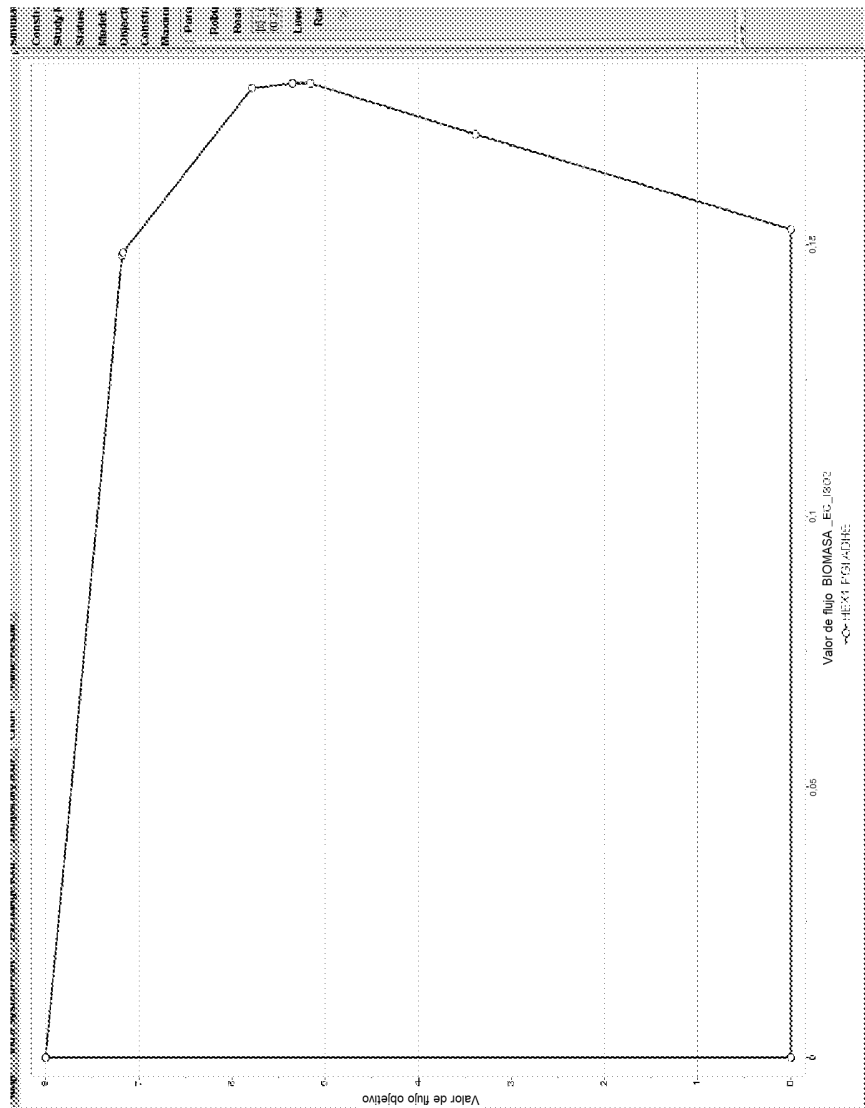


FIGURA 34

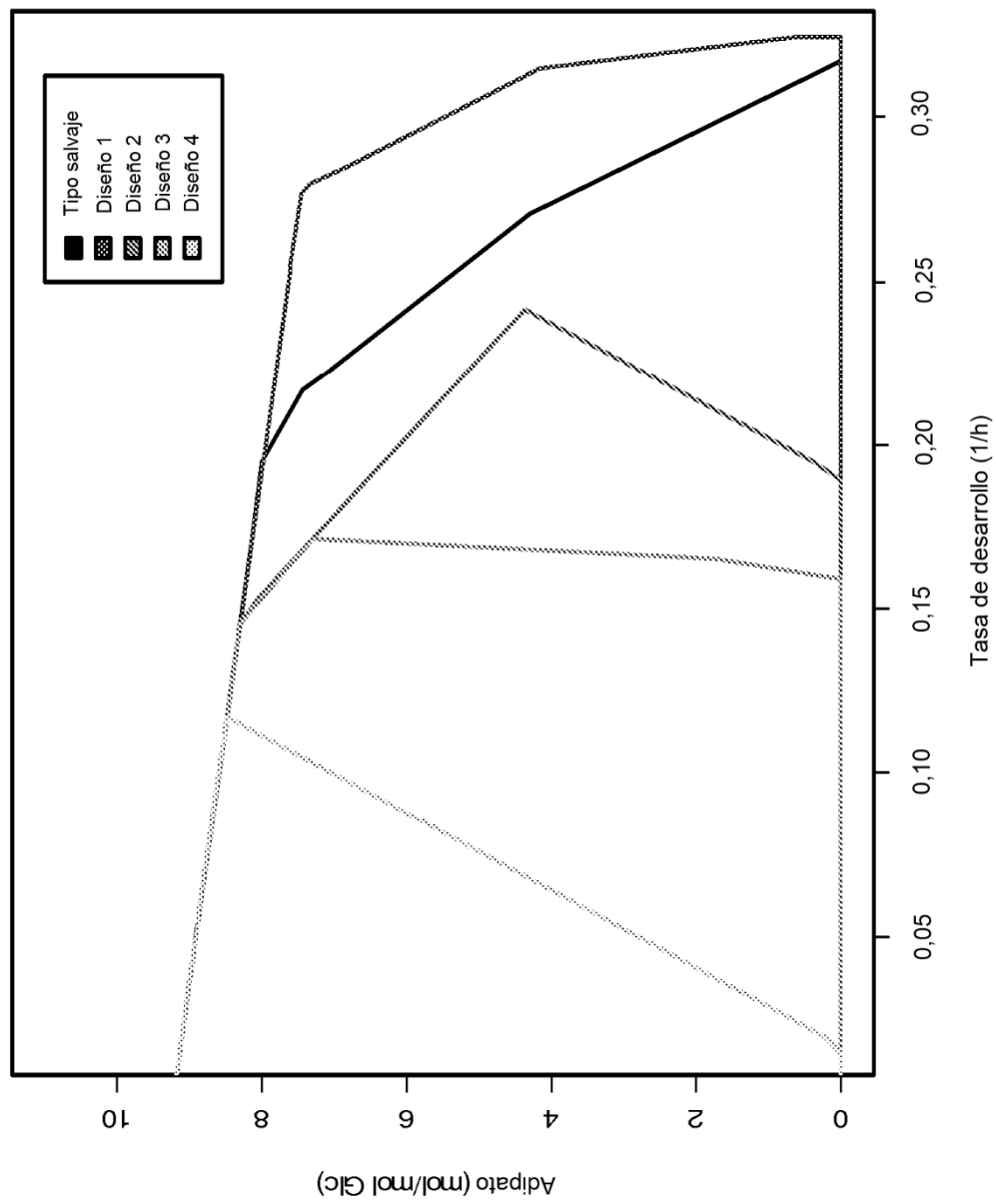


FIGURA 35

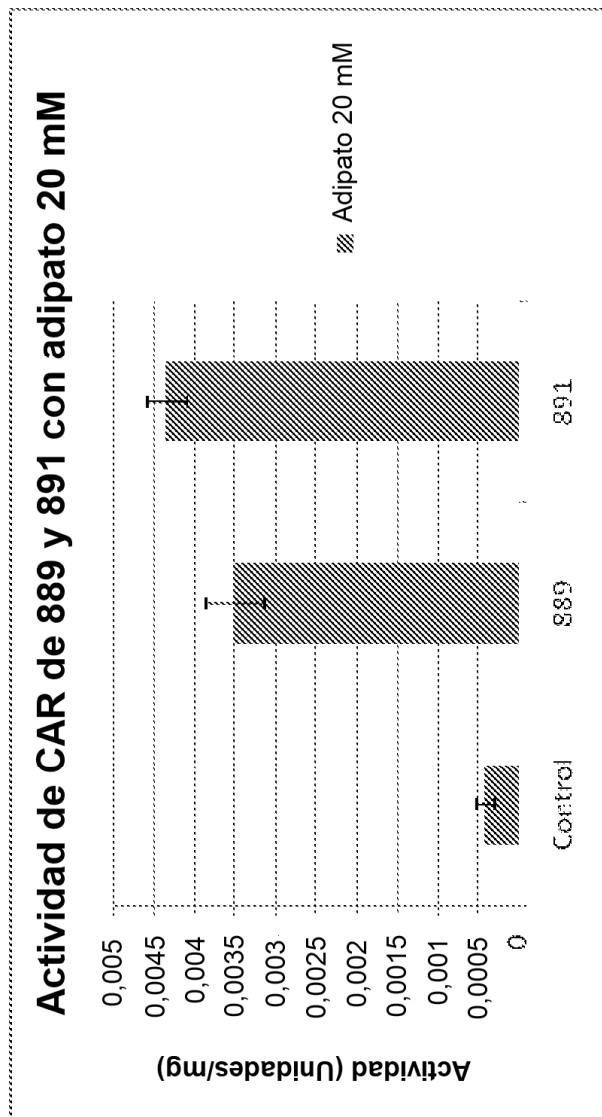


FIGURA 36

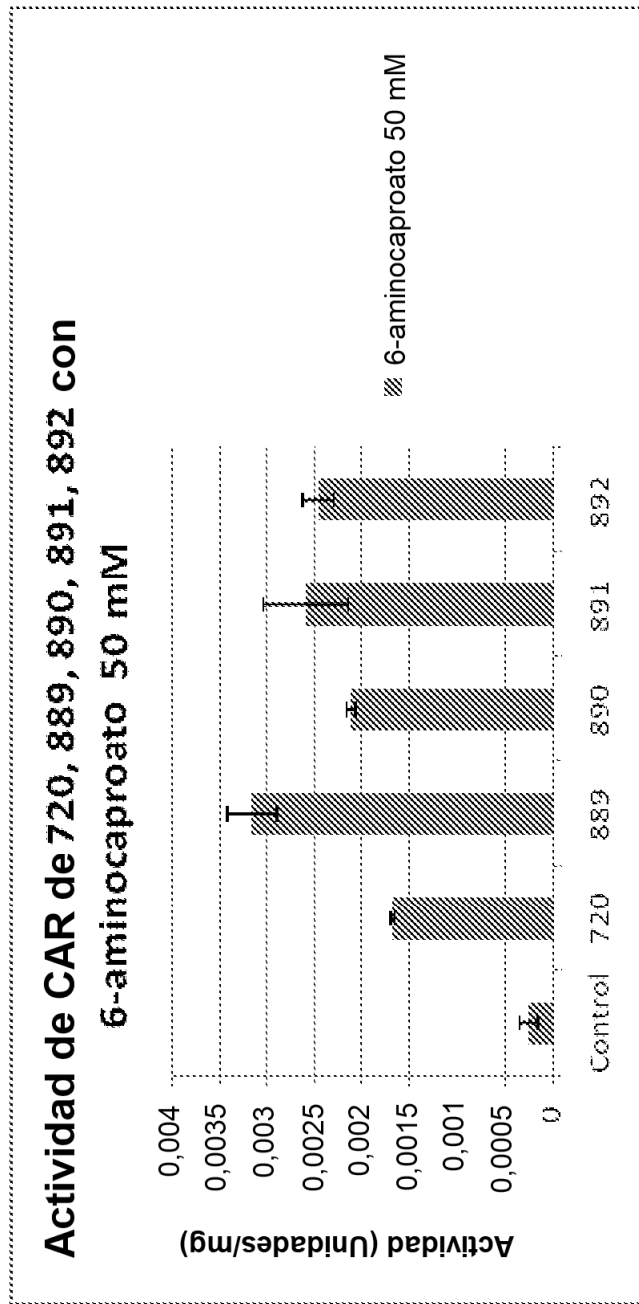


FIGURA 37