

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención, se considera como novedad, y por lo tanto se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

5

REIVINDICACIONES

1. Una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa, caracterizada porque comprende al menos 90% de identidad de secuencia para SEQ ID NO: 6 y que tiene
10 al menos una mutación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de 796, 141, 231, 27, 82, 178, 309, 407, 415, 516 y 666, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso a un ácido graso omega-
15 hidroxilado.

2. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es una variante de proteína de
20 fusión cyp153A-RedRhF hibrida.

3. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la mutación es seleccionada del grupo que consiste de A796V, V141I, V141T, V141Q, V141G, V141M,

V141L, A231T, R27L, R82D, R178N, N309R, N407A, V415R, T516V, P666A y P666D.

4. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 3,
5 caracterizada porque la mutación es seleccionada del grupo que consiste de A796V, V141I, V141T y A231T.

5. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 4,
caracterizada porque la expresión de la variante de
10 polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa en una célula hospedera recombinante da por resultado un título más alto de un ácido graso omega-hidroxilado en comparación con un título de un ácido graso omega-hidroxilado producido por la expresión de un polipéptido de fusión híbrido CYP153A-
15 reductasa de la SEQ ID NO: 6.

6. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 3,
caracterizada porque comprende cualquiera de la SEQ ID NO: 8,
SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16,
20 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 SEQ ID NO: 24,
SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 36,
SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, y
SEQ ID NO: 46.

7. La variante de polipéptido de fusión híbrido

CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque tiene una mutación en V141I y A231T.

8. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 7,
5 caracterizada porque comprende SEQ ID N0: 32.

9. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada porque la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido
10 graso a un ácido graso omega-hidroxilado.

10. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque tiene una mutación en R27L, R82D, V141M, R178N y N407A.

15 11. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada porque comprende SEQ ID N0: 34.

12. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 11,
20 caracterizada porque la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso a un ácido graso omega-hidroxilado.

13. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 3,

caracterizada porque tiene una mutación en P666A.

14. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 13, caracterizada porque comprende SEQ ID NO: 36.

5 15. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada porque la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso a un ácido graso omega-hidroxilado.

10 16. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque tiene una mutación en A796V.

15 17. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 16, caracterizada porque comprende SEQ ID NO: 38.

18. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 17, caracterizada porque la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido
20 graso a un ácido graso omega-hidroxilado.

19. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque tiene una mutación en A796V, P666D y T516V.

20. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 19, caracterizada porque comprende SEQ ID NO: 40.

21. La variante de polipéptido de fusión híbrido
5 CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 20, caracterizada porque la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso a un ácido graso omega-hidroxilado.

22. La variante de polipéptido de fusión híbrido
10 CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque tiene una mutación en V141I, A231T y A796V.

23. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 22,
15 caracterizada porque comprende SEQ ID NO: 42.

24. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 23, caracterizada porque la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido
20 graso a un ácido graso omega-hidroxilado.

25. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque tiene una mutación en R27L, R82D, V141M, R178N, N407A y A796V.

26. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 25, caracterizada porque comprende SEQ ID NO: 44.

27. La variante de polipéptido de fusión híbrido
5 CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 26, caracterizada porque la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso a un ácido graso omega-hidroxilado.

28. La variante de polipéptido de fusión híbrido
10 CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque tiene una mutación en V141T, A231T y A796V.

29. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 28,
15 caracterizada porque comprende SEQ ID NO: 46.

30. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 29, caracterizada porque la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido
20 graso a un ácido graso omega-hidroxilado.

31. Una célula hospedera recombinante, caracterizada porque expresa la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 29.

32. la célula hospedera recombinante de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada además porque expresa un polipéptido tioesterasa de EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14.

5 33. La célula hospedera recombinante de conformidad con la reivindicación 32, caracterizada porque la célula hospedera recombinante produce una composición de ácido graso omega-hidroxilado con un título que es al menos 10% mayor, al menos 15% mayor, al menos 20% mayor, al menos 25% mayor, o al
10 menos 30% mayor que el título de una composición de ácido graso omega-hidroxilado producida por una célula hospedera que expresa un polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa correspondiente, cuando se cultiva en un medio que contiene una fuente de carbono.

15 34. La célula hospedera recombinante de conformidad con la reivindicación 33, caracterizada porque el ácido graso omega-hidroxilado se produce intracelularmente.

 35. La célula hospedera recombinante de conformidad con la reivindicación 34, caracterizada porque el ácido graso
20 omega-hidroxilado se produce extracelularmente.

 36. Un cultivo celular, caracterizado porque comprende la célula hospedera recombinante de conformidad con las reivindicaciones 31 hasta 35.

 37. El cultivo celular de conformidad con la

reivindicación 36, caracterizado porque el ácido graso omega-hidroxiado comprende uno o más de un ácido graso omega-hidroxiado C₁₂, C₁₆ y C_{16:1}.

38. El cultivo celular de conformidad con la
5 reivindicación 37, caracterizado porque el ácido graso omega-hidroxiados comprende un ácido graso C_{16:1} omega-hidroxiado insaturado.

39. El cultivo celular de conformidad con la
reivindicación 37, caracterizado porque el ácido graso omega-
10 hidroxiados comprende un ácido graso C₁₂ omega-hidroxiado saturado.

40. Un método para producir un ácido graso omega-hidroxiado que tiene un incremento en el título, caracterizado porque comprende:

15 i. cultivar la célula hospedera de conformidad con la reivindicación 31 con una fuente de carbono; y

ii. recolectar un ácido graso omega-hidroxiado.

41. El método de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque el ácido graso omega-hidroxiado es un
20 ácido graso omega-hidroxiado saturado.

42. El método de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque el ácido graso omega-hidroxiado es un ácido graso omega-hidroxiado insaturado.

43. Un microorganismo recombinante para producir un

derivado de ácido graso omega-hidroxilado *in vivo* cuando se desarrolla en un caldo de fermentación en presencia de una fuente de carbono de una materia primera renovable, caracterizado porque el organismo comprende una ruta
5 modificada para expresar al menos dos secuencias de ácidos nucleico que codifican un polipéptido que comprende:

(i) una tioesterasa de EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5, o EC 3.1.2.14; y

(ii) una variante de polipéptido de fusión híbrido
10 CYP153A-reductasa.

44. El microorganismo recombinante de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es una variante de proteína de fusión híbrida CYP153A-RedRhF
15 autosuficiente.

45. El microorganismo recombinante de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene al menos 90% de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID
20 NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 46.

46. Una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa, caracterizada porque comprende al menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 38 tiene al menos una mutación en una posición de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de 747, 12, 327, 14, 61, 28, 13, 771, 119, 10, 11, 28, 745, 9, 770, 413, 784, 749, 231, 233, 757 y 703, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso a un ácido graso omega-hidroxilado.
47. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la mutación se selecciona del grupo que consiste de D747N, Q12W, Q12T, Q12R, P327D, R14F, N61L, Q28M, S13K, V771F, K119R, D10Y, I11L, Q28T, P745R, D9N, D9K, T770G, Y413R, M784I, E749L, A231Y, S233L, E757A, y L703G.