

P-12637

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2016/0005882**

Solicitud de patente a nombre de **REG LIFE SCIENCES LLC**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la sociedad **REG LIFE SCIENCES LLC**, domiciliada en South San Francisco, California, Estados Unidos de América, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al Oficio No. **3666** notificado por comunicación electrónica el 3 de abril de 2018 y relacionado con concepto técnico de fondo, me permito manifestar:

1. Título

En primer lugar, tomando en consideración lo expuesto por el examinador en el oficio arriba mencionado con relación al título de la presente solicitud, me permito manifestar que es deseo del solicitante presentar el siguiente nuevo título:

*“VARIANTES DE POLIPÉPTIDO DE FUSIÓN HÍBRIDO CYP153A-
REDUCTASA”*

De esta manera, el nuevo título es lo suficientemente claro, breve y descriptivo para referirse a la solicitud en estudio.

2. Modificaciones al capítulo reivindicatorio

Por otro lado, con fundamento en la facultad que confiere el Artículo 34 de la Decisión 486/00 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, me permito presentar junto con este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio que consta de 13 reivindicaciones y reemplaza completamente

al anteriormente presentado, cuyas modificaciones serán explicadas más adelante en el presente documento al responder a las objeciones planteadas por el examinador. Ninguna reivindicación fue eliminada, es decir, la correspondencia en cuanto a la numeración de las reivindicaciones se mantiene con respecto a las anteriormente presentadas.

En cuanto a estas modificaciones, de antemano me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud, y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones planteadas por el examinador en su concepto técnico.

3. Pago de tasas

En relación con el número de reivindicaciones, atentamente me permito comentar que no se adjunta tasa por reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio cuenta con el mismo número de cláusulas que el anteriormente presentado.

Por otra parte, me permito adjuntar recibo por concepto de pago de tasa para un nuevo examen de patentabilidad sobre el nuevo pliego reivindicatorio, según lo estipulado en la Resolución No. 3719 de 2016.

4. Claridad y concisión del capítulo reivindicatorio

Ahora bien, con relación a la claridad y concisión de las reivindicaciones, me permito manifestar que mediante el nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones a este respecto, ya que las nuevas reivindicaciones proporcionan claridad y concisión a la invención reclamada, cuentan con pleno soporte en la descripción de la solicitud en estudio, y siguen las recomendaciones realizadas por el examinador en su concepto técnico. En particular, frente a cada objeción, me permito señalar lo siguiente:

4.1. *“La referencia a porcentajes de identidad en las reivindicaciones independientes 1, 12 y 13 no permite tener claridad sobre la materia reclamada, puesto que no se puede tener certeza de que una secuencia que no sea idéntica a las reclamadas tenga el efecto reclamado en la invención. (...)”*

4.2. *“La reivindicación 1 carece de concisión porque reclama al menos una mutación en las posiciones 796, 141, 231, 27, 82, 178, 309, 407, 415, 516 y 666, sin indicar cuál es el residuo resultante. (...)”*

Con respecto a los anteriores señalamientos, amablemente me permito resaltar, en primer lugar, que la reivindicación 1 fue modificada para incluir las mutaciones concretas según lo solicitado por el examinador. Sin embargo, el argumento sobre el porcentaje de identidad que presenta el examinador no es del todo correcto porque la reivindicación 1 está redactada para requerir que la posición/mutación esté presente. Por lo tanto, independientemente del porcentaje de identidad (10% de variación), el polipéptido variante debe tener "al menos" una de las mutaciones tal como se muestra. Simplemente no es correcto argumentar que la varianza eliminaría ese requisito porque el lenguaje de la reivindicación dice que la variante "tiene al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste de". Aunque puede haber una varianza del 10% en el resto de la secuencia, debe estar presente al menos una de las mutaciones listadas. Por tanto, me permito solicitar a ese Despacho que las objeciones a este respecto sean retiradas.

4.3. *“Se sugiere declarar la dependencia de la reivindicación 4 con la reivindicación 1 ya que ambas hacen referencia a la misma materia, con el fin de dar mayor claridad al capítulo reivindicatorio. (...)”*

En respuesta a lo anterior, me permito comentar que la reivindicación 4 se refiere a las variantes de mutaciones combinadas, sin embargo, se ha modificado para que sea dependiente de la reivindicación 1 y así atender lo que sugiere el examinador. Por tanto, la objeción a este respecto se ve superada.

4.4. *“Las reivindicaciones 6 y 7 carecen de concisión porque reclaman una célula hospedera sin definir qué tipo de célula es. Se recomienda definir el tipo celular o la línea celular particular, puesto que de la forma general como está reclamada incluye materia exceptuada de patentabilidad, por el hecho de que en la descripción se indica que la célula hospedera puede ser una célula de planta. (...)”*

Frente a lo anterior, me permito indicar que las reivindicaciones 6 y 7 fueron modificadas para especificar que la célula huésped reclamada es una “célula huésped microbiana”. Por tanto, me permito solicitar a ese Despacho que la objeción a este respecto sea retirada.

4.5. *“La reivindicación 8 carece de claridad porque encabeza como "cultivo celular de conformidad con la reivindicación 7", cuando en la reivindicación 7 no se hace referencia a un cultivo sino a una célula recombinante. (...)”*

Con respecto a lo anterior, me permito señalar que la reivindicación 8 fue corregida para atender esta falta de claridad.

4.6. *“Las reivindicaciones 7 - 9 carecen de claridad porque están redactadas en términos de resultados a alcanzar, al caracterizar al cultivo celular por los ácidos grasos que comprende, los cuales no corresponden a ácidos grasos añadidos al cultivo sino son los ácidos grasos producidos por las células como consecuencia de la inserción del polipéptido de fusión reclamado. (...)”*

En conexión con lo anterior, respetuosamente me permito destacar que las reivindicaciones 7 a 9 son reivindicaciones dependientes, es decir, contienen todas las características de las reivindicaciones de las cuales dependen y además adicionan una o más características que limitan el objeto a proteger. Estas reivindicaciones no se refieren a resultados a alcanzar como sugiere el examinador, sino más bien se dirigen a características particulares de la invención que entran dentro de su alcance, como lo son los derivados de ácidos grasos ω -OH que se obtienen mediante las variantes de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa desarrolladas por el solicitante. Por tanto, me permito solicitar a ese Despacho que la objeción a este respecto sea retirada.

4.7. *“La reivindicación 12 carece de claridad porque menciona que "el microorganismo comprende una ruta modificada para expresar al menos dos secuencias de ácidos nucleico que codifican un polipéptido". En primer lugar, dicha expresión da a entender que los dos ácidos nucleicos codifican un solo polipéptido, lo cual no es cierto. En segundo lugar, no es claro si la tioesterasa seleccionada es nativa o si es producto de una modificación de las células del cultivo. (...) Por otra parte, se sugiere reemplazar el término “materia primera” por “materia prima”. ”*

En relación con lo anterior, me permito señalar que la reivindicación 12 ahora incluye el término "heterólogas". Sin embargo, aparte de eso, la reivindicación dice "expresar al menos dos secuencias de ácido nucleico heterólogas que codifican un polipéptido que comprende". Esto significa que cada ácido nucleico codifica un polipéptido, no se está especificando que los dos ácidos nucleicos codifican un solo polipéptido, como afirma el examinador. Por su parte, me permito indicar que el término "materia primera" fue reemplazado por "materia prima", tal y como sugirió el examinador.

En consecuencia, me permito manifestar que el nuevo capítulo reivindicatorio adjunto al presente memorial, que incluye 13 reivindicaciones, cumple a cabalidad con las disposiciones del Artículo 30 de la Decisión 486/00.

5. Descripción

Por otra parte, con el fin de atender la observación del examinador respecto a la escritura de la mutación A796V en la descripción (la cual en la Tabla 11 aparece escrita como A976V), me permito presentar junto con este memorial una copia modificada de la memoria descriptiva, en la cual dicho error involuntario ha sido corregido.

6. Conclusiones

Finalmente, a la luz de las modificaciones al capítulo reivindicatorio y los argumentos presentados, es posible concluir lo siguiente:

6.1. La presente solicitud es clara, concisa y está debidamente soportada por la descripción, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 30 de la Decisión 486/00.

Por tanto, atentamente me permito solicitar a ese Despacho otorgar el privilegio de patente solicitado a la solicitud en estudio, toda vez que cumple a cabalidad con los requerimientos de la Decisión 486/00.

7. Anexos

7.1. Nuevo capítulo reivindicatorio que comprende 13 reivindicaciones.

7.2. Copia de la descripción modificada.

7.3. Comprobante de pago de tasa para nuevo examen de patentabilidad.

Señor Director,



CAROLINA DAZA MONTALVO

C.C. 66.783.790 de Palmira Valle

TP-141563 CSJ

notificaciones@clarkemodet.com.co

P-12637

Nuevo capítulo reivindicatorio

Agosto 15, 2018

REIVINDICACIONES

1. Una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa que comprende de 90% a 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 y tiene al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste de A796V, V141I, V141Q, V141M, V141G, V141L, V141T, A231T, A231Y, A231V, A231W, R27L, R82D, R178N, N309R, N309S, N407A, V415R, T516V, P666A y P666D, en donde dicha variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso a un ácido graso omega-hidroxilado.
2. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de la reivindicación 1, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es una variante de proteína de fusión cyp153A-RedRhF híbrida.
3. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de la reivindicación 1, que comprende cualquiera de las SEQ ID 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, SEQ ID NO: 46, y SEQ ID NO: 76.
4. Una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de la reivindicación 1 que tiene una mutación en:
 - (a) V141I y A231T, comprendiendo la SEQ ID NO: 32;
 - (b) R27L, R82D, V141M, R178N y N407A, comprendiendo la SEQ ID NO: 34;
 - (c) A796V, comprendiendo la SEQ ID NO: 38;
 - (d) A796V, P666D y T516V, comprendiendo la SEQ ID NO: 40;
 - (e) V141I, A231T y A796V, comprendiendo la SEQ ID NO: 42,
 - (f) R27L, R82D, V141M, R178N, N407A y A796V, comprendiendo la SEQ ID NO: 44, o
 - (g) V141T, A231T y A796V, comprendiendo la SEQ ID NO: 46.

-
5. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de la reivindicación 4, en donde dicha variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso a un ácido graso omega-hidroxiado.
 6. Una célula huésped microbiana recombinante que expresa la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además expresa un polipéptido tioesterasa de EC 3.1.2., EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14.
 7. La célula huésped microbiana recombinante de la reivindicación 6 que comprende además un ácido graso omega-hidroxiado.
 8. Un cultivo celular que comprende la célula microbiana recombinante de la reivindicación 7, en donde el ácido graso omega-hidroxiado comprende uno o más ácidos grasos omega-hidroxiados C₁₂, C₁₆ y C_{16:1}.
 9. El cultivo celular de la reivindicación 8, en donde el ácido graso omega-hidroxiado comprende:
 - (a) un ácido graso C_{16:1} omega-hidroxiado insaturado; o
 - (b) un ácido graso C₁₂ omega-hidroxiado saturado.
 10. Un método para producir un ácido graso omega-hidroxiado que tiene un incremento en el título, que comprende:
 - i. cultivar la célula huésped de la reivindicación 6 con una fuente de carbono de una fuente renovable; y
 - ii. recolectar un ácido graso omega-hidroxiado.
 11. El método de la reivindicación 10, en donde el ácido graso omega-hidroxiado es un ácido graso omega-hidroxiado saturado.
 12. Un microorganismo recombinante para producir un derivado de ácido graso omega-hidroxiado *in vivo* cuando se cultiva en un caldo de fermentación en presencia de una fuente de carbono de una materia prima renovable, dicho microorganismo comprende una ruta modificada para expresar al menos dos secuencias de ácido nucleico heterólogas 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 CYP153A-reductasa que tiene de 90% a 100% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID 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, SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 76.

13. Una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa que comprende de 90% a 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 38 y tiene una mutación que 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, en donde dicha variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso a un ácido graso omega-hidroxilado.

VARIANTES DE POLIPÉPTIDO DE FUSIÓN HÍBRIDO CYP153A-REDUCTASA

CAMPO DE LA INVENCION

5 La descripción se refiere a polipéptidos de fusión relacionados con omega-hidroxilasa que dan por resultado producción de derivados de ácidos grasos omega-hidroxilados mejorados cuando se expresan en células hospederas recombinantes. La descripción se refiere adicionalmente a
10 microorganismos para expresar los polipéptidos de fusión relacionados con omega-hidroxilasa para la producción de derivados de ácido graso omega-hidroxilados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Las citocromo P450 monooxigenasas (P450s) son un grupo diverso de enzimas. Están clasificadas en familias y subfamilias. Cuando comparten mayor o igual a cuarenta por ciento de identidad de aminoácidos pertenecen a la misma familia. Cuando comparten mayor o igual que cincuenta por
20 ciento de identidad de aminoácidos pertenecen a la misma subfamilia. Las P450 usan ácidos grasos como substratos y catalizan las reacciones de hidroxilación. Las bacterias tienen varios sistemas P450 implicadas en la degradación de alcanos y la modificación de ácido graso y más de 1000 P450s

microbianas son conocidas hasta la fecha. Una subfamilia de P450 particular es conocida como cyp153A, en donde la primera se clonó de *Acinetobacter calcoaceticus* en el 2001. Desde entonces, se han identificado enzimas similares en otras especies que utilizan alcanos tales como *Sphingomonas* sp. HXN200, *Mycobacterium* sp. HXN1500, y *Alcanivorax borkumensis* (Van Bogaert y colaboradores (2011) *FEBS Journal* 278:206-221). Varias P450s de la subfamilia CYP153A bacterianas son alcano omega-hidroxilasas (ω -hidroxilasas, también referidas como ω -oxigenasas) con regioselectividad terminal alta. Las CYP153As también se han asociado con la síntesis de compuestos alifáticos omega-hidroxilados (ω -hidroxilados) industrialmente relevantes, tales como alcoholes primarios, ácidos grasos ω -hidroxilados y derivados de ácidos grasos bifuncionales tales como α,ω -dicarboxílicos y α,ω -dioles (Honda Malca y colaboradores (2012) *Chem. Commun.* 48:5115-5117).

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente descripción proporciona polipéptidos de fusión relacionados con omega-hidroxilasa y variantes de los mismos que pueden producir derivados de ácidos grasos omega-hidroxilados y bifuncionales en las células hospederas. De manera más específica, la presente descripción proporciona

variantes de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa que producen derivados de ácido graso omega-hidroxi-
lados-(ω -hidroxi-
lados) y bi-funcionales y composiciones de los mismos que incluyen ácidos grasos ω -hidroxi-
lados, ésteres de ácidos
5 grasos ω -hidroxi-
lados, α,ω -diácidos, α,ω -diésteres, α,ω -
dioles y químicos derivados de los mismos tales como
macrolactonas. También se proporcionan secuencias de ácidos
nucleicos y proteínas de fusión híbridos CYP153A-reductasa
específicas así como células hospederas recombinantes y
10 cultivos celulares que abarcan tales variantes de polipéptido
de fusión híbrido CYP153A-reductasa modificadas. La
descripción también proporciona métodos para usar las células
hospederas que expresan la variante de polipéptido de fusión
híbrido CYP153A-reductasa recombinante a fin de producir
15 derivados de ácidos grasos ω -hidroxi-
lados y/o bi-funcionales
o composiciones de los mismos.

Un aspecto de la descripción proporciona un polipéptido
de fusión híbrido CYP153A-reductasa que cataliza la
conversión de un ácido graso a un ácido graso ω -hidroxi-
lados
20 (ω -OH) o derivado de ácido graso, en donde el polipéptido de
fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene al menos
aproximadamente 90%, 91%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o
100% de identidad de secuencia a la secuencia de polipéptido
de SEQ ID NO:6. Se incluyen además métodos para expresar el

polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa y variantes del mismo. En un aspecto, el polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene al menos 90%, 91%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:6 y expresión del polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa en una célula hospedera recombinante que da por resultado un título más alto de ácidos grasos ω -OH o derivados de ácidos grasos o composiciones de los mismos como es comparado con su título producido por la expresión de una CYP153A de tipo natural. En un aspecto, la célula hospedera recombinante produce un ácido graso ω -OH o un derivado de ácido graso ω -OH o composición del mismo con un título que es al menos aproximadamente 10% mayor que el título de un ácido graso ω -OH o derivado de ácido graso ω -OH o composición del mismo producido por una célula hospedera que expresa una CYP153A de tipo natural correspondiente, cuando se cultiva en un medio que contiene una fuente de carbono bajo condiciones efectivas para expresar el polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa. En otro aspecto, el ácido graso ω -OH o derivado de ácido graso ω -OH o composición del mismo se produce extracelularmente.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 6 tiene al menos una mutación en una posición de aminoácido que incluye la posición 796, 141, 231, 27, 82, 178, 309, 407, 415, 516 y/o 666, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso a un ácido graso ω -OH. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene una mutación en cualquiera de una o más de las siguientes posiciones, incluyendo la posición A796V donde la alanina (A) se sustituye con (es decir, se reemplaza con) valina (V); posición V141I donde valina se sustituye con isoleucina (I); posición V141Q donde valina (V) se sustituye con glutamina (Q); posición V141G donde valina (V) se sustituye con glicina (G); posición V141M donde valina (V) se sustituye con metionina (M); posición V141L donde valina (V) se sustituye con leucina (L); posición V141T donde valina (V) sustituye con treonina (T); posición A231T donde la alanina (A) se sustituye con treonina (T); posición R27L donde la arginina (R) se sustituye con lisien (L); posición R82D donde la arginina (R) se sustituye con ácido aspártico (D); posición R178N donde la arginina (R) se sustituye con asparagina (N); posición N309R donde asparagina (N) se sustituye con arginina (R); posición N407A donde asparagina (N) se sustituye con alanina (A); posición V415R donde valina (V) se

sustituye con arginina (R); posición T516V donde treonina (T) se sustituye con valina (V); posición P666A donde prolina (P) se sustituye con alanina (A);and posición P666D donde prolina (P) se sustituye con ácido aspártico (D). Ejemplos de

5 variantes de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa incluyen SEQ ID 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 o SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID

10 NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 46. En una modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es una de proteína de fusión de tipo cyp153A-RedRhF híbrida. En otra modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasain

15 en una célula hospedera recombinante da por resultado un título más alto de un ácido graso ω -OH o derivado de ácido graso ω -OH o composición del mismo como es comparado con el título de un ácido graso ω -OH o derivado de ácido graso ω -OH o composición del mismo producido por la expresión de un

20 polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa en una célula hospedera recombinante. En otra modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene una mutación en la posición de aminoácido 796, incluyendo A796V. En otra modalidad, la variante de polipéptido de fusión

híbrido CYP153A-reductasa tiene una mutación en la posición de aminoácido 231, incluyendo A231T. En otra modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene una mutación en la posición de aminoácido 141, 5 incluyendo V141I y/o V141T. En este punto, la expresión de la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa con las mutaciones A796V, V141I, V141T y/o A231T en una célula hospedera recombinante dan por resultado un título más alto de un ácido graso ω -OH C₁₂ o C₁₆, respectivamente, como 10 es comparado con el título de un ácido graso ω -OH C₁₂ o C₁₆ producido por la expresión de un polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa.

La descripción contempla además un cultivo celular con una célula hospedera recombinante que expresa una variante de 15 polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa como se describe en lo anterior (*supra*). El ácido graso ω -OH o derivado de ácido graso o composición del mismo puede incluir uno o más de un ácido graso ω -OH C₂₀, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉ o derivado de ácido graso. 20 El ácido graso ω -OH o derivado de ácido graso o composición del mismo puede incluir un ácido graso ω -OH saturado o insaturado o derivado de ácido graso. En otra modalidad, el ácido graso ω -OH o derivado de ácido graso o composición del mismo puede incluir uno o más de un ácido graso ω -OH

insaturado C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1},
 C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y C_{20:1} o derivados de ácidos grasos. En otra
 modalidad, el ácido graso ω -OH o derivado de ácido graso o
 composición del mismo puede incluir un ácido graso ω -OH C₁₂
 5 y/o C₁₆y/o C_{16:1} o derivado de ácido graso.

Otro aspecto de la proporción proporciona un método para
 producir un ácido graso ω -OH o derivado de ácido graso o
 composición del mismo que tiene un incremento en el título,
 incluyendo cultivar la célula hospedera que expresa la
 10 variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa
 (*supra*) con una fuente de carbono; y cosechar un ácido graso
 ω -OH o un derivado de ácido graso ω -OH. En un aspecto, el
 ácido graso ω -OH o derivado de ácido graso es al menos
 aproximadamente 20% a 30% mayor que el título de un ácido
 15 graso ω -OH o derivado de ácido graso producido por una célula
 hospedera que expresa el polipéptido de fusión híbrido
 CYP153A-reductasa. En otro aspecto, el ácido graso ω -OH o
 derivado de ácido graso o composición del mismo se produce en
 un título de aproximadamente 15g/L a aproximadamente 25g/L de
 20 una fuente de carbono.

En otro aspecto de la descripción se proporciona una
 variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa
 con al menos aproximadamente 90%, 91%, 93%, 94%, 95%, 96%,
 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:

32 que tiene una mutación en V141I y A231T, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso a un ácido graso ω -OH C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉,
5 C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} o derivado de ácido graso o composición del mismo. En otro aspecto de la descripción se proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa con al menos aproximadamente 90%, 91%, 93%, 94%, 95%, 96%,
10 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 34 que tiene una mutación en R27L, R82D, V141M, R178N y N407A, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de cualquier ácido graso a un ácido graso ω -OHC₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃,
15 C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} o derivado de ácido graso o composición del mismo. En otro aspecto de la descripción se proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa con al menos aproximadamente
20 90%, 91%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 36 que tiene una mutación en P666A, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de cualquier ácido graso a un ácido graso ω -OHC₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂,

C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1},
C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} o derivado de
ácido graso o composición del mismo. En otro aspecto de la
descripción se proporciona una variante de polipéptido de
5 fusión híbrido CYP153A-reductasa con al menos aproximadamente
90%, 91%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de
identidad de secuencia a SEQ ID NO: 38 que tiene una mutación
en A796V, en donde la variante de polipéptido de fusión
híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de cualquier
10 ácido graso a un ácido graso ω -OH C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂,
C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1},
C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} o derivado de
ácido graso o composición del mismo. En otro aspecto de la
descripción se proporciona una variante de polipéptido de
15 fusión híbrido CYP153A-reductasa con al menos aproximadamente
90%, 91%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de
identidad de secuencia a SEQ ID NO: 40 que tiene una mutación
en A796V, P666D y T516V, en donde la variante de polipéptido
de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de
20 cualquier ácido graso a un ácido graso ω -OHC₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀,
C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1},
C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} o
derivado de ácido graso o composición del mismo. En otro
aspecto de la descripción se proporciona una variante de

polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa con al menos
 aproximadamente 90%, 91%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o
 100% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 42 que tiene una
 mutación en V141I, A231T y A796V, en donde la variante de
 5 polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la
 conversión de cualquier ácido graso a un ácido graso ω -OH C₆,
 C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀,
 C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1},
 C_{19:1} y/o C_{20:1} o derivado de ácido graso o composición del
 10 mismo. En otro aspecto de la descripción se proporciona una
 variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa
 con al menos aproximadamente 90%, 91%, 93%, 94%, 95%, 96%,
 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:
 44 que tiene una mutación en R27L, R82D, V141M, R178N, N407A
 15 y A796V, en donde la variante de polipéptido de fusión
 híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de cualquier
 ácido graso a un ácido graso ω -OH C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂,
 C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1},
 C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} o derivado de
 20 ácido graso o composición del mismo. En otro aspecto de la
 descripción se proporciona una variante de polipéptido de
 fusión híbrido CYP153A-reductasa con al menos aproximadamente
 90%, 91%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de
 identidad de secuencia a SEQ ID NO: 46 que tiene una mutación

en V141T, A231T y A796V, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de cualquier ácido graso a un ácido graso ω -OH C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1},
5 C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} o derivado de ácido graso o composición del mismo.

La descripción contempla además una célula hospedera recombinante que expresa la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa como se plantea en lo anterior
10 (*supra*). En una modalidad, la célula hospedera recombinante expresa una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa como se plantea en lo anterior (*supra*) y un polipéptido de tioesterasa de EC 3.1.2.- o EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14, en donde la célula hospedera recombinante produce
15 un ácido graso ω -OH o una composición del mismo con un título que es al menos 10% mayor, al menos 15% mayor, al menos 20% mayor, al menos 25% mayor, o al menos 30% mayor que el título de un ácido graso ω -OH o composición del mismo producido por una célula hospedera que expresa u polipéptido de fusión
20 híbrido CYP153A-reductasa correspondiente, cuando se cultiva en el medio que contiene una fuente de carbono bajo condiciones efectivas para expresar la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa. En una modalidad, el ácido graso ω -OH o composición del mismo se

puede producir en un título de aproximadamente 15 g/L a aproximadamente 25 g/L. En otra modalidad, el ácido graso ω -OH o composición del mismo se produce extracelularmente.

En un aspecto, la descripción abarca un microorganismo
5 recombinante para producir un ácido graso ω -OH o derivado de ácido graso *in vivo* cuando se desarrolla en un caldo de fermentación en presencia de una fuente de carbono de una materia prima renovable, el microorganismo tiene una ruta modificada para expresar al menos dos secuencias de ácidos
10 nucleico que codifican un polipéptido que incluye una tioesterasa de EC 3.1.2.- o EC 3.1.1.5 o 3.1.2.14; y una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene al menos 90%, 91%, 93%, 94%, 95%,
15 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID 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
20 NO: 42, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 46. En una modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es una variante de proteína de fusión híbrida CYP153A-RedRhF autosuficiente.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona un

cultivo celular que incluye la célula hospedera recombinante como se plantea en lo anterior (*supra*), en donde el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH o composición del mismo. En una modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH que incluye uno o más de un ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} o derivado de ácido graso o composición del mismo. En una modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C_{16:1} insaturado composición del mismo. En otra modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C₁₆ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C_{12:1} saturado o composición del mismo. En otra modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C₁₂ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C_{14:1} saturado o composición del mismo. En otra modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C₁₄ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el cultivo celular produce un ω -OH C_{18:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C₁₈ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C_{10:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el cultivo celular

produce un ácido graso ω -OH C₁₀ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C_{8:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C₈ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C_{20:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C₂₀ saturado o composición del mismo. En todavía otra modalidad, los ácidos grasos ω -OH saturados o insaturados adicionales o composiciones de los mismos se producen por la célula hospedera recombinante.

Aún otro aspecto de la presente descripción proporciona un método para producir un ácido graso ω -OH que tiene un incremento en el título, incluyendo cultivar la célula hospedera (*supra*) con una fuente de carbono; y cosechar un ácido graso ω -OH o composición del mismo. El método contempla cosechar un ácido graso ω -OH que es un ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} o derivado de ácido graso o composición del mismo. En una modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C_{16:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C₁₆ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el

ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C_{12:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C₁₂ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C_{14:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C₁₄ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C_{18:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C₁₈ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C_{10:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C₁₀ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C_{8:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C₈ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C_{20:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C₂₀ saturado o composición del mismo. En todavía otra modalidad, los ácidos grasos ω -OH saturados o insaturados adicionales o composiciones de los mismos se

producen por el método descrito en la presente.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 93%, 94%, 95%, 5 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 38 tiene al menos una mutación en una posición de aminoácido que incluye la posición 9, 10, 11, 12, 13, 14, 27, 28, 56, 61, 111, 119, 140, 149, 154, 157, 162, 164, 204, 231, 233, 244, 254, 271, 273, 302, 309, 327, 407, 413, 477, 480, 481, 10 527, 544, 546, 557, 567, 591, 648, 649, 703, 706, 707, 708, 709, 710, 719, 720, 736, 741, 745, 747, 749, 757, 770, 771, 784, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de cualquier ácido graso a ácido graso ω -OH o composición del mismo. La variante 15 de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene una mutación en cualquiera de una o más de las siguientes posiciones, incluyendo la posición D9N donde el aspartato (D) se sustituye con (es decir, se reemplaza con) asparagina (N); posición D9K donde el aspartato (D) se sustituye con lisina 20 (K); posición D10Y donde ácido aspártico (D) se sustituye con tirosina (Y); posición I11L donde isoleucina (I) se sustituye con leucina (L); posición Q12W donde glutamina (Q) se sustituye con triptófano (W); posición Q12R donde la glutamina (Q) se sustituye con arginina (R); posición Q12T

donde glutamina (Q) se sustituye con treonina (T); posición S13K donde serina (S) se sustituye con lisina (K); posición R14F donde la arginina (R) se sustituye con fenilalanina (F); posición R27L donde la arginina (R) se sustituye con leucina (L); posición Q28M donde la glutamina (Q) se sustituye con metionina (M); posición Q28T donde la glutamina (Q) se sustituye con treonina (T); posición P56Q donde prolina (P) se sustituye con glutamina (Q); posición N61L donde asparagina (N) se sustituye con leucina (L); posición F111A donde la fenilalanina (F) se sustituye con alanina (A); posición K119R donde lisina (K) se sustituye con arginina (R); posición S140N donde serina (S) se sustituye con asparagina (N); posición P149G donde prolina (P) se sustituye con glicina (G); posición P149R donde prolina (P) se sustituye con arginina (R); posición V154G donde valina (V) se sustituye con glicina (G); posición S157R donde la serina (S) se sustituye con arginina (R); posición V162C donde valina (V) se sustituye con cisteína (C); posición A164N donde la alanina (A) se sustituye con asparagina (N); posición G204V donde glicina (G) se sustituye con valina (V); posición A231W donde alanina (A) se sustituye con triptófano (W); posición A231Y donde alanina (A) se sustituye con tirosina (Y); posición A231V donde alanina (A) se sustituye con valina (V); posición S233L donde serina (S) se sustituye

con leucina (L); posición S233V donde serina (S) se sustituye con valina (V); posición A244R donde alanina (A) se sustituye con arginina (R); posición R254G donde arginina (R) se sustituye con glicina (G); posición E271D donde glutamato (E) se sustituye con aspartato (D); posición P273M donde prolina (P) se sustituye con metionina (M); posición T302M donde treonina (T) se sustituye con metionina (M); posición N309S donde asparagina (N) se sustituye con serie (S); posición P327D donde prolina (P) se sustituye con aspartato (D); posición N407G donde asparagina (N) se sustituye con glicina (G); posición Y413R donde tirosina (Y) se sustituye con arginina (R); posición P477G donde prolina (P) se sustituye con glicina (G); posición I480G donde isoleucina (I) se sustituye con glicina (G); posición G481I donde glicina (G) se sustituye con isoleucina (I); posición D527E donde el aspartato (D) se sustituye con glutamato (E); posición D544N donde el aspartato (D) se sustituye con asparagina (N); posición P546G donde prolina (P) se sustituye con glicina (G); posición E557R donde glutamato (E) se sustituye con arginina (R); posición E557W donde glutamato (E) se sustituye con triptófano (W); posición E567S donde glutamato (E) se sustituye con serie (S); posición E591Q donde glutamato (E) se sustituye con glutamina (Q); posición V648L donde valina (V) se sustituye con leucina (L); posición S649I donde serina

(S) se sustituye con isoleucina (I); posición L703G donde leucina (L) se sustituye con glicina (G); posición L706E donde leucina (L) se sustituye con glutamato (E); posición L706S donde leucina (L) se sustituye con serina (S); posición
5 L706H donde leucina (L) se sustituye con histidina (H); posición D707E donde el aspartato (D) se sustituye con glutamato (E); posición P708S donde prolina (P) se sustituye con serina (S); posición D709L donde el aspartato (D) se sustituye con leucina (L); posición V710C donde valina (V) se
10 sustituye con cisteína (C); posición V710R donde valina (V) se sustituye con arginina (R); posición V710Q donde valina (V) se sustituye con glutamina (Q); posición R719W donde la arginina (R) se sustituye con triptófano (W); posición D720V donde el aspartato (D) se sustituye con valina (V); posición
15 A736V donde alanina (A) se sustituye con valina (V); posición N741G donde asparagina (N) se sustituye con glicina (G); posición P745K donde prolina (P) se sustituye con lisina (K); posición P745R donde prolina (P) se sustituye con arginina (R); posición D747N donde el aspartato (D) se sustituye con
20 asparagina (N); posición E749L donde el glutamato (E) se sustituye con leucina (L); posición E749M donde el glutamato (E) se sustituye con metionina (M); posición E757A donde el glutamato (E) se sustituye con alanina (A); posición T770G donde treonina (T) se sustituye con glicina (G); posición

V771F donde valina (V) se sustituye con fenilalanina (F); y la posición M784I donde metionina (M) se sustituye con isoleucina (I). En una modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es una de proteína de fusión de tipo cyp153A-RedRhF híbrida. En otra modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa en una célula hospedera recombinante da por resultado un título más alto de un ácido graso ω -OH como es comparado con el título de un ácido graso ω -OH producido por la expresión de un polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa en una célula hospedera recombinante. En otra modalidad, el ácido graso ω -OH es una composición de ácido graso ω -OH.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 38 tiene al menos una mutación en una posición de aminoácido que incluye la posición 747, 12, 327, 14, 61, 28, 13, 771, 119, 10, 11, 28, 745, 9, 770, 413, 784, 749, 233, 757, y 703, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de cualquier ácido graso a ácido graso ω -OH. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene una mutación en cualquiera de una o más de las siguientes posiciones,

incluyendo la posición D747N donde el aspartato (D) se
sustituye con asparagina (N); posición Q12W donde glutamina
(Q) se sustituye con triptófano (W); posición Q12R donde
glutamina (Q) se sustituye con arginina (R); posición Q12T
5 donde glutamina (Q) se sustituye con treonina (T); posición
P327D donde prolina (P) se sustituye con aspartato (D);
posición R14F donde la arginina (R) se sustituye con
fenilalanina (F); posición N61L donde asparagina (N) se
sustituye con leucina (L); posición Q28M donde glutamina (Q)
10 se sustituye con metionina (M); posición S13K donde serina
(S) se sustituye con lisina (K); posición V771F donde valina
(V) se sustituye con fenilalanina (F); posición K119R donde
lisina (K) se sustituye con arginina (R); posición D10Y donde
ácido aspártico (D) se sustituye con tirosina (Y); posición
15 I11L donde isoleucina (I) se sustituye con leucina (L);
posición Q28T donde glutamina (Q) se sustituye con treonina
(T); posición P745R donde prolina (P) se sustituye con
arginina (R); posición D9N donde el aspartato (D) se
sustituye con asparagina (N); posición D9K donde el aspartato
20 (D) se sustituye con lisina (K); posición T770G donde
treonina (T) se sustituye con glicina (G); posición Y413R
donde tirosina (Y) se sustituye con arginina (R); posición
M784I donde metionina (M) se sustituye con isoleucina (I);
posición E749L donde glutamato (E) se sustituye con leucina

(L); posición S233L donde serina (S) se sustituye con leucina (L); posición E757A donde glutamato (E) se sustituye con alanina (A); y la posición L703G donde leucina (L) se sustituye con glicina (G). En una modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es una de proteína de fusión de tipo cyp153A-RedRhF híbrida. En otra modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa en una célula hospedera recombinante da por resultado un título más alto de un ácido graso ω -OH como es comparado con el título de un ácido graso ω -OH producido por la expresión de un polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa en una célula hospedera recombinante. En otra modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasas (y que corresponde las secuencias de polinucleótidos) incluyen SEQ ID NOS: 47-96. En otra modalidad, el ácido graso ω -OH es una composición de ácido graso ω -OH.

En un aspecto, la descripción abarca un microorganismo recombinante o célula hospedera recombinante para producir un ácido graso ω -OH o derivado de ácido graso ω -OH *in vivo* cuando se desarrolla en un caldo de fermentación en presencia de una fuente de carbono de una materia prima renovable, el microorganismo tiene una ruta modificada para expresar al menos dos secuencias de ácidos nucleico que codifican un

polipéptido que incluye una tioesterasa de EC 3.1.2.- o EC 3.1.1.5 o 3.1.2.14; y una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene al menos 90%, 91%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, y SEQ ID NO: 96. En una modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es una variante de proteína de fusión híbrida CYP153A-RedRhF autosuficiente.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona un cultivo celular que incluye la célula hospedera recombinante como se plantea en lo anterior (*supra*), en donde el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH f o composición del mismo. En una modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH que incluye uno o más de un ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} o derivado de ácido graso o composición del mismo. En

una modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C_{16:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C₁₆ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C_{12:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C₁₂ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C_{14:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C₁₄ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C_{18:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C₁₈ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C_{10:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C₁₀ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C_{8:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C₈ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C_{20:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH C₂₀ saturado o

composición del mismo. En todavía otra modalidad, ácidos grasos ω -OH saturados o insaturados adicionales o composiciones de los mismos se producen por la célula hospedera recombinante.

5 En aún otro aspecto de la presente descripción proporciona un método para producir un ácido graso ω -OH que tiene un incremento en el título, que incluye cultivar la célula hospedera (*supra*) con una fuente de carbono; y cosechar un ácido graso ω -OH o composición del mismo. En
10 particular, el método abarca producir un ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} o derivado de ácido graso o composición del mismo. En una modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido
15 graso ω -OH C_{16:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C₁₆ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C_{12:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el
20 ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C₁₂ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C_{14:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C₁₄ saturado o composición

del mismo. En una modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C_{18:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C₁₈ saturado o composición del mismo. En una

5 modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C_{10:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C₁₀ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C_{8:1} insaturado o

10 composición del mismo. En otra modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C₈ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C_{20:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido

15 graso ω -OH C₂₀ saturado o composición del mismo. En una modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C_{22:1} insaturado o composición del mismo. En otra modalidad, el ácido graso ω -OH cosechado es un ácido graso ω -OH C₂₂ saturado o composición del mismo.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La presente descripción se entiende mejor cuando se lee en conjunción con las figuras acompañantes, que sirven para ilustrar algunas modalidades preferidas. Se entiende, sin

embargo, que la descripción no se limita a las modalidades específicas descritas en las figuras.

La **Figura 1** es una vista general esquemática de una ruta biosintética ejemplar para la producción de derivados de ácido graso ω -hidroxilados tales como, por ejemplo, ácidos grasos C_{12} ω -hidroxilados (ω -OH C_{12} FFA) y/o ácidos grasos $C_{16:1}$ ω -hidroxilados (ω -OH $C_{16:1}$ FFA) como resultado de expresar la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa y un polipéptido de tioesterasa de un microorganismo recombinante. FAB se refiere a biosíntesis de ácido graso en el microorganismo; fatB1 se refiere a un a acil-ACP tioesterasa de cadena media de *Umbellularia californica* (bahía de California); y fatA3 se refiere a una acil-ACP tioesterasa de cadena largad de *Arabidopsis thaliana*.

La **Figura 2** proporciona un ejemplo de una producción de ácidos grasos ω -hidroxilados como resultado de la expresión de una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa. A fin de ilustrar la producción de ácidos grasos ω -hidroxilados (ω -OH) a través de variantes se empleó una mutagénesis de saturación del sitio. La gráfica representada muestra dos mejores aciertos de una mutagénesis de saturación del sitio de la posición de aminoácidos 141 y 309 de cyp153A(G307A, A796V)-Red450RhF. La figura se refiere a una especie de ácido graso total (total FAS) (ver barras gris

oscuras e); a ácido ω -hidroxihexadecenoico (ω -OH C16:1) (ver la barra gris clara); y el porcentaje de ácidos grasos ω -hidroxi (% ω -OH FFA) (ver flechas).

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Descripción General

Una forma para eliminar la dependencia de los inventores en los petroquímicos es producir derivados de ácidos grasos tales como derivados de ácido graso ω -OH a través de
10 microorganismos ambientalmente aptos que sirven como hospederos de producción miniatura. Tales hospederos celulares (*es decir*, células hospederas recombinantes o microorganismos) se modifican para producir derivados de ácido graso ω -OH y derivados de ácido graso binacionales de
15 fuentes renovables tales como materia prima renovable (*por ejemplo*, carbohidratos fermentables, biomasa, celulosa, glicerol, CO, CO₂, etc.). Estos derivados de ácido graso ω -OH son las materias primas para productos industriales incluyendo químicos de especialidad, polímeros y fragancias.

20

La presente descripción se refiere a polipéptidos de fusión relacionados con ω -hidroxilasa incluyendo polipéptidos de fusión híbridos CYP153A-reductasa y variantes de los mismos que dan por resultado un título alto, producción y/o productividad de composiciones de derivados de ácido graso ω -

OH cuando se expresan en células hospederas recombinantes. En este punto, la biosíntesis de derivados de ácido graso ω -OH mejorada se logra al transformar las células hospederas tal que expresen un polipéptido de fusión híbrido CYP153A-
 5 reductasa o variante del mismo, que catalice la reacción de un ácido graso a un ácido graso ω -OH tal como, por ejemplo, un ácido graso ω -OH C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} o derivado de ácido graso.
 10 La descripción abarca las células hospederas recombinantes o cepas de producción que expresan los polipéptidos de fusión híbridos CYP153A-reductasa y variantes de los mismos. En un aspecto, la descripción se refiere a la subfamilia P450 cyp153A.

15 **Definiciones**

Como se usa en esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "la" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera. De esta
 20 manera, por ejemplo, la referencia a una "célula hospedera" incluye dos o más de tales células hospederas, la referencia a "un éster graso" incluye uno o más ésteres grasos, o mezclas de ésteres, la referencia a "una secuencia de ácido nucleico" incluye una o más secuencias de ácidos nucleico, la

referencia a "una enzima" incluye una o más enzimas, y similares.

El término "número de clasificación de enzimas (EC)" se refiere a un número que indica una actividad enzimática específica. Los números EC clasifican enzimas de acuerdo con la reacción que catalizan bajo un sistema de nomenclatura de enzimas. Los números EC especifican reacciones catalizadas con enzimas. Por ejemplo, si diferentes enzimas de diferentes organismos catalizan la misma reacción, entonces tienen el mismo número EC. Además, diferentes plegamientos de proteínas pueden catalizar una reacción idéntica y por lo tanto se les asignaría un número EC idéntico (por ejemplo, enzimas isofuncionales no homólogas, o NISE). Los números EC se establecen por el comité de nomenclatura de la unión internacional de bioquímica y biología molecular (IUBMB), una descripción de la cual está disponible en el sitio de la red IUBMB en la red mundial. Por ejemplo, la actividad enzimática de citocromo P450 monooxigenasa (p450), incluyendo la actividad enzimática de ω -hidroxilasa o ω -oxigenasa se clasifica bajo EC 1.14.15.3. La funcionalidad de las enzimas que se encuentran bajo la familia de encimas P450 se conserva en la mayoría de procariotas de una especie a la siguiente. De esta manera, diferentes especies microbianas pueden llevar a cabo la misma actividad enzimática que se clasifica bajo EC

1.14.15.3. Un ejemplo de una actividad enzimática que se caracteriza por EC 1.14.15.3 es la actividad enzimática de un polipéptido de fusión híbrido CYP153A- o variante del mismo como se plantea en la presente (*supra*).

5 Los términos "ácido graso omega-hidroxi" o "ácido graso ω -hidroxilado" o "ácido graso ω -hidroxi" o "ácido graso ω -hidróxido" o "ácido graso ω -OH" o "ácido graso ω -OH" se usan intercambiabilmente en la presente y se refieren a un ácido graso que se origina del metabolismo de ácido graso y

10 tiene al menos un grupo H en la posición omega (ω). Ejemplos de tales ácidos grasos ω -hidroxilados son ácidos grasos C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o ácidos grasos C_{20:1}. En una modalidad, tales ácidos

15 grasos ω -hidroxilados son ácidos grasos ω -OH C_{8:0}, ácidos grasos ω -OH C_{10:0}, ácidos grasos ω -OH C_{12:0}, ácidos grasos ω -OH C_{14:0}, ácidos grasos ω -OH C_{16:0}, ácidos grasos ω -OH C_{18:0}, ácidos grasos ω -OH C_{20:0}, ácidos grasos ω -OH C_{8:1}, ácidos grasos ω -OH C_{10:1}, ácidos grasos ω -OH C_{12:1}, ácidos grasos ω -OH C_{14:1}, ácidos

20 grasos ω -OH C_{16:1}, ácidos grasos ω -OH C_{18:1}, ácidos grasos ω -OH C_{20:1}, y similares. En un microorganismo, el ácido graso ω -hidroxilado se puede usar para producir derivados de ácido graso ω -hidroxilados tales como ésteres grasos ω -hidroxilados así como derivados de ácido graso bifuncionales incluyendo

α,ω -diácidos, α,ω -diésteres, y α,ω -dioles. En ese sentido, los términos "derivado de ácido graso omega-hidroxilado" y "derivado de ácido graso ω -hidroxilado" y "derivado de ácido graso ω -hidroxi" y "derivado de ácido graso ω -hidroxilo" y "derivado de ácido graso α,ω -bifuncional y "derivado de ácido graso ω -OH" se refieren a una entidad química que se origina del metabolismo de ácido graso y tiene al menos un grupo OH en la posición omega o se deriva de un intermediario que tiene al menos un grupo OH en la posición omega. En la presente, la "posición omega (ω)" se refiere a un átomo de carbono terminal de un derivado de ácido graso en el extremo opuesto con respecto a su grupo funcional primario tales derivados de ácido graso ω -hidroxilados incluyen, pero no se limitan a, α,ω -diácidos; α,ω -diésteres; α,ω -dioles y químicos derivados de los mismos (*por ejemplo*, macrolactonas).

Una "composición de ácido graso ω -hidroxilado o "una composición de ácido graso o ω -OH" como es referido en la presente se produce por una célula hospedera recombinante e incluye típicamente una mezcla de ciertos tipos de ácidos grasos ω -hidroxilados con varias longitudes de cadena y/o características de saturación y/o ramificación. Similarmente, una "composición de derivado ácido graso ω -hidroxilado" se produce por una célula hospedera recombinante y comprende típicamente una mezcla de ciertos tipos de derivados de ácido

graso ω -hidroxilados con varias longitudes de cadena y/o características de saturación y/o ramificación (*por ejemplo*, ácidos grasos ω -hidroxilados que con varias longitudes de cadena y/o características de saturación y/o ramificación;

5 ésteres graso ω -hidroxilados con varias longitudes de cadena y/o características de saturación y/o ramificación; α,ω -diácidos de varias longitudes de cadena y/o características de saturación y/o ramificación; α,ω -diésteres de varias longitudes de cadena y/o características de saturación y/o

10 ramificación; α,ω -dioles de varias longitudes de cadena y/o características de saturación y/o ramificación; y similares). En algunos casos, la composición de derivados de ácidos grasos ω -OH incluye principalmente un tipo de derivado de ácido graso ω -OH tal como, *por ejemplo*, 1,12-dodecenodiol, o

15 1,14-tetradecanediol, o éster metílico de ácido 16-hidroxi hexadecanoico, o ácido 16-hidroxihexadecenoico o ácido, 15-hidroxi pentadecanoico, o ácido 15-hidroxi pentadecenoico, o ácido 18-hidroxi octadecenoico, o ésteres de metilo de cualquiera de estos derivados de ácido graso, u otros. En aun

20 otros casos, la composición de derivado de ácido graso ω -OH comprende una mezcla de más de un tipo de derivado de ácido graso ω -OH a fin de proporcionar una composición específicamente diseñada (*por ejemplo*, aproximadamente 20% de ácido 12-hidroxi dodecanoico y aproximadamente 80% de ácido

1,14-14-hidroxitetradecanoico en la misma composición proporcionarían tal ejemplo).

El término "número de acceso" o "número de acceso NCBI" o "número de acceso de GenBank" se refiere a un número que indica una secuencia de ácido nucleico específica. Los números de acceso de secuencia que se plantea en esas descripciones se obtuvieron de las bases de datos proporcionadas por el NCBI (National Center for Biotechnology Information) mantenido por National Institutes of Health, E.U.A., y de UniProt Knowledgebase (UniProtKB) y las bases de datos Swiss-prot proporcionada por Swiss Institute of Bioinformatics (también referida como el número de acceso UniProtKB).

Como se usa en la presente, el término "nucleótido" se refiere a una unidad monomérica de un polinucleótido que consiste de una base heterocíclica, una azúcar, y uno o más grupos fosfato. Las bases de origen natural (guanina (G), adenina (A), citosina, (C), timina (T), y uracilo (U) son típicamente derivados de purina o pirimidina, aunque se dé a entender que también se incluyen a análogos de base es la pentosa (cinco carbonos de azúcar), desoxiribosa, (que forma ADN) o ribosa (que forma ARN), aunque se debe entender que los análogos de azúcar de origen natural y no natural también se incluyen. Los ácidos nucleicos se ligan típicamente a

través de ligaciones de fosfato para formar ácidos nucleicos o polinucleótidos, aunque muchas otras ligaciones son conocidas en la técnica (por ejemplo, fosforotioatos, boranofosfatos, y similares).

5 El término "polinucleótidos" se refiere a un polímero de ribonucleótidos (ARN) o de desoxiribonucleótidos (ADN), que pueden ser de hebra individual o doble hebra y que pueden contener nucleótidos no naturales o alterados. Los términos "polinucleótidos", "secuencia de ácido nucleico", y
10 "secuencia de nucleótidos se usan intercambiabilmente en la presente para referirse a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea ARN o ADN. Estos términos se refieren a la estructura primaria de la molécula, y de esa manera incluyen ADN de doble hebra y hebra individual, y ARN
15 de doble hebra y hebra individual. Los términos incluyen, como equivalentes, análogos de y asea ARN o ADN fabricados de análogos de nucleótidos y polinucleótidos modificados tales como, pero aunque no limitados a polinucleótidos metilados y/o terminados. El polinucleótido puede estar en cualquier
20 forma, incluyendo pero no limitado a plásmido, viral, cromosómico, ADNc, ARNm y ARNr.

Como se usa en la presente, los términos "polipéptido" y "proteína" se usan intercambiabilmente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. El término "polipéptido

recombinante" se refiere a un polipéptido que se produce por técnicas recombinantes, en donde en general el ADN o el ARN que codifican la proteína expresada sin se inserta en un vector de expresión adecuado que a su vez se usa para

5 transformar una célula hospedera para producir el polipéptido. Similarmente, los términos "polinucleótido recombinante" o "ácido nucleico recombinante" o "ADN recombinante" se producen por técnicas recombinantes que son conocidas por aquellas personas sin experiencia en el campo.

10 Los términos "homólogo" y "homólogos" se refieren a un polinucleótido o polipéptido que comprende una secuencia que es al menos aproximadamente 50 por ciento (%) idéntica a la secuencia de polinucleótidos o polipéptidos correspondiente. De manera preferente los polinucleótidos homólogos o

15 polipéptidos tienen secuencia de polinucleótidos o secuencia de aminoácidos que tienen al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o al menos aproximadamente 99% homología a la secuencia de aminoácidos correspondiente o

20 secuencia de polinucleótidos. Como se usa en la presente los términos "homología" de secuencia y "identidad de secuencia se usan intercambiabilmente. Una persona de experiencia ordinaria en la técnica sabe bien de los métodos para determinar la homología entre dos o más secuencias.

Brevemente, los cálculos de "homología" entre dos secuencias se pueden llevar a cabo como sigue. Las secuencias se alinean para propósitos de comparación optima (por ejemplo, los espacios se pueden introducir en una o ambas de una primera y
5 segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico para la lineación optima y las secuencia no homologas se pueden eliminar para propósitos de comparación. En una modalidad preferida, la longitud de una primera secuencia que se alinea para propósitos de comparaciones al menos aproximadamente
10 30%, de manera preferente al menos aproximadamente 40%, de manera más preferente al menos aproximadamente 50%, de manera aún más preferente al menos aproximadamente 60%, y de manera aún más preferente al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85 al menos
15 aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o aproximadamente 100% de la longitud de una segunda secuencia. Los residuos de aminoácidos son nucleótidos en las posiciones de aminoácidos correspondientes o posiciones de nucleótidos de la primera y segunda secuencia
20 se comparan. Cuando una posición en la primera secuencia se ocupa por el mismo residuo de aminoácidos o nucleótido como la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de homología entre las dos secuencias es una función de

posiciones idénticas compartidas por las secuencias, tomando en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, se necesita ser introducido para la alineación de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático, tal como BLAST (Altschul y colaboradores (1990) *J. Mol. Biol.* 215(3):403-410). El porcentaje de homología entre las dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG, usando ya sea una matriz Bloussum 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6 (Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-453). El porcentaje de homología entre dos secuencias de nucleótidos también se puede determinar usando el programa GAP en el paquete de software GCG como usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de espacio de espacio de 40, 50, 60, 70, o 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o de 6. Una persona de experiencia ordinaria en la técnica puede llevar a cabo cálculos de homología iniciales de y ajustar los parámetros del algoritmo por consiguiente. Un conjunto de parámetros preferido (y el que se debe usar si un profesional no está seguro acerca de que parámetros debe ser aplicado

para determinar si una molécula está dentro de una limitación de homología de las reivindicaciones) son una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización de espacios de 12, una penalización de extensión de espacio de 4, y una
5 penalización de espacio del marco de 5. Los métodos adicionales de la alineación de secuencia son conocidos en las técnicas de biotecnología (ver, por ejemplo, Rosenberg (2005) *BMC Bioinformatics* 6:278; Altschul y colaboradores (2005) *FEBS J.* 272(20):5101-5109).

10 El término "se hibrida bajo rigurosidad baja, rigurosidad media, rigurosidad alta, o condiciones de rigurosidad muy altas" describe condiciones para hibridación y lavado. La guía para llevar a cabo las reacciones de hibridación se pueden encontrar en Current Protocols in
15 Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1 - 6.3.6. Se describen métodos acuosos y no acuosos se describen en que se pueden usar esa referencia y cualquier método. Las condiciones de hibridación específicas referidas en la presente son como siguen; (1) condiciones de hibridación de
20 rigurosidad baja -- cloruro de sodio/citrato de sodio 6x (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por dos lavados en 0.2X SSC, 0.1% de SDS al menos a 50°C (la temperatura de las lavadas se puede incrementar a 55°C para condiciones bajas); (2) condiciones de hibridación de rigurosidad media -- 6X SSC

a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en 0.2X SSC, 0.1% de SDS a 60°C; (3) condiciones de hibridación de rigurosidad alta -- 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en 0.2.X SSC, 0.1% de SDS a 65°C; y (4) condiciones de hibridación de rigurosidad muy alta fosfato de sodio -- 0.5M, 7% de SDS a 65°C, seguido por uno o más lavados a 02X SSC, 1% de SDS a 65°C. Las condiciones de rigurosidad muy alta (4) son las condiciones preferidas al menos que se especifique de otra manera.

Un polipéptido "endógeno" se refiere a un polipéptido codificado por el genoma de la célula precursora (o célula hospedera). Un polipéptido "exógeno" se refiere a un polipéptido que no se codifica por el genoma de la célula precursora. Un polipéptido variante o mutante es un ejemplo de un polipéptido exógeno. De esta manera, una molécula de ácido nucleico no de origen natural se considera que es exógena una célula una vez que se introduce en la célula. Una molécula de ácido nucleico que es de origen natural también puede ser exógena a una célula particular. Por ejemplo, una secuencia de codificación completa aislada de la célula X es un ácido nucleico exógeno con respecto a la célula Y, una vez que la secuencia de codificación se introduce en la célula Y, aun si X e Y son del mismo tipo de célula.

El término "sobreexpresado" significa que un gen es

provocado para ser transcrito en una velocidad elevada comparado con una velocidad de transcripción endógena para ese gen. En algunos ejemplos, la sobre expresión incluye una adicionalmente una velocidad elevada de traducción de un gen comparado con la velocidad de traducción endógena para ese gen. Los métodos para probar la sobreexpresión son bien conocidos en la técnica, por ejemplo los niveles de ARN transcritos se pueden evaluar usando los niveles de PCRrt y proteínas que se pueden evaluar usando el análisis de gel SDS page.

El término "heterólogos" significativa derivado de un organismo diferente, tipo de célula diferente, o especie diferente. Como se usa en la presente se refiere a una secuencia de nucleótidos, polinucleótidos, polipéptidos o proteínas, no naturalmente presentes en un organismo dado. Por ejemplo una secuencia de polinucleótidos que es nativa a cianobacterias se puede introducir en una célula de hospedera de *E. coli* por métodos recombinantes, el polinucleótido de una cianobacteria después es heterólogo a la célula de *E. coli* (por ejemplo, célula recombinante). El término "heterólogo" también se puede usar con referencia a una secuencia de nucleótidos, polinucleótidos, polipéptido o proteína que está presente en una célula hospedera recombinante en un estado no nativo. Por ejemplo, una

secuencia de nucleótidos, polinucleótidos, polipéptidos o proteínas "heterólogas" se puede modificar con respecto a la secuencia del tipo natural presente naturalmente en la célula hospedera de tipo natural correspondiente, por ejemplo, una
5 modificación en el nivel de expresión o en la secuencia de un nucleótido, polinucleótido, polipéptido o proteína.

Como se usa en la presente, el término "fragmento" de un polipéptido se refiere a una porción más corta de un polipéptido de longitud completa o proteína que varía en
10 tamaño de dos residuos de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos entera menos un residuo de aminoácido. En ciertas modalidades de la descripción, un fragmento se refiere una secuencia de aminoácidos completa de un dominio de un polipéptido proteína (por ejemplo, un dominio de ligación a
15 sustrato o un dominio catalítico).

El término "mutagénesis" se refiere a un proceso por el cual la información genética de un organismo se cambia en una manera adecuada. La mutagénesis de una proteína que codifica la secuencia de ácidos nucleicos produce una
20 proteína mutante. La mutagénesis también se refiere a cambios en las secuencias de ácidos nucleico no decodificación que da por resultado la actividad de la proteína modificada.

Una "mutación", como se refiere en la presente a un cambio permanente en una posición de ácido nucleico de un gen

o en una posición de aminoácido de un polipéptido proteína. Las mutaciones incluyen sustituciones, adicciones, inserciones y supresiones. Por ejemplo, una mutación en una posición de amino ácidos puede ser una sustitución de un tipo
5 de aminoácido con otro tipo de aminoácido (por ejemplo una serina (S) se puede sustituir con una alanina (A); una lisina (L) se puede sustituir con una treonina (T); etcétera). Como tal, un polipéptido o proteína pueden tener una o más mutaciones en donde un aminoácido se sustituye con otro
10 aminoácido.

Como se usa en la presente el término "gen" se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que codifican ya sea un producto de ARN o un producto de proteína, así como secuencias de ácidos nucleico operablemente ligadas que
15 afecta la expresión del ARN o proteína que (por ejemplo, tales secuencias se incluyen pero no se limitan a secuencias promotoras o potenciadoras) o secuencias de ácidos nucleico operablemente ligadas que codifican secuencias que afectan la expresión de ARN o proteína (por ejemplo, tales secuencias se
20 incluyen pero no se limitan a sitios de ligación a ribosoma o secuencias de control traduccionales).

Las secuencias de control de expresión son conocidas en la técnica e incluyen por ejemplo, promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores de transcripción,

sitios de entrada a ribosoma interno (IRES), y similares, que proporcionan la expresión de la secuencia de polinucleótidos en una célula hospedera. Las secuencias de control de expresión interactúan específicamente con las proteínas celulares implicadas en la transcripción (Maniatis y colaboradores (1987) *Science* 236:1237-1245). Las secuencias de control de expresión ejemplares se describen en, por ejemplo, Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). En los métodos de la descripción, una secuencia de control de expresión se liga operablemente a una secuencia de polinucleótidos. Por "operablemente ligados" se propone que una secuencia de polinucleótidos y una secuencia de control de expresión se conecten de tal manera para permitir la expresión génica cuando las moléculas apropiadas (por ejemplo, proteínas activadoras transcripcionales) se ligan a la secuencia de control de expresión. Los promotores operablemente ligados se sitúan cadena arriba de las secuencia de polinucleótidos seleccionada en términos de la dirección de la transcripción y traducción. Los potenciadores operablemente ligados se pueden situar cadena arriba, dentro, o cadena abajo del polinucleótido seleccionado.

Como se usa en la presente, el término "vector" se refiere a una molécula de amino ácido capaz de transportar

otro ácido nucleico, es decir, una secuencia de polinucleótidos, a la cual se ha ligado. Un tipo de vector útil es un epizona (es decir, un ácido nucleico capaz de replicación extracromosómica). Los vectores útiles son aquellos capaces de replicación y/o expresión autónoma de los ácidos nucleicos a los cuales se ligan. Los vectores capaces de direccionar la expresión de los genes a los cuales se ligan operativamente son referidos en la presente como "vectores de expresión. En general los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en la forma de "plásmidos", que se refieren en general a bucles de ADN de doble hebra circulares que, en su forma de vector no se ligan al cromosoma. Otros vectores de expresión útiles se proporcionan en forma lineal. También se incluyen tales otras formas de vectores de expresión que sirven funciones equivalentes y que se han conocido en la técnica subsecuentemente a los mismos. En algunas modalidades, un vector recombinante incluye además un promotor operablemente ligado a la secuencia de polinucleótidos. En algunas modalidades el promotor es un promotor desarrolladamente regulado, un promotor específico de organelo, un promotor específico de tejido, un promotor inducible, un promotor constitutivo, o un promotor específico de célula. El vector recombinante comprende típicamente al

menos una secuencia seleccionada de una secuencia de control de expresión acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótidos; un marcador de selección acoplado operativamente a la secuencia de polinucleótidos; una
5 secuencia marcadora acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótidos; una porción de purificación acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótidos; una secuencia de secreción acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótidos; y una secuencia de orientación acoplada
10 operativamente a la secuencia de polinucleótidos. En ciertas modalidades, la secuencia de nucleótidos se incorpora establemente en el ADN genómico de la célula hospedera, y la expresión de la secuencia de nucleótidos esta abajo el control de una región promotora regulada. Los vectores de
15 expresión como se usa en la presente incluyen una secuencia de polinucleótidos particular como se describe en la presente de una forma adecuada para la expresión de la secuencia de polinucleótidos en una células hospedera. Se apreciará por aquellas personas expertas en la técnica que el diseño del
20 vector de expresión pueden depender de tales factores como la elección de la célula hospedera que se transforma, en nivel de expresión del polipéptido deseado, etcétera. Los vectores de expresión descritos en la presente se pueden introducir en las células hospederas para producir polipéptidos, incluyendo

polipéptidos de fusión, codificados por la secuencia de polinucleótidos como se describe en la presente. La expresión de los genes que codifican polipéptidos en los procariotas, por ejemplo *E. coli*, se lleva a cabo más frecuentemente con
5 vectores que contienen promotores consecutivos o inducibles que dirigen la expresión de ya sea los polipéptidos de fusión o no de fusión. Los vectores de fusión agregan una variedad de aminoácidos a un polipéptido codificado en los mismos, usualmente al amino o carboxi-terminal del polipéptido
10 recombinante. Tales vectores de fusión sirven típicamente uno o más de los siguientes tres propósitos, incluyendo para incrementar la expresión del polipéptido recombinante; para incrementar la solubilidad del polipéptido recombinante; y para ayudar en la purificación del polipéptido recombinante
15 al actuar como un ligando en la purificación por afinidad. Frecuentemente, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de incisión proteolítico en la unión de la porción de fusión y el polipéptido recombinante. Esto permite la separación del polipéptido recombinante de la porción de
20 fusión después de la purificación del polipéptido de fusión. En ciertas modalidades, una secuencia de polinucleótidos de la descripción se liga operablemente a un promotor derivado de bacteriófago T5.

En ciertas modalidades, la célula hospedera es una

célula de levadura, y el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Ejemplos de vectores para expresión en la levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari y colaboradores (1987) *EMBO J.* 6:229-234); pMFa (Kurjan y colaboradores (1982) *Cell* 30:933-943); pJRY88 (Schultz y colaboradores (1987) *Gene* 54: 113-123); pYES2 (Invitrogen Corp., San Diego, CA), y picZ (Invitrogen Corp., San Diego, CA). En otras modalidades, la célula hospedera es una célula de insecto, y el vector de expresión es un vector de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de la proteína en las células de insecto cultivadas (por ejemplo, células SF9) incluyen por ejemplo, la serie pAc (Smith y colaboradores (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y colaboradores (1989) *Virology* 170:31-39). En otra modalidad, las secuencias de polinucleótidos descritos en la presente se pueden expresar en las células de mamíferos usando un vector de expresión de mamífero; Otros sistemas de expresión adecuados para células tanto como procariotas como eucariotas son bien conocidos en la técnica; ver por ejemplo, Sambrook y colaboradores, "Moléculas Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989).

Como se usa en la presente, el término "CoA" o "acil-CoA" se refiere a un tioéster de acilo formado entre el

carbono de carbonilo de la cadena de alquilo y el grupo sulfhidrilo de la porción de 4'-fosfopantetionilo de la coenzima A (CoA), que tiene la fórmula $R-C(O)S-CoA$, donde R es un grupo alquilo que tiene al menos 4 átomos de carbono.

5 El término "ACP" significa proteína portadora de asilo. ACP es un portador sumamente conservado de intermediarios de asilo durante la biosíntesis del ácido graso, en donde la cadena de crecimiento se liga durante la síntesis como un éster de tiol en el tiol distal de una porción de 4'-
10 fosfopanteteína. La proteína existen dos fórmulas, *es decir*, apo-ACP (inactiva en la biosíntesis del ácido graso) y ACP o holo-ACP (activa en la biosíntesis del ácido graso). Los términos "ACP" y "holo-ACP" se usa intercambiable en la presente y se refieren a la forma activa de la proteína. Una
15 enzima llamada una fosfopanteteiniltrasferasa se implica en la conversión de la apo-ACP inactiva a la holo-ACP activa. De manera más específica la ACP se expresa en la forma apo-ACP inactiva y una porción de 4'-fosfopanteteína se debe unir pos-traduccionalmente a un residuo de serina conservado en la
20 ACP por la acción de la proteína sintasa portadora de holo-acilo (ACPS), una fosfopanteteiniltrasferasa a fin de producir holo-ACP.

Como se usa en la presente, el término "acil-ACP" se refiere a un tioéster de acilo formado entre el carbono de

carbonilo de una cadena de alquilo y el grupo sulfhidrilo de la porción de fosfopanteteinilo de una proteína portadora de acilo (ACP). En algunas modalidades una ACP es un intermediario en la síntesis de las acilo-ACPs completamente saturadas. En otras modalidades una ACP es un intermediario en la síntesis de acilo-ACPs insaturadas. En algunas modalidades, la cadena de carbono tendrá aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o 26 carbonos.

10 Como se usa en la presente, el término "derivado de ácido graso" significa un "ácido graso" o un "derivado de ácido graso", que puede ser referido como un "f ácido graso o derivado del mismo". El término "ácido graso" significa un ácido graso carboxílico que tiene la fórmula RCOOH . R
15 representa un grupo alifático, de manera preferente un grupo alquilo. R puede incluir entre aproximadamente 4 y aproximadamente 22 átomos de carbono. Los ácidos grasos se pueden saturar, monoinsaturar, o poliinsaturar. Un "derivado de ácido graso" es un producto preparado en parte de la ruta
20 biosintética de ácido graso del organismo hospedero de producción (por ejemplo, célula hospedera o microorganismo recombinante). "Derivados de ácido graso" incluye productos preparados en parte de ACP, acil-ACP o derivados de acil-ACP. Los derivados de ácido graso ejemplares incluyen, por

ejemplo, acil-CoA, ácidos grasos, aldehídos grasos, alcoholes de cadena corta y larga, alcoholes grasos, hidrocarburos, ésteres (*por ejemplo*, ceras, ésteres de ácido graso, o ésteres grasos), olefinas terminales, olefinas internas, 5 cetonas así como ácidos grasos ω -OH y derivados de ácidos grasos ω -OH de los mismos incluyendo α,ω -diácidos, y otros compuestos bifuncionales.

Como se usa en la presente, el término "ruta biosintética de ácido graso" significa una ruta biosintética 10 que produce ácidos grasos y derivados de los mismos. La ruta biosintética de ácidos grasos puede incluir enzimas adicionales para producir derivados de ácidos grasos que tienen las características deseadas.

El grupo R de un ácido graso puede ser una cadena recta 15 o una cadena ramificada. Las cadenas ramificadas pueden tener más de un punto de ramificación y pueden incluir ramificaciones cíclicas. En algunas modalidades, el ácido graso ramificado es un ácido graso ramificado C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃, 20 C₂₄, C₂₅, o C₂₆. En otras modalidades, el ácido graso ramificado es un ácido graso ramificado C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, o C₂₀. En ciertas modalidades, el grupo hidroxilo (OH) del ácido graso ramificado está en la posición omega (ω). En ciertas modalidades, el ácido graso ramificado

es un iso-ácido graso o un ante-iso-ácido graso. En modalidades ejemplares, el ácido graso ramificado se selecciona de ácido graso ramificado iso-C_{7:0}-, iso-C_{8:0}-, iso-C_{9:0}-, iso-C_{10:0}-, iso-C_{11:0}-, iso-C_{12:0}-, iso-C_{13:0}-, iso-C_{14:0}-,
 5 iso-C_{15:0}-, iso-C_{16:0}-, iso-C_{17:0}-, iso-C_{18:0}-, iso-C_{19:0}-, iso-C_{20:0}, anteiso-C_{7:0}-, anteiso-C_{9:0}-, anteiso-C_{11:0}-, anteiso-C_{13:0}-, anteiso-C_{15:0}-, anteiso-C_{17:0}-, y anteiso-C_{19:0}.

El grupo R de un ácido graso puede estar saturado o insaturado. Si está insaturado, el grupo R puede tener uno o
 10 más de un punto de insaturación. En algunas modalidades, el ácido graso insaturado es un ácido graso monoinsaturado. En ciertas modalidades, el ácido graso insaturado es un ácido graso insaturado C_{8:1}-, C_{9:1}-, C_{10:1}-, C_{11:1}-, C_{12:1}-, C_{13:1}-, C_{14:1}-, C_{15:1}-, C_{16:1}-, C_{17:1}-, C_{18:1}-, C_{19:1}-, C_{20:1}-, C_{21:1}-, C_{22:1}-, C_{23:1}-,
 15 C_{24:1}-, C_{25:1}-, o C_{26:1}. En ciertas modalidades, el ácido graso insaturado es C_{8:1}, C_{10:1}, C_{12:1}, C_{14:1}, C_{16:1}, C_{18:1}, o C_{20:1}. En todavía otras modalidades, el ácido graso insaturado está insaturado en la posición omega-7. En ciertas modalidades, el ácido graso insaturado tiene una ligación doble cis.

20 Como se usa en la presente, una "célula hospedera recombinante" o "célula hospedera modificada" es una célula hospedera, por ejemplo, un microorganismo que se ha modificado tal que produce ácidos grasos ω -hidroxilados y derivados de ácidos grasos ω -hidroxilados incluyendo

derivados de ácido graso bifuncionales. En algunas modalidades, la célula hospedera recombinante incluye uno o más polinucleótidos, cada polinucleótido codifica un polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa o una
5 variante del mismo que tiene actividad de enzima biosintética ω -hidroxilasa, en donde la célula hospedera recombinante produce un ácido graso ω -hidroxilado y/o derivado de ácido graso ω -hidroxilados o composición del mismo cuando se cultiva en presencia de una fuente de carbono bajo
10 condiciones efectivas para expresar los polinucleótidos.

Como se usa en la presente, el término "clon" se refiere típicamente a una célula o un grupo de células descendientes de y esencialmente de manera genética idénticas a un ancestro común individual, por ejemplo, la bacteria de una colonia
15 bacteriana clonada surgió de una célula bacteriana individual.

Como se usa en la presente, el término "cultivo" se refiere típicamente a un medido líquido que comprende células viables. En una modalidad, un cultivo comprende células que
20 se reproducen en un medio de cultivo predeterminado bajo condiciones controladas, por ejemplo, un cultivo de células hospederas recombinantes desarrolladas en un medio líquido que comprende una fuente de carbono seleccionada y/o nitrógeno.

Los términos "cultivar" o "cultivo" se refieren a desarrollar una población de células (*por ejemplo*, células microbianas) bajo condiciones adecuadas en un medio líquido sólido. En modalidades particulares, cultivar se refiere a la bioconversión fermentativa de un substrato a un producto final. Los medios de cultivo son bien conocidos y los componentes individuales de tales medios de cultivo son disponibles de fuentes comerciales, *por ejemplo*, bajo el medio DIFCO y el medio BBL. En un ejemplo no limitante, el medio de nutrientes acuoso es un "medio rico" que comprende fuentes complejas de nitrógeno, sales, y carbono, tales como el medio YP, que comprende 10 g/L de peptona y 10 g/L de extracto de levadura de tal medio. Además, la célula hospedera se puede modificar para asimilar el carbono eficientemente y usar materiales celulósicos como fuentes de carbono de acuerdo con los métodos descritos, *por ejemplo*, en las Patentes de E.U.A. Nos. 5,000,000; 5,028,539; 5,424,202; 5,482,846; 5,602,030 y WO2010127318. Además, la célula hospedera se puede modificar para expresar una invertasa de modo que la sacarosa se puede usar como una fuente de carbono.

Como se usa en la presente, el término "bajo condiciones efectivas para expresar las secuencias de nucleótidos heterólogas" significa cualquier condición que permita que

una célula hospedera produzca un derivado de ácido graso deseado (*por ejemplo*, ácido graso ω -OH y/o derivado de ácido graso ω -OH). Las condiciones adecuadas incluyen, *por ejemplo*, condiciones de fermentación.

5 Como se usa en la presente, "modificado" o un "nivel alterado de" actividad de una proteína, *por ejemplo* una enzima, en una célula hospedera recombinante se refiere a una diferencia en una o más características en la actividad determinada con respecto a la célula hospedera precursora no
10 nativa. Típicamente las diferencias en la actividad se determinan entre una célula hospedera recombinante, que tiene actividad modificada, y la célula hospedera de tipo natural correspondiente (*por ejemplo*, comparación de un cultivo de una célula hospedera recombinante con respecto a la célula
15 hospedera de tipo natural). Las actividades modificadas pueden ser el resultado de, *por ejemplo*, cantidades modificadas de proteína expresada por una célula hospedera recombinante (*por ejemplo*, como el resultado del número incrementado disminuido de copias de las secuencias de ADN
20 que codifica la proteína, número incrementado o disminuido de transcritos de ARNm que codifican la proteína, y/o cantidades incrementadas o disminuidas de la traducción de proteínas de la proteína de ARNm); cambios en la estructura de la proteína (*por ejemplo*, cambios a la estructura

primaria, tal como, cambios a la secuencia de codificación de la proteína que da por resultado cambios en la especificidad del substrato, cambios en los parámetros cinéticos observados); y cambios en la estabilidad de la proteína (por ejemplo, degradación incrementada o disminuida de la proteína). En algunas modalidades, el polipéptido es un mutante o una variante de cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente. En ciertos casos, la secuencia de codificación para los polipéptidos como se describe en la presente se optimizan con codón para la expresión en una célula hospedera particular. Por ejemplo, para la expresión en *E. coli*, se pueden optimizar uno o más codones (Grosjean y colaboradores (1982) Gene 18:199-209).

El término "secuencias reguladoras" como se usa en la presente se refiere típicamente a una secuencia de bases en el ADN, operablemente ligada a la secuencias de ADN que codifican una proteína que controla finalmente la expresión de la proteína. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras ARN, secuencias de ligación al factor de transcripción, secuencias de terminación de transcripción, moduladores de transcripción tales como elementos potenciadores), secuencias de nucleótidos que afectan la estabilidad del ARN, y secuencias reguladoras transduccionales (tales como, sitios de ligación

a ribosoma (*por ejemplo*, secuencias Shine-Dalgarno en procariotas o secuencias Kozak en eucariotas), codones de inicio, codones de terminación).

Como se usa en la presente, la frase "la expresión de la
5 secuencia de nucleótidos se modifica con respecto a la
secuencia de nucleótidos de tipo natural", significa un
incremento o disminución en el nivel de la expresión y/o
actividad de una secuencia de nucleótidos endógena o la
expresión y/o actividad de una secuencia de nucleótidos que
10 codifica el polipéptido heterólogo no nativo.

Como se usa en la presente, la frase "la actividad de
una variante de secuencia de polipéptido de fusión híbrido
CYP153A-reductasa se modifica con respecto a la actividad de
una secuencia de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-
15 reductasa (*es decir*, una plantilla de polipéptidos) significa
un incremento o disminución en el nivel de actividad de una
variante de secuencia de polipéptidos expresada en
comparación con una plantilla de secuencias de polipéptido
expresada. La plantilla de polipéptido se codifica por una
20 plantilla de ácido nucleico (*es decir*, una secuencia de
plantilla de ADN). Un ejemplo de una plantilla de secuencia
de polipéptido es la secuencia de proteínas de fusión
cyp153A-RedRhF híbridas en donde un cyp153A se fusiona con un
dominio reductasa. Otro ejemplo de una plantilla de secuencia

de polipéptido es SEQ ID NO: 6. Otro ejemplo de una plantilla de secuencia de polipéptido es SEQ ID NO: 38. Cualquier secuencia de polipéptido puede servir como una plantilla incluyendo variantes.

5 Como se usa en la presente, el término "expresa" con respecto a un polinucleótido es para provocarlo o funcionar. Un polinucleótido que codifica un polipéptido (o proteína), cuando se expresa, se transcribirá y se traducirá para producir ese polipéptido (o proteína). Como se usa en la
10 presente, el término "sobreexpresa" significa que expresa (o provoca que exprese) un polinucleótido o polipéptido en una célula en mayor concentración que se expresa normalmente en una célula de tipo natural correspondiente bajo las mismas condiciones. En otra modalidad, el término "sobreexpresa"
15 significa expresar (o provocar que exprese) un polinucleótido o polipéptido en una célula en una concentración más alta que se expresa normalmente en una célula correspondiente que expresa la secuencia de polinucleótido de plantilla o polipéptido de plantilla bajo las mismas condiciones. Un
20 ejemplo de una secuencia de polipéptido de plantilla es el polipéptido de fusión híbrido CYP153A-RedRhF.

Los términos "nivel alterado de expresión" y "nivel modificado de expresión" se usan intercambiabilmente y proponen que un polinucleótido, polipéptido, o derivado de

ácido graso esté presente en una diferente concentración en una célula hospedera modificada como es comparada con su concentración en una célula de tipo natural correspondiente bajo las mismas condiciones.

5 Como se usa en la presente, el término "título" se refiere a la cantidad de ácidos grasos ω -OH y/o derivados de ácidos grasos ω -OH producidos por volumen unitario del cultivo de células hospederas. En cualquier aspecto de las composiciones y métodos descritos en la presente, un ácido

10 graso ω -OH y/o derivado de ácido graso ω -OH se produce en un título de aproximadamente 25 mg/L, aproximadamente 50 mg/L, aproximadamente 75 mg/L, aproximadamente 100 mg/L, aproximadamente 125 mg/L, aproximadamente 150 mg/L, aproximadamente 175 mg/L, aproximadamente 200 mg/L,

15 aproximadamente 225 mg/L, aproximadamente 250 mg/L, aproximadamente 275 mg/L, aproximadamente 300 mg/L, aproximadamente 325 mg/L, aproximadamente 350 mg/L, aproximadamente 375 mg/L, aproximadamente 400 mg/L, aproximadamente 425 mg/L, aproximadamente 450 mg/L,

20 aproximadamente 475 mg/L, aproximadamente 500 mg/L, aproximadamente 525 mg/L, aproximadamente 550 mg/L, aproximadamente 575 mg/L, aproximadamente 600 mg/L, aproximadamente 625 mg/L, aproximadamente 650 mg/L, aproximadamente 675 mg/L, aproximadamente 700 mg/L,

	aproximadamente	725	mg/L,	aproximadamente	750	mg/L,
	aproximadamente	775	mg/L,	aproximadamente	800	mg/L,
	aproximadamente	825	mg/L,	aproximadamente	850	mg/L,
	aproximadamente	875	mg/L,	aproximadamente	900	mg/L,
5	aproximadamente	925	mg/L,	aproximadamente	950	mg/L,
	aproximadamente	975	mg/L,	aproximadamente	1000	mg/L,
	aproximadamente	1050	mg/L,	aproximadamente	1075	mg/L,
	aproximadamente	1100	mg/L,	aproximadamente	1125	mg/L,
	aproximadamente	1150	mg/L,	aproximadamente	1175	mg/L,
10	aproximadamente	1200	mg/L,	aproximadamente	1225	mg/L,
	aproximadamente	1250	mg/L,	aproximadamente	1275	mg/L,
	aproximadamente	1300	mg/L,	aproximadamente	1325	mg/L,
	aproximadamente	1350	mg/L,	aproximadamente	1375	mg/L,
	aproximadamente	1400	mg/L,	aproximadamente	1425	mg/L,
15	aproximadamente	1450	mg/L,	aproximadamente	1475	mg/L,
	aproximadamente	1500	mg/L,	aproximadamente	1525	mg/L,
	aproximadamente	1550	mg/L,	aproximadamente	1575	mg/L,
	aproximadamente	1600	mg/L,	aproximadamente	1625	mg/L,
	aproximadamente	1650	mg/L,	aproximadamente	1675	mg/L,
20	aproximadamente	1700	mg/L,	aproximadamente	1725	mg/L,
	aproximadamente	1750	mg/L,	aproximadamente	1775	mg/L,
	aproximadamente	1800	mg/L,	aproximadamente	1825	mg/L,
	aproximadamente	1850	mg/L,	aproximadamente	1875	mg/L,
	aproximadamente	1900	mg/L,	aproximadamente	1925	mg/L,

aproximadamente 1950 mg/L, aproximadamente 1975 mg/L, aproximadamente 2000 mg/L (2g/L), 3g/L, 5g/L, 10g/L, 20g/L, 30g/L, 40g/L, 50g/L, 60g/L, 70g/L, 80g/L, 90g/L, 100g/L o un intervalo unido por cualquiera de dos de los valores
5 anteriores. En otras modalidades, un ácido graso ω -OH y/o derivado de ácido graso ω -OH se produce en un título además de 100g/L, más de 200g/L, más de 300g/L, o más alto, tal como 500 g/L, 700 g/L, 1000 g/L, 1200 g/L, 1500 g/L, o 2000 g/L. En una modalidad, el título de un ácido graso ω -OH y/o
10 derivado de ácido graso ω -OH producido por una célula hospedera recombinante de acuerdo con los métodos de la descripción es de 5g/L a 200g/L, 10g/L a 150g/L, 20g/L a 120g/L, 25g/L a 110g/L y 30g/L a 100g/L.

Como se usa en la presente, el término "rendimiento de
15 los ácidos grasos ω -OH y/o derivados de ácidos grasos ω -OH producidos por una célula hospedera" se refiere a la eficiencia por el cual una fuente de carbono de entrada se convierte el producto (es decir, ácidos grasos ω -OH y/o derivados de ácidos grasos ω -OH) en una célula hospedera. Las
20 células hospederas modificadas para producir ácidos grasos ω -OH y/o derivados de ácidos grasos ω -OH de acuerdo con los métodos de la descripción tiene un rendimiento de al menos 3%, al menos 4%, al menos 5%, al menos 6%, al menos 7%, al menos 8%, al menos 9%, al menos 10%, al menos 11%, al menos

12%, al menos 13%, al menos 14%, al menos 15%, al menos 16%,
al menos 17%, al menos 18%, al menos 19%, al menos 20 %, al
menos 21%, al menos 22%, al menos 23%, al menos 24%, al menos
25%, al menos 26%, al menos 27%, al menos 28%, al menos 29%,
5 o al menos 30% o un intervalo unido por cualquiera de dos de
los valores anteriores. En otras modalidades, un ácido graso
 ω -OH y/o o derivado de ácido graso ω -OH se produce en un
rendimiento de más de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o
más. Alternativamente, o además, el rendimiento es
10 aproximadamente 30% o menos, aproximadamente 27% o menos,
aproximadamente 25% o menos, o aproximadamente 22% o menos.
De esta manera, el rendimiento se puede unir por cualquiera
de dos de los puntos finales anteriores. Por ejemplo, el
rendimiento de un ácido graso ω -OH y/o derivado de ácido
15 graso ω -OH producido por la célula hospedera recombinante de
acuerdo con los métodos de la descripción puede ser de 5% a
15%, 10% a 25%, 10% a 22%, 15% a 27%, 18% a 22%, 20% a 28%,
20% a 30%, 25% a 40%, o mayor. Un ejemplo de un rendimiento
preferido de un ácido graso ω -OH y/o derivado de ácido graso
20 ω -OH producido por la célula hospedera recombinante de
acuerdo con los métodos de la descripción es de 10% a 30%.
Otro ejemplo de un rendimiento preferido de un ácido graso ω -
OH y/o derivado de ácido graso ω -OH producido por la célula
hospedera recombinante de acuerdo con los métodos de la

descripción es de 10% a 40%. Otro ejemplo de un rendimiento preferido de n ácido graso ω -OH y/o derivado de ácido graso ω -OH producido por la célula hospedera recombinante de acuerdo con los métodos de la descripción es de 10% a 50%.

5 Como se usa en la presente, el término "productividad" se refiere a la cantidad de ácidos grasos ω -OH y/o derivados de ácidos grasos ω -OH producidos por volumen unitario de cultivo de células hospederas por tiempo unitario. En cualquier aspecto de las composiciones y métodos descritos en
10 la presente, la productividad de un ácido graso ω -OH y/o derivado de ácido graso ω -OH producido por una célula hospedera recombinante es al menos 100 mg/L/hora, al menos 200 mg/L/hora, al menos 300 mg/L/hora, al menos 400 mg/L/hora, al menos 500 mg/L/hora, al menos 600 mg/L/hora, al
15 menos 700 mg/L/hora, al menos 800 mg/L/hora, al menos 900 mg/L/hora, al menos 1000 mg/L/hora, al menos 1100 mg/L/hora, al menos 1200 mg/L/hora, al menos 1300 mg/L/hora, al menos 1400 mg/L/hora, al menos 1500 mg/L/hora, al menos 1600 mg/L/hora, al menos 1700 mg/L/hora, al menos 1800 mg/L/hora,
20 al menos 1900 mg/L/hora, al menos 2000 mg/L/hora, al menos 2100 mg/L/hora, al menos 2200 mg/L/hora, al menos 2300 mg/L/hora, al menos 2400 mg/L/hora, o al menos 2500 mg/L/hora. Además, la productividad puede ser 2500 mg/L/hora o menos, 2000 mg/L/OD₆₀₀ o menos, 1500 mg/L/OD₆₀₀ o menos, 120

mg/L/hora, o menos, 1000 mg/L/hora o menos, 800 mg/L/hora, o menos, o 600 mg/L/hora o menos. De esta manera, la productividad se puede unir por cualquiera de dos de los puntos finales anteriores. Por ejemplo, la productividad
5 puede ser 3 a 30 mg/L/hora, 6 a 20 mg/L/hora, o 15 a 30 mg/L/hora. La productividad preferida de un ácido graso ω -OH y/o derivado de ácido graso ω -OH producido por una célula hospedera recombinante de acuerdo con los métodos de la descripción se selecciona de 500 mg/L/hora a 2500 mg/L/hora,
10 o de 700 mg/L/hora a 2000 mg/L/hora.

Los términos "especie grasa total (FAS)" y "producto de ácido graso total" se puede usar intercambiablemente en la presente con referencia a la cantidad total de ácidos grasos ω -OH y ácidos grasos presentes en una muestra como es
15 evaluado por GC-FID como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 2008/119082.

Como se usa en la presente, el término "tasa de utilización de glucosa" significa la cantidad de glucosa usada por el cultivo por tiempo unitario, reportado como
20 gramos/litro/hora (g/L/hr).

El término "fuente de carbono de una materia prima renovable" cuando se usa sola o en referencia a la fuente de alimentación incluye cualquier material biológico (incluyendo materias primas renovables y/o biomasa y/o productos

residuales) de los cuales se deriva el carbono excepto oleoquímicos (es decir, aceites refinados de plantas y animales tales como ácidos graso, ésteres de ácido graso, TAGs, hidroxí-ácidos grasos, y similares) y petroquímicos (es
5 decir, químicos derivados de petróleo tales como alcanos, alquenos, y similares). De esta manera, el término "fuente de carbono de una materia primar renovable", como se usa en la presente, excluye carbono derivado de oleoquímicos y petroquímicos. En algunas modalidades, la fuente de carbono
10 incluye azúcares o carbohidratos (por ejemplo, monosacáridos, disacáridos, o polisacáridos). En algunas modalidades, la fuente de carbono es glucosa y/o sacarosa. En otras modalidades, la fuente de carbono se deriva de una materia prima renovable tales como carbohidratos de maíz, caña de
15 azúcar, o biomasa lignocelulósica; o productos residuales tales como glicerol, gas de combustión, gas sintético; o la reformación de materiales orgánicos tales como biomasa o gas natural; o es dióxido de carbono que se fija fotosintéticamente. En otras modalidades, una biomasa se
20 procesa en una fuente de carbono, que es adecuada para bioconversión. En aún otras modalidades, la biomasa no requiere procesamiento adicional en una fuente de carbono pero se puede usar directamente como fuente de carbono. Una fuente ejemplar de tal biomasa es materia vegetal o

vegetación, tal como césped de pradera. Otra fuente de carbono ejemplar incluye productos residuales metabólicos, tal como materia animal (*por ejemplo*, estiércol de vaca). Fuentes ejemplares adicionales de carbono incluyen algas y
5 otras plantas marinas. Otra fuente de carbono (incluyendo biomasa) incluye productos residuales de industria, agricultura, bosques y hogares, incluyendo, pero no limitado a, residuo de fermentación, biomasa de fermentación, glicerol/glicerina, ensilaje, paja, madera cerrada, drenaje,
10 basura, residuos sólidos urbanos, residuos urbanos celulósicos y restos de comida.

Como se usa en la presente, el término "aislado", con respecto a los productos tales como ácidos grasos ω -OH y derivados de los mismos se refiere a productos que se separan
15 de los componentes celulares, medios de cultivo celular, o precursores químicos o sintéticos. Los ácidos grasos derivados de los mismos (*por ejemplo*, ácido graso ω -OH y/o derivados de ácido graso ω -OH) producidos por los métodos descritos en la presente pueden ser relativamente inamisibles
20 en el caldo de fermentación, así como en el citoplasma. Por lo tanto, los ácidos grasos y derivados de los mismos pueden recolectarse en una fase orgánica ya sea intracelularmente o extracelularmente.

Como se usa en la presente, los términos "purificar",

“purificado” o “purificación” proponen la remoción o aislamiento de una molécula de su medio ambiente mediante, por ejemplo, aislamiento o separación. Moléculas “sustancialmente purificadas” son al menos aproximadamente 5 60% libres (*por ejemplo*, al menos aproximadamente 70% libres, al menos aproximadamente 75% libres, al menos aproximadamente 85% libres, al menos aproximadamente 90% libres, al menos aproximadamente 95% libres, al menos aproximadamente 97% libres, al menos aproximadamente 99% libres) de otros 10 componentes con los cuales se asocian. Como se usa en la presente, estos términos también se prefieren a la remoción de contaminantes de una muestra. Por ejemplo, la remoción de los contaminantes puede dar por resultado un incremento en el porcentaje de derivados de ácidos grasos tales como ácido 15 graso ω -OH y/o derivados de ácido graso ω -OH en una muestra. Por ejemplo, cuando un derivado de ácido graso se produce en una célula hospedera recombinante, el derivado de ácido graso se puede purificar por la remoción de proteínas de células hospederas u otros materiales de células hospederas. Después 20 de la purificación, el porcentaje de derivado de ácido graso en la muestra se incrementa. Los términos “purificar”, “purificado” y “purificación” son términos relativos que no requieren pureza absoluta. De esta manera, por ejemplo, cuando un derivado de ácido graso se produce en las células

hospederas recombinantes, un derivado de ácido graso purificado es un derivado de ácido graso que se separa sustancialmente de otros componentes celulares (*por ejemplo*, ácidos nucleicos, polipéptidos, lípidos, carbohidratos, u
5 otros hidrocarburos).

Ácido grado Omega-Hidroxilado y Producción de Derivados de Ácidos Grasos

La descripción proporciona la producción de ácidos grasos ω -OH y derivados de ácidos grasos ω -OH en una célula
10 hospedera. La producción de ácido graso ω -OH se puede mejorar como resultado de la expresión de una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasas producen los derivados de ácidos grasos ω -OH y composiciones en un título
15 alto. En la presente, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa se implica en una ruta biosintética para la producción de derivados de ácidos grasos ω -OH; se puede usar solo o en combinación con otras enzimas. Por ejemplo, la variante de polipéptido de fusión híbrido
20 CYP153A-reductasa se puede usar en una ruta biosintética diseñada en donde una enzima tioesterasa (*es decir*, expresada naturalmente o heterológamente) convierte una acil-ACP a un ácido graso. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa puede entonces convertir el ácido graso a

un ácido graso ω -OH (ver Figura 1). Las enzimas adicionales en la ruta pueden convertir ácidos grasos ω -OH en otros derivados de ácidos grasos bifuncionales tales como α,ω -diácidos.

5 De manera más específica, un polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es una secuencia de polipéptido que tiene al menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de
10 identidad de secuencia a SEQ ID NO: 6 y sirve como una secuencia de plantilla para introducir mutaciones a fin de crear variantes con actividad enzimática mejorada para la producción de ácidos grasos ω -OH y derivados de ácidos grasos. El polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es
15 autosuficiente y posee actividad enzimática de ω -hidroxilasa que cataliza la reacción de un ácido graso a un ácido graso ω -OH. Un ejemplo de un polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es un polipéptido de fusión de tipo cyp153A-RedRhF híbrido. En una modalidad, el término variante de polipéptido
20 de fusión híbrido CYP153A-reductasa se refiere a un polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa modificado que tiene al menos una mutación en su secuencia de aminoácidos que incluye, pero no limitado a, una mutación en la posición de aminoácidos 796, 141, 231, 27, 82, 178, 309,

407, 415, 516 y 666 o una combinación de los mismos. La expresión de la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa en las células hospederas recombinantes da por resultado título mejorad, rendimiento y/o productividad de los ácidos grasos ω -OH y/o derivados de ácidos grasos ω -OH o composiciones de los mismos cuando se comparan con la expresión del polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa en una célula hospedera correspondiente.

Un ejemplo de una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es SEQ ID NO: 38, que tiene una mutación in posición 796, en donde una alanina se reemplaza con una valina. Esta variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene una secuencia de polipéptidos que tiene al menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 38 y sirve además como una secuencia de plantilla para crear mutaciones adicionales o variantes adicionales. Similarmente, esta variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es autosuficiente y posee actividad enzimática de ω -hidroxilasa que cataliza la reacción de un ácido graso a un ácido graso ω -OH. En una modalidad, el término variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa se refiere a un polipéptido

de fusión híbrido CYP153A-reductasa modificado que tiene al menos una mutación adicional en su secuencia de aminoácidos que incluye, pero no se limita a, una mutación en la posición de aminoácidos 747, 12, 327, 14, 61, 28, 13, 771, 119, 10, 5 11, 28, 745, 9, 770, 413, 784, 749, 231, 233, 757 y 703 o una combinación de los mismos. La expresión de la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa en las células hospederas recombinantes da por resultado un título mejorado, rendimiento y/o productividad de ácidos grasos ω -OH 10 y/o o derivados de ácidos grasos ω -OH cuando se compara con la expresión del polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa (SEQ ID No: 6) en una célula hospedera correspondiente.

Cuando una célula se ha transformado con una variante de 15 polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es una célula que expresa la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa (*por ejemplo*, una célula recombinante). En una modalidad, el título y/o rendimiento de un ácido graso ω -OH producido por una célula que expresa la variante de 20 polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es al menos dos veces a aquella de una célula correspondiente que expresa el polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa. En un hospedero tal como *Escherichia coli*, los ácidos grasos se ω -OH se pueden convertir a derivados de ácidos grasos bi-

funcionales por las enzimas natural o heterológamente expresadas. En otra modalidad, el título y/o rendimiento de un ácido graso ω -OH o derivado del mismo producido por una célula que expresa la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es al menos aproximadamente 1 vez, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, o al menos aproximadamente 10 veces mayor que aquella de una célula correspondiente que expresa el polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa. En una modalidad, el título y/o rendimiento de un ácido graso ω -OH o derivado del mismo producido por una célula que expresa la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es al menos aproximadamente 1 por ciento, al menos aproximadamente 2 por ciento, al menos aproximadamente 3 por ciento, al menos aproximadamente 4 por ciento, al menos aproximadamente 5 por ciento, al menos aproximadamente 6 por ciento, al menos aproximadamente 7 por ciento, al menos aproximadamente 8 por ciento, al menos aproximadamente 9 por ciento, o al menos aproximadamente 10 por ciento mayor que aquella de una célula correspondiente que expresa el polipéptido de fusión híbrido

CYP153A-reductasa. En otra modalidad, el título y/o rendimiento de un ácido graso ω -OH o derivado del mismo producido en una célula recombinante debido a la expresión de una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es al menos aproximadamente 20 por ciento a al menos aproximadamente 80 por ciento mayor que aquella de una célula correspondiente que expresa el polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa. En algunas modalidades, el título y/o rendimiento de un ácido graso ω -OH producido por una célula es al menos aproximadamente 20 por ciento, al menos aproximadamente 25 por ciento, al menos aproximadamente 30 por ciento, al menos aproximadamente 35 por ciento, al menos aproximadamente 40 por ciento, al menos aproximadamente 45 por ciento, al menos aproximadamente 50 por ciento, al menos aproximadamente 55 por ciento, al menos aproximadamente 60 por ciento, al menos aproximadamente 65 por ciento, al menos aproximadamente 70 por ciento, al menos aproximadamente 75 por ciento, al menos aproximadamente 80 por ciento, al menos aproximadamente 85 por ciento, al menos aproximadamente 90 por ciento, al menos aproximadamente 95 por ciento, al menos aproximadamente 97 por ciento, al menos aproximadamente 98 por ciento, o al menos aproximadamente 100 por ciento mayor que aquel de la célula correspondiente que expresa el polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa.

De esta manera, la descripción proporciona células hospederas recombinantes, que se han modificado para expresar una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa para producir ácidos grasos ω -OH o derivados de los mismos. La biosíntesis de los ácidos grasos ω -OH se mejora con respecto a las células hospederas que expresan el polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa, es decir células hospederas que expresan el polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa basado en SEQ ID NO: 6 (es decir, el polipéptido de plantilla) y otros polipéptidos con la misma función enzimática. Una variedad de diferentes células hospederas se pueden modificar para expresar una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tal como aquellos descritos en la presente, dando por resultado células hospederas recombinantes adecuadas para la producción mejorada de un ácido graso ω -OH y derivados de ácidos grasos ω -OH o composiciones de los mismos. Ejemplos de ácidos grasos ω -OH que se producen son ácidos grasos C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19} , C_{20} , $C_{8:1}$, $C_{9:1}$, $C_{10:1}$, $C_{11:1}$, $C_{12:1}$, $C_{13:1}$, $C_{14:1}$, $C_{15:1}$, $C_{16:1}$, $C_{17:1}$, $C_{18:1}$, $C_{19:1}$ y/o $C_{20:1}$. En una modalidad, tales ácidos grasos ω -OH son ácidos grasos ω -OH $C_{8:0}$, ácidos grasos ω -OH $C_{10:0}$, ácidos grasos ω -OH $C_{12:0}$, ácidos grasos ω -OH $C_{14:0}$, ácidos grasos ω -OH $C_{16:0}$, ácidos grasos ω -OH $C_{18:0}$, ácidos grasos ω -OH $C_{20:0}$, ácidos grasos ω -OH $C_{8:1}$, ácidos

grasos ω -OH C_{10:1}, ácidos grasos ω -OH C_{12:1}, ácidos grasos ω -OH C_{14:1}, ácidos grasos ω -OH C_{16:1}, ácidos grasos ω -OH C_{18:1}, ácidos grasos ω -OH C_{20:1}, y similares. Se entiende que una variedad de células pueden proporcionar fuentes de material genético, incluyendo secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos adecuados para el uso en célula hospedera recombinante como se describe en la presente.

Modificación de la Ruta y Actividades Enzimáticas

La síntesis de ácido graso es uno de los sistemas más conservados de la maquinaria biosintética bacteriana. El complejo de múltiples enzimas ácido graso sintasa (FAS) está presente en todas las bacterias y eucariotas. La mayoría de los genes relacionados con FAS son indispensables para el crecimiento y supervivencia celular. La FAS eucariota y bacteriana conduce esencialmente al mismo tipo de transformación bioquímica. En los eucariotas, la FAS es referida como FAS I y la mayoría de sus dominios catalíticos son codificados por una cadena de polipéptido (no dissociable). En los procariotas tales como bacterias, la FAS es referida como FASII y sus enzimas individuales y proteínas portadoras se codifican por genes separados que codifican para proteínas discretas (disociables). Como tal, la FASII es un sistema complejo con variaciones significativas peculiaridades distintas.

La proteína portadora de acilo (ACP) junto con las enzimas en una ruta FAS controla el grado de longitud de saturación y ramificación de los ácidos grasos producidos en un organismo nativo. Los pasos en esta ruta se catalizan por las enzimas de la biosíntesis de ácido graso (FAB) y las familias de genes de acetil-CoA carboxilasa (ACC). Por ejemplo, las enzimas que se pueden incluir en una ruta FAS incluyen AccABCD, FabD, FabH, FabG, FabA, FabZ, FabI, FabK, FabL, FabM, FabB, y FabF. Dependiendo del producto deseado uno o más de estos genes se puede atenuar o sobreexpresar. Como tal, los procariotas se han modificado para incrementar la producción de derivados de ácido graso de la materia prima renovable tal como glucosa u otras fuentes de carbono. En la presente el objetivo principal es incrementar la actividad de las enzimas de control claves que regulan la producción de derivados de ácido graso a fin de convertir la cepa bacteriana en una fábrica microbiana para la producción de derivados de ácido graso, incluyendo ésteres metílicos de ácido graso (FAMES), ésteres etílicos de ácido graso (FAEEs), y alcoholes grasos (FALC) (ver, por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 8,283,143, incorporada a manera de referencia en la presente).

La presente descripción identifica polinucleótidos de fusión híbridos CYP153A-reductasa que codifican polipéptidos

de la función enzimática a fin de modificar las rutas enzimáticas para la producción de compuestos deseables tales como ácidos grasos ω -OH y derivados de ácidos grasos ω -OH. Estos polipéptidos, que se identifican en la presente por los

5 Números de Acceso de Enzimas (Números EC), son útiles para modificar las rutas de ácido graso que conducen a la producción de ácidos grasos y otras moléculas bifuncionales tales como derivados de ácidos grasos ω -OH y otras moléculas bifuncionales tales como derivados de ácidos grasos ω -OH

10 similares a α,ω -diácidos (ver Figura 1).

En una modalidad, las rutas se representan en la Figura 1 que usan una fuente de carbono derivada de una materia prima renovable tal como glucosa para producir derivados de ácidos grasos ω -OH. Un carbohidrato (*por ejemplo*, glucosa) se

15 convierte a un acil-tioéster tal como una acil-ACP por el organismo nativo (ver paso 1 en la Figura 1). Los polinucleótidos que codifican para polipéptidos con actividad enzimática de degradación de ácidos grasos se puede atenuar opcionalmente dependiendo del producto deseado (ver Ejemplos,

20 *infra*). Ejemplos no limitantes de tales polipéptidos son acil-CoA sintetasa (FadD) y acil-CoA deshidrogenasa (FadE). La Tabla 1 proporciona una listas comprensiva de la actividad enzimática (*infra*) dentro de la ruta metabólica, incluyendo varias enzimas de degradación de ácidos grasos que se pueden

atenuar opcionalmente de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 8,283,143, *supra*).

Por ejemplo, la FadR (ver Tabla 1, *infra*) es un factor
5 regulador clave implicado en la degradación de ácidos grasos y las rutas biosintéticas de ácidos grasos (Cronan y colaboradores, *Mol. Microbiol.*, 29(4): 937-943 (1998)). La enzima de *E. coli* FadD (ver Tabla 1, *infra*) y la proteína de transporte de ácidos grasos FadL son componentes del sistema
10 de captación de ácidos grasos. La FadL media el transporte de ácidos grasos en la célula bacteriana, y la FadD media la formación de ésteres de acil-CoA. Cuando no hay otra fuente de carbono disponible, los ácidos grasos exógenos son captados por las bacterias y se convierten a ésteres de acil-
15 CoA, que pueden ligarse al factor de transcripción FadR y reducen la expresión de los genes *fad* que codifican proteínas responsables para el transporte de ácidos grasos (FadL), activación (FadD), y β -oxidación (FadA, FadB, y FadE). Cuando las fuentes alternativas de carbono están disponibles, las
20 bacterias sintetizan ácidos grasos como las acil-ACPs, que se usan para la síntesis de fosfolípidos, pero no son sustratos para la β -oxidación. De esta manera, acil-CoA y acil-ACP son ambas fuentes independientes de ácidos grasos que pueden dar por resultado diferentes productos finales (Caviglia y

colaboradores, *J. Biol. Chem.*, 279(12): 1163-1169 (2004)).

Tabla 1: Actividades Enzimáticas

	Designación del Gen	Organismo de origen	Nombre de la enzima	# de Acceso	Número EC	Uso Ejemplar
	Incremento de la Producción del Ácido Graso					
5	accA	<i>E. coli</i> , <i>Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad A (carboxil-transferasa alfa)	AAC73296, NP_414727	6.4.1.2	incremento de la producción de Malonil-CoA
	accB	<i>E. coli</i> , <i>Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad B (BCCP: proteína portadora de biotincarboxilo)	NP_417721	6.4.1.2	incremento de la producción de Malonil-CoA
10	accC	<i>E. coli</i> , <i>Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad C (biotin carboxilasa)	NP_417722	6.4.1.2, 6.3.4.14	incremento de la producción de Malonil-CoA
	accD	<i>E. coli</i> , <i>Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad D (carboxiltransferasa beta)	NP_416819	6.4.1.2	incremento de la producción de Malonil-CoA
15	fadD	<i>E. coli</i> W3110	acil-CoA sintasa	AP_002424	2.3.1.86, 6.2.1.3	incremento de la producción de ácido graso
	fabA	<i>E. coli</i> K12	β -hidroxidecanoil tioester deshidratasa/ isomerasa	NP_415474	4.2.1.60	incremento de la producción de acil-ACP/CoA graso
	fabB	<i>E. coli</i>	3-oxoacyl-[proteína portadora de acilo] sintasa I	BAA16180	2.3.1.41	incremento de la producción de acil-ACP/CoA graso
20	fabD	<i>E. coli</i> K12	[proteína portadora de acilo] S-maloniltransferasa	AAC74176	2.3.1.39	incremento de la producción de acil-ACP/CoA graso

5	fabF	<i>E. coli</i> K12	3-oxoacyl- [proteína portadora de acilo] sintasa II	AAC74179	2.3.1.179	incremento de la producción de acil-ACP/CoA graso
	fabG	<i>E. coli</i> K12	3-oxoacyl- [proteína portadora de acilo] reductasa	AAC74177	1.1.1.100	incremento de la producción de acil-ACP/CoA graso
	fabH	<i>E. coli</i> K12	3-oxoacyl- [proteína portadora de acilo] sintasa III	AAC74175	2.3.1.180	incremento de la producción de acil-ACP/CoA graso
10	fabI	<i>E. coli</i> K12	enoil-[proteína portadora de acilo] reductasa	NP_415804	1.3.1.9	incremento de la producción de acil-ACP/CoA graso
	fabR	<i>E. coli</i> K12	Represor Transcripcional	NP_418398	ninguno	modular la producción de ácido graso insaturado
	fabV	<i>Vibrio</i> <i>cholerae</i>	enoil-[proteína portadora de acilo] reductasa	YP_001217 283	1.3.1.9	incremento de la producción de acil-ACP/CoA graso
15	fabZ	<i>E. coli</i> K12	(3R)-proteína portadora de hidroximiristol acilo deshidratasa	NP_414722	4.2.1.-	incremento de la producción de acil-ACP/CoA graso
	fadE	<i>E. coli</i> K13	acil-CoA deshidrogenasa	AAC73325	1.3.99.3, 1.3.99.-	reducir la degradación de ácido graso
	fadD	<i>E. coli</i> K12	acil-CoA sintetasa	NP_416319	6.2.1.3	reducir la degradación de ácido graso
20	fadA	<i>E. coli</i> K12	3-ketoacil-CoA tiolasa	YP_02627	2.3.1.16	reducir la degradación de ácido graso
	fadB	<i>E. coli</i> K12	enoil-CoA hidratasa, 3-OH acil-CoA epimerasa/ deshidrogenasa	NP_418288	4.2.1.17, 5.1.2.3, 1.1.1.35	reducir la degradación de ácido graso
	fadR	<i>E. coli</i>	proteína	NP_415705	ninguno	Bloquear o

			reguladora transcripcional			revertir la degradación de ácido graso
	Control de Longitud de Cadena					
5	tesA (con o sin secuencia líder)	<i>E. coli</i>	tioesterasa - la secuencia líder es los aminoácidos 1-26	P0ADA1	3.1.2.-, 3.1.1.5	Longitud de cadena C18
	tesA (sin secuencia líder)	<i>E. coli</i>	tioesterasa	AAC73596, NP_415027	3.1.2.-, 3.1.1.5	Longitud de Cadena C18:1
10	tesA (mutante de <i>E. coli</i> tioesterasa I formado en complejo con ácido octanóico)	<i>E. coli</i>	tioesterasa	L109P	3.1.2.-, 3.1.1.5	Longitud de Cadena <C18
	fatB1	<i>Umbellularia californica</i>	tioesterasa	Q41635	3.1.2.14	Longitud de Cadena C12:0
	fatB2	<i>Cuphea hookeriana</i>	tioesterasa	AAC49269	3.1.2.14	Longitud de Cadena C8:0 - C10:0
15	fatB3	<i>Cuphea hookeriana</i>	tioesterasa	AAC72881	3.1.2.14	Longitud de Cadena C14:0 - C16:0
	fatB	<i>Cinnamomum camphora</i>	tioesterasa	Q39473	3.1.2.14	Longitud de Cadena C14:0
	fatB	<i>Arabidopsis thaliana</i>	tioesterasa	CAA85388	3.1.2.14	Longitud de Cadena C16:1
	fatB1	<i>Umbellularia californica</i>	tioesterasa	Q41635	3.1.2.14	Longitud de Cadena C12:0
20	fatA1	<i>Helianthus annuus</i>	tioesterasa	AAL79361	3.1.2.14	Longitud de Cadena C18:1
	fatA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	tioesterasa	NP_189147, NP_193041	3.1.2.14	Longitud de Cadena C18:1
	fatA	<i>Brassica juncea</i>	tioesterasa	CAC39106	3.1.2.14	Longitud de Cadena C18:1
	fatA	<i>Cuphea hookeriana</i>	tioesterasa	AAC72883	3.1.2.14	Longitud de Cadena C18:1
	tes	<i>Photobacter</i>	tioesterasa	YP_130990	3.1.2.14	Longitud de

5		<i>ium profundum</i>				Cadena
	tesB	<i>E. coli</i>	tioesterasa	NP_414986	3.1.2.14	Longitud de Cadena
	fadM	<i>E. coli</i>	tioesterasa	NP_414977	3.1.2.14	Longitud de Cadena
	yciA	<i>E. coli</i>	tioesterasa	NP_415769	3.1.2.14	Longitud de Cadena
	ybgC	<i>E. coli</i>	tioesterasa	NP_415264	3.1.2.14	Longitud de Cadena
10	Control del Nivel de Saturación					
	Sfa	<i>E. coli</i>	Supresor de fabA	AAN79592, AAC44390	ninguno	incrementar ácidos grasos monoinsaturados
	fabA	<i>E. coli K12</i>	β -hidroxidecanoil tioester deshidratasa/isomerasa	NP_415474	4.2.1.60	producir ácidos grasos insaturados
	GnsA	<i>E. coli</i>	supresores de la mutación nula secG	ABD18647.1	ninguno	incremento de ésteres de ácido graso insaturados
	GnsB	<i>E. coli</i>	supresores de la mutación nula secG	AAC74076.1	ninguno	incremento de ésteres de ácido graso insaturados
15	fabB	<i>E. coli</i>	3-oxoacil-[proteína portadora de acilo] sintasa I	BAA16180	2.3.1.41	modular la producción de ácido graso insaturado
	des	<i>Bacillus subtilis</i>	acil desaturasa grasa D5	O34653	1.14.19	modular la producción de ácido graso insaturado
20	Producción de éster					
	AT3G51970	<i>Arabidopsis thaliana</i>	alcohol de cadena larga o aciltransferasa grasa	NP_190765	2.3.1.26	producción de éster
	ELO1	<i>Pichia angusta</i>	ácido graso enlogasa	BAD98251	2.3.1.-	producir ácidos grasos de longitud de cadena muy larga
	plsC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	aciltransferasa	AAA16514	2.3.1.51	producción de éster
	DAGAT/DGAT	<i>Arabidopsis</i>	diacilglicerol	AAF19262	2.3.1.20	producción de

	<i>s thaliana</i>	aciltransferasa			éster
hWS	<i>Homo sapiens</i>	acil-CoA wax alcohol aciltransferasa	AAX48018	2.3.1.20	producción de éster
aft1	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	éster de cera bifuncional sintasa/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa	AAO17391	2.3.1.20	producción de éster
ES9	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	producción de éster	ABO21021	2.3.1.20	producción de éster
mWS	<i>Simmondsia chinensis</i>	producción de éster	AAD38041	2.3.1.-	producción de éster
Rendimiento de alcohol graso					
		tioesterasas (ver lo anterior)			incremento de la producción de ácido graso/alcohol graso
BmFAR	<i>Bombyxmori</i>	FAR (acil-CoA reductasa formadora de alcohol graso)	BAC79425	1.1.1.-	convertir acil-CoA a alcohol graso
acr1	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	acil-CoA reductasa	YP_047869	1.2.1.42	reducir acil-CoA graso a aldehídos grasos
yqhD	<i>E. coli W3110</i>	alcohol deshidrogenasa	AP_003562	1.1.-.-	reducir aldehídos grasos a alcoholes grasos; incrementar la producción de alcohol graso
alrA	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	alcohol deshidrogenasa	CAG70252	1.1.-.-	reducir los aldehídos grasos a alcoholes grasos
BmFAR	<i>Bombyxmori</i>	FAR (acil-CoA reductasa formadora de alcohol graso)	BAC79425	1.1.1.-	reducir acil-CoA graso a alcohol graso
GTNG_1865	<i>Geobacillus sthermoden</i>	aldehído de cadena larga	YP_001125970	1.2.1.3	reducir aldehídos grasos

5		<i>itrificans</i> NG80-2	deshidrogenasa			a alcoholes graso
	AAR	<i>Synechococcus elongatus</i>	Acil-ACP reductasa	YP_400611	1.2.1.42	reducir acil-ACP/CoA grasa a aldehídos grasos
	carB	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	proteína ácido carboxílico reductasa	YP_889972	6.2.1.3, 1.2.1.42	reducir ácidos grasos a aldehídos grasos
	FadD	<i>E. coli</i> K12	acil-CoA sintetasa	NP_416319	6.2.1.3	activa los ácidos grasos a acil-CoAs grasas
	atoB	<i>Erwinia carotovora</i>	acetil-CoA acetyltransferase	YP_049388	2.3.1.9	producción de butanol
10	hbd	<i>Butirivibrio fibrisolvens</i>	Beta-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa	BAD51424	1.1.1.157	producción de butanol
	CPE0095	<i>Clostridium perfringens</i>	crotonasebutiril-CoA dehidrogenasa	BAB79801	4.2.1.55	producción de butanol
	bcd	<i>Clostridium beijerinckii</i>	butiril-CoA dehidrogenasa	AAM14583	1.3.99.2	producción de butanol
15	ALDH	<i>Clostridium beijerinckii</i>	aldehído deshidrogenasa de acilación de la coenzima A-	AAT66436	1.2.1.3	producción de butanol
	AdhE	<i>E. coli</i> CFT073	aldehído-alcohol deshidrogenasa	AAN80172	1.1.1.1 1.2.1.10	producción de butanol
Rendimiento de Éster de Acetilo de Alcohol Graso						
20			tioesterasas (see above)			modifica el rendimiento
	acr1	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	acil-CoA reductasa	YP_047869	1.2.1.42	modifica el rendimiento
	yqhD	<i>E. coli</i> K12	alcohol deshidrogenasa	AP_003562	1.1.-.-	modifica el rendimiento
	AAT	<i>Fragaria x ananassa</i>	alcohol O-acetiltransferasa	AAG13130	2.3.1.84	modifica el rendimiento
Rendimiento de Olefina Terminal						
	OleT	<i>Jeotgalicoccus</i> sp.	ácido graso decarboxilasa	HQ709266	1.11.2.4	ácidos grasos de decarboxilato
Exportación del Producto						
	AtMRP5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Asociada a resistencia de	NP_171908	ninguno	modificar la cantidad de

5			múltiples fármacos de Arabisopsis thaliana			exportación del producto
	AmiS2	<i>Rhodococcus sp.</i>	Transportados de ABC AmiS2	JC5491	ninguno	modificar la cantidad de exportación del producto
	AtPGP1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Glicoproteína 1 P de Arabidopsis thaliana 1	NP_181228	ninguno	modificar la cantidad de exportación del producto
	AcrA	<i>Candidatus Prochlorococcus ydiaamoebophilus UWE25</i>	Proteína acrA de transporte de eflujo de múltiples fármacos putativa	CAF23274	ninguno	modificar la cantidad de exportación del producto
	AcrB	<i>Candidatus Prochlorococcus ydiaamoebophilus UWE25</i>	proteína de transporte flujo de múltiples fármacos probable	CAF23275	ninguno	modificar la cantidad de exportación del producto
10	TolC	<i>Francisella tularensis subsp. novicida</i>	Proteína de membrana exterior [biogénesis, de envoltura celular,	ABD59001	ninguno	modificar la cantidad de exportación del producto
15	AcrE	<i>Shigella sonnei Ss046</i>	efectos de la proteína transmembrana formación del septo y permeabilidad de la membrana celular	YP_312213	ninguno	modificar la cantidad de exportación del producto
20	AcrF	<i>E. coli</i>	Proteína F de resistencia a acriflavina	P24181	ninguno	modificar la cantidad de exportación del producto
	t111619	<i>Thermosynechococcus elongatus [BP-1]</i>	transportador de eflujo de múltiples fármacos	NP_682409.1	ninguno	modificar la cantidad de exportación del producto
	t110139	<i>Thermosynechococcus elongatus [BP-1]</i>	transportador de eflujo de múltiples fármacos	NP_680930.1	ninguno	modificar la cantidad de exportación del producto

Fermentación					
genes de punto de verificación de replicación					incremento de la eficiencia de rendimiento
umuD	<i>Shigella sonnei Ss046</i>	Subunidad de ADN polimerasa V	YP_310132	3.4.21.-	incremento de la eficiencia de rendimiento
umuC	<i>E. coli</i>	Subunidad de ADN polimerasa V	ABC42261	2.7.7.7	incremento de la eficiencia de rendimiento
pntA, pntB	<i>Shigella flexneri</i>	NADH:NADPH transhidrogenasa (subunidades alfa y beta)	P07001, P0AB70	1.6.1.2	incremento de la eficiencia de rendimiento
Otros					
fabK	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	trans-2-enoil-ACP reductasa II	AAF98273	1.3.1.9	Contribuye a la biosíntesis de ácidos grasos
fabL	<i>Bacillus licheniformis DSM 13</i>	enoil-(proteína portadora de acilo) reductasa	AAU39821	1.3.1.9	Contribuye a la biosíntesis de ácidos grasos
fabM	<i>Streptococcus mutans</i>	trans-2, cis-3-decenoil-ACP isomerasa	DAA05501	4.2.1.17	Contribuye a la biosíntesis de ácidos grasos

La Figura 1 muestra una ruta ejemplar donde un tioéster de acilo tal como una acil-ACP se puede convertir a ácido graso C₁₂ o C_{16:1} (FFA) como un intermediario precursor. En el paso 1 de la Figura 1, una tioesterasa se emplea para convertir una acil-ACP a un FFA. En ciertas modalidades, 1 en que codifica una tioesterasa es *tesA*, *'tesA*, *tesB*, *fatB1*, *fatB2*, *fatB3*, *fatA1*, o *fatA* (ver también Tabla 1 que muestra polipéptidos que tienen la actividad enzimática de una tioesterasa que se puede usar para catalizar este paso, *supra*). En el paso 2, un polipéptido de fusión híbrido

CYP153A-reductasa o variante del mismo se usa para generar ácidos grasos ω -OH (ω -OH FFAs) de ácidos grasos. Otras moléculas bifuncionales se pueden producir cadena abajo en la ruta, por ejemplo α,ω -diácidos u otros derivados de ácidos grasos ω -OH, dependiendo de las funcionalidades enzimáticas que están presentes en la ruta.

Polipéptido de Fusión Híbridos CYP153A-reductasa

La ω -Hidroxilasas (o ω -oxigenasas) incluyen ciertas oxigenasas de di-hierro sin heme (por ejemplo, alkB de *Pseudomonas putida* GP01) y ciertas oxigenasas P450 tipo heme (por ejemplo, ω -hidroxilasas tal como cyp153A de *Marinobacter aquaeolei*). Las P450s son enzimas ubicuamente distribuidas, que poseen alta complejidad y expresan un amplio campo de actividad. Son proteínas codificadas por una superfamilia de genes que convierten una amplia variedad de sustratos y catalizan una variedad de reacciones químicas. La Cyp153A es una sub-familia P450s de citocromo bacterianas solubles que hidroxilan cadenas de hidrocarburo con alta selectividad para la ω -posición (van Beilen y colaboradores (2006) *Appl. Environ. Microbiol.* 72:59-65). Los miembros de la familia cyp153A se han mostrado *in vitro* para hidroxilar selectivamente la ω -posición de alcanos, de los alcanos, ácidos grasos o alcoholes grasos, por ejemplo cyp153A6 de *Mycobacterium* sp. HXN-1500 (Funhoff y colaboradores (2006) *J.*

Bacteriol. 188:5220-5227), cyp153A16 de *Mycobacterium marinum* y cyp153A de *Polaromonas* sp. JS666 (Scheps y colaboradores (2011) *Org. Biomol. Chem.* 9:6727-6733) así como cyp153A de *Marinobacter aquaeoli* (Honda-Malca y colaboradores (2012) *Chem. Commun.* 48:5115-5117). Las siguientes Tablas 2A y 2B muestran ejemplos de enzimas y socios redox que tienen actividad enzimática de ω -hidroxilasa que se pueden usar para producir ácidos grasos ω -OH y derivados de ácidos grasos ω -OH.

Tabla 2A: Ejemplos de la Actividad Enzimática de ω -Hidroxilasa (P450) (EC 1.14.15.3)

Designación del gen	Organismo de origen	No. de acceso	Sistema Redox	Posición de la hidroxilación
cyp153A (aciA)	<i>Acinetobacter</i> sp. OC4	BAE78452	operón con ferredoxina y ferredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
cyp153A16	<i>Mycobacterium marinum</i> M	YP_001851443	operón con ferredoxina y ferredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
cyp153A6	<i>Mycobacterium</i> sp. HXN-1500	AJ833989	operón con ferredoxina y ferredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
cyp153A	<i>Marinobacter aquaeoli</i> VT8	YP_957888	operón con ferredoxina y ferredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
alkB	<i>Pseudomonas putida</i> GP01	CAB54050	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
alkB	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	CAB51045	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
alkM	<i>Acinetobacter baylyi</i>	YP_046098	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
alkB	<i>Gordonia</i> sp. SoGc	ADT82701	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
alkW1	<i>Dietzia</i> sp. DQ12-45-1b	HQ850582	fusión de rubredoxina c-terminal, requiere	ω -hidroxilasa

Designación del gen	Organismo de origen	No. de acceso	Sistema Redox	Posición de la hidroxilación
			rubredoxina reductasa	
alkB	<i>Pseudomonas putida</i> GP01	CAB54050	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
alkB	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	CAB51045	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω -hidroxilasa

5

Tabla 2B: Ejemplos de Socios Redox para la Actividad Enzimática de ω -Hidroxilasa (P450) (EC 1.14.15.3)

Designación/Nombre	Organismo	# de acceso
ferredoxina, ferredoxina reductasa	<i>Acinetobacter</i> sp. OC4	BAE78451, BAE78453
ferredoxina, ferredoxina reductasa	<i>Mycobacterium marinum</i> M	YP_001851444, YP_001851442
ferredoxina, ferredoxina reductasa	<i>Marinobacter aquaeoli</i> VT8	YP_957887, YP_957889
alkG, alkT	<i>Pseudomonas putida</i> GP01	CAB54052, CAB54063
rubA, rubB	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	CAA86925, CAA86926

10

15

20

Como con todas las P450s de citocromo, las ω -hidroxilasas Cyp153A requieren electrones para su actividad catalítica, que se proporcionan a través de las proteínas redox específicas tales como ferredoxina y ferredoxina reductasa. Estas son proteínas discretas que interactúan con cyp153A. Una cyp153A oxigenasa híbrida autosuficiente (dimérica) (es decir, una oxigenasa que no requiere ferredoxina discreta y proteínas ferredoxina-reductasa para actividad) se ha creado previamente al fusionar cyp153A de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Kubota y colaboradores (2005) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69:2421-2430; Fujita y

colaboradores (2009) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:1825-1830) con el dominio reductasa de P450RhF, que incluye mononucleótido de flavina (FMN) y sitios de ligación a NADPH y un centro de ferredoxina [2FeS] (Hunter y colaboradores (2005) *FEBS Lett.* 579:2215-2220). P450RhF pertenece al PFOR fusionado a P450 clase I (DeMot and Parret (2003) *Trends Microbiol.* 10: 502). Esta proteína de fusión cyp153A-RedRhF híbrida se mostró en biotransformaciones *in vitro* para hidroxilar el octano en la ω -posición y también para hidroxilar otros compuestos tales como ciclohexano o butilbenceno. Otras cyp153A oxigenasas híbridas autosuficientes (quiméricas) han sido creadas para fusionar cyp153A de *Marinobacter aquaeolei* con los dominios reductasa de P450RhF y P450-BM3 (Scheps y colaboradores (2013) *Microb. Biotechnol.* 6:694-707). Ejemplos de proteínas de fusión P450-Reductasa naturales se muestran en las siguientes Tablas 2C y 2D.

Tabla 2C: Ejemplos de Proteínas de Fusión ω -1, ω -2, ω -3-Hidroxilasa (EC 1.14.14.1)

Designación del gen	Organismo de origen	No. de Acceso	Sistema Redox	Posición de la hidroxilación
P450-BM3 (cyp102A1)	<i>Bacillus megaterium</i>	AAA87602	proteína de fusión con dominio reductasa	hidroxilación ω -1,-2,-3
yrhJ (cyp102A3)	<i>Bacillus subtilis</i>	NP_390594	proteína de fusión con dominio reductasa	hidroxilación ω -1,-2,-3
yrhJ (cyp102A7)	<i>Bacillus licheniformis</i>	AAU41718	proteína de fusión con dominio reductasa	hidroxilación ω -1,-2,-3

Tabla 2D: Ejemplos de Proteínas de Fusión PFOR Fusionada con P450 Clase I Autosuficiente

Designación/Nombre	Organismo	# de acceso
P450RhF	<i>Rhodococcus sp. NCIMB 9784</i>	AAM67416
REQ_44300	<i>Rhodococcus equi 103S</i>	YP_004009071
HMPREF0018_01193	<i>Acinetobacter radioresistens SH164</i>	ZP_06072406
BMAA1669	<i>Burkholderia mallei ATCC 23344</i>	YP_106239
Rmet_4932	<i>Cupriavidus metallidurans CH34</i>	YP_587063
H16_B1279	<i>Ralstonia eutropha H16</i>	YP_840799

5 Dadas su alta selectividad hacia la ω -posición de las
 cadenas de hidrocarburo, las oxigenasas de la familia cyp153A
 parece que son buenos ejemplos de candidatos adecuados para
 10 producir derivados de ácidos grasos α,ω -bifuncionales de una
 fuente de carbono renovable. Esto permitiría el desarrollo de
 procesos comercialmente factibles para producir estos
 compuestos valiosos. Todavía, como con otras P450s de
 citocromo, las proteínas de la familia cyp153A han sido
 15 aplicadas hasta ahora en gran medida a experimentos *in vitro*
 con enzimas purificadas o lisados celulares crudos o en las
 biotransformaciones de células en reposo a las cuales los
 derivados de ácidos grasos o hidrocarburos se agregan
 20 exógenamente (Kubota y colaboradores, Fujita y colaboradores,
 Honda-Malca y colaboradores, Scheps y colaboradores, *supra*).
 Sin embargo, los procedimientos *in vitro* que emplean fusión
 híbrida o biotransformaciones de células en reposo no son
 conductores para la producción a gran escala y económica de

derivados de ácidos grasos ω -hidroxi. El conocimiento ampliamente aceptado en la técnica es que muchas P450s de citocromo así como ω -hidroxilasas tipo alkB no son fáciles de expresar funcionalmente en organismos recombinantes debido a

5 que las enzimas están frecuentemente inactivas y su química ha sido difícil de aclarar. De hecho, el único trabajo *in vivo* que usa una fuente de carbono renovable diferente a los derivados de ácidos grasos que hasta ahora se ha intentado emplearon alkB ω -hidroxilasa y lograron solo un título bajo

10 de derivados de ácidos grasos ω -hidroxi en una fermentación de densidad celular alta (WO2013/024114A2).

La presente descripción proporciona variantes de proteína de fusión híbrida CYP153A-reductasa que son capaces de producir eficientemente derivados de ácidos grasos ω -

15 hidroxi *in vivo* de una fuente de carbono renovable. De manera más específica, un gen de *Marinobacter aquaeoli* que codifica para una proteína de fusión híbrida del dominio catalítico CYP153A (G307A) P450, donde una alanina (A) se sustituye por una glicina (G) en la posición 307, se fusionó con un gen que

20 codifica para la FMN- C-terminal y el dominio reductasa que contiene Fe/S de P450RhF de *Rhodococcus* sp. NCIMB9784. El polipéptido resultante es un polipéptido de fusión híbrido CYP153A-RedRhF (SEQ ID NO: 6) con una secuencia de ácido nucleico correspondiente (SEQ ID NO: 5). Cuando esta proteína

de fusión híbrida CYP153A-reductasa se expresó en las células de *E. coli* con una fuente de carbono simple tal como glucosa los derivados de ácidos grasos se convirtieron eficientemente a derivados de ácido graso ω -hidroxi (ver Ejemplo 1). Otros
5 ejemplos para ω -hidroxilasas adecuadas (EC 1.14.15.3) y sus socios redox que se pueden usar para generar polipéptidos de fusión híbrido híbridos CYP153A-reductasa similares se listan en las Tablas 2A y 2B (*supra*).

Variantes de Polipéptido de Fusión híbrido CYP153A-reductasa

10 La presente descripción identifica variantes de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa que dan por resultado título alto, rendimiento y/o productividad de composiciones derivadas de ácidos grasos ω -hidroxiladas cuando se expresan en células hospederas. Ejemplos no
15 limitantes de la presente descripción (ver Ejemplos 1-7, *infra*) el polipéptido de fusión CYP153A(G307A)-RedRhF híbrido (*supra*) se usó como una plantilla para modificar eficientemente las variantes de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa para producir cantidades incrementadas de
20 ácidos grasos ω -OH y derivados de ácidos grasos ω -OH. Por ejemplo, tal variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa puede convertir de manera eficiente compuestos tales como ácido dodecanoico a ácido 12-hidroxi dodecanoico *in vivo* de una simple fuente de carbono tal como

glucosa. Cualquier fuente de carbono simple *por ejemplo*, derivada de una materia prima renovable es adecuada. Se muestra que unas variantes de polipéptido de fusión híbrido modificadas CYP153A-reductasa modificadas (es decir, 5 ilustradas a través de una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-RedRhF modificada) puede convertir de manera eficiente ácidos grasos *in vivo* a compuestos deseables específicos incluyendo ácidos grasos ω -OH que cuando se coexpresan con una tioesterasa en una célula hospedera tal 10 como *E. coli* al usar una fuente de carbono tal como glucosa de una materia prima renovable (ver Ejemplos, *infra*). Al seguir la presente descripción, otras variantes de polipéptido de fusión híbrido se pueden modificar al ligar un gen mutado tal como un gen que codifica para una proteína 15 CYP153A a un gen mutado que codifica para un dominio reductasa c-terminal (ver Tablas 2A a 2D, *supra*). Las variaciones en la presente, por ejemplo, que mutan ambos genes (la P5450 y el dominio reductasa) o que mutan un gen (la P450 o dominio reductasa). Después de estas 20 instrucciones, las variantes de proteína de fusión similares se pueden crear de otros tipos de ω -hidroxilasas.

De esta manera, la presente descripción se refiere a variantes de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa que dan por resultado título alto, rendimiento y/o

productividad de composiciones de derivados de ácidos grasos ω -hidroxilados cuando se expresan en células hospederas. Las variantes de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasas tienen una o más mutaciones en el dominio CYP153A o dominio reductasa o ambos. En una modalidad, la presente descripción proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 6 y que tiene una o más mutación en una posición de aminoácidos que incluye la posición 27, 82, 141, 178, 231, 309, 407, 415, 516, 666 y/o 796, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de cualquier ácido graso a un ácido graso ω -OH. De manera más específica, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene una o más de las siguientes mutaciones, incluyendo R27L donde arginina (R) se sustituye con lisina (L); posición R82D donde arginina (R) se sustituye con ácido aspártico (D); posición V141I donde valina se sustituye con isoleucina (I); posición V141Q donde valina (V) se sustituye con glutamina (Q); posición V141G donde valina (V) se sustituye con glicina (G); posición V141M donde valina (V) se sustituye con metionina (M); posición V141L donde valina (V) se sustituye con leucina (L); posición V141T donde valina (V) se sustituye con

treonina (T); posición R178N donde la arginina (R) se
sustituye con asparagina (N); posición A231T donde alanina
(A) se sustituye con treonina (T); posición N309R donde
asparagina (N) se sustituye con arginina (R); posición N407A
5 donde asparagina (N) se sustituye con alanina (A); posición
V415R donde valina (V) se sustituye con arginina (R);
posición T516V donde treonina (T) se sustituye con valina
(V); posición P666A donde prolina (P) se sustituye con
alanina (A); posición P666D donde prolina (P) se sustituye
10 con ácido aspártico (D); y la posición A796V donde alanina
(A) se sustituye con valina (V). Ejemplos de variantes de
polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa incluyen SEQ
ID 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
15 NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 30, SEQ ID
NO: 32, SEQ ID NO: 34, 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. En una
modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido
CYP153A-reductasa es una de proteína de fusión de tipo
20 cyp153A-RedRhF híbrida. En otra modalidad, la variante de
polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa en una célula
hospedera recombinante da por resultado un título más alto de
un derivado de ácido graso ω -OH o composición del mismo como
es comparado con el título de un ácido graso ω -OH o

composición del mismo producido por la expresión de un polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa en una célula hospedera recombinante. En otra modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene una

5 mutación en la posición de aminoácido 141, incluyendo V141I y/o V141T. En este punto, la expresión de la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa con las mutaciones V141I o V141T en una célula hospedera recombinante da por resultado un título más alto de un ácido graso ω -OH

10 C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1}, respectivamente, como es comparado con el título un ácido graso ω -OH C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1},

15 C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} producido por la expresión de un polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa. En una modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene mutaciones V141I y A231T (SEQ ID NO: 32) y produce cantidades incrementadas de

20 ácidos grasos ω -OH C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} cuando se expresa en una célula hospedera con una función enzimática de tioesterasa. En otra modalidad, la variante de polipéptido de fusión

híbrido CYP153A-reductasa tiene mutaciones R27L, R82D, V141M, R178N y N407A (SEQ ID NO: 34) y produce cantidades incrementadas de ácidos grasos de ω -OH C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} cuando se expresan en una célula hospedera con una función enzimática de tioesterasa. En otra modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene la mutación P666A (SEQ ID NO: 36) y produce cantidades incrementadas de ácidos grasos ω -OH C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} cuando se expresan en una célula hospedera con una función enzimática de tioesterasa. En otra modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene la mutación A796V (SEQ ID NO: 38) y produce cantidades incrementadas de ácidos grasos ω -OH C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} cuando se expresan en una célula hospedera con una función enzimática de tioesterasa. En otra modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene las mutaciones A796V, P666D y T516V (SEQ ID NO: 40) y produce cantidades incrementadas de ácidos grasos ω -OH C₆, C₇, C₈, C₉,

C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1},
 C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o
 C_{20:1} cuando se expresan en una célula hospedera con una
 función enzimática de tioesterasa. En otra modalidad, la
 5 variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa
 tiene las mutaciones V141I, A231T y A796V (SEQ ID NO: 42) y
 produce cantidades incrementadas de ácidos grasos ω -OH C₆, C₇,
 C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1},
 C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1}
 10 y/o C_{20:1} cuando se expresan en una célula hospedera con una
 función enzimática de tioesterasa. En otra modalidad, la
 variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa
 tiene las mutaciones R27L, R82D, V141M, R178N, N407A y A796V
 (SEQ ID NO: 44) y produce cantidades incrementadas de ácidos
 15 grasos ω -OH C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇,
 C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1},
 C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} cuando se expresan en una célula
 hospedera con una función enzimática de tioesterasa. En otra
 modalidad, la variante de polipéptido de fusión híbrido
 20 CYP153A-reductasa tiene las mutaciones V141T, A231T y A796V
 (SEQ ID NO: 46) y produce cantidades incrementadas de ácidos
 grasos ω -OH C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇,
 C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1},
 C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} cuando se expresan en una célula

hospedera con una función enzimática de tioesterasa. En una modalidad, las variantes de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, 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 produce cantidades incrementadas de

5 ácidos grasos ω -OH o derivados de ácido graso cuando es comprado con SEQ ID NO: 6. En una modalidad, estos ácidos grasos ω -OH son ácidos grasos ω -OH C_{8:0}, ácidos grasos ω -OH C_{10:0}, ácidos grasos ω -OH C_{12:0}, ácidos grasos ω -OH C_{14:0}, ácidos grasos ω -OH C_{16:0}, ácidos grasos ω -OH C_{18:0}, ácidos grasos ω -OH

10 C_{20:0}, ácidos grasos ω -OH C_{8:1}, ácidos grasos ω -OH C_{10:1}, ácidos grasos ω -OH C_{12:1}, ácidos grasos ω -OH C_{14:1}, ácidos grasos ω -OH C_{16:1}, ácidos grasos ω -OH C_{18:1}, ácidos grasos ω -OH C_{20:1}, y similares.

La descripción identifica variantes de polinucleótidos y

15 polipéptidos relacionados con la fusión híbrida CYP153A-reductasa. Las variantes de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasas incluyen SEQ ID NOS: 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 y 46. Las variantes de ácido nucleico de fusión híbrido CYP153A-

20 reductasa (secuencias ADN) incluyen SEQ ID NOS: 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 y 47. Sin embargo, será reconocido que la identidad de secuencia absoluta para las variantes de polinucleótido de fusión híbrido CYP153A-reductasa no es necesaria. Por

ejemplo, los cambios en una secuencia de polinucleótidos particular se puede hacer y el polipéptido codificado se clasifica para actividad. Tales cambios incluyen típicamente mutaciones conservadoras y mutaciones silenciosas tales como, por ejemplo, a través de la optimización con codón. Los polinucleótidos modificados o mutados (*es decir*, mutantes) y los polipéptidos variantes codificados se pueden clasificar para una función deseada, tal como, una función mejorada comparada con el polipéptido de tipo natural o de plantilla, incluyendo pero no limitado a la actividad catalítica incrementada, estabilidad incrementada o inhibición disminuida (*por ejemplo*, inhibición de retroalimentación disminuida), usando métodos conocidos en la técnica. La descripción identifica actividades enzimáticas implicadas en varios pasos (*es decir*, reacciones) de las rutas biosintéticas de ácido graso descritas en la presente de acuerdo con el Número de Clasificación de Enzimas (EC), y proporciona polipéptidos ejemplares (*por ejemplo*, que fusionan como enzimas específicas y expresan la actividad enzimática específica) clasificadas por tales números EC, y polinucleótidos ejemplares que codifican tales polipéptidos. Tales polipéptidos y polinucleótidos ejemplares, que se identifican en la presente por los Números Identificadores de Secuencia (SEQ ID NOs; *supra*), son útiles para modificar

rutas de ácidos grasos en las células hospederas tales como las mostradas en la Figura 1. Se va a entender, sin embargo, que los polipéptidos y polinucleótidos descritos en la presente son ejemplares y, de esta manera, no limitantes. Las

5 secuencias de homólogos de polipéptidos ejemplares descritos en la presente son disponibles por aquellas personas de experiencia en la técnica usando bases de datos tales como, por ejemplo, las bases de datos Entrez proporcionadas por National Center for Biotechnology Information (NCBI), las

10 bases de datos ExPasy proporcionada por the Swiss Institute of Bioinformatics, la base de datos BRENDA proporcionada por the Technical University of Braunschweig, y la base de datos KEGG proporcionada por the Bioinformatics Center of Kyoto University and University of Tokio, todas de la cuales están

15 disponibles en la Red Mundial.

En una modalidad, una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa para el uso en practicar la descripción tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de

20 secuencia a SEQ ID 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 o SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, 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. En algunas modalidades la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa se deriva de un polipéptido CYP153A (G307A) de *Marinobacter aquaeolei* donde una alanina (A) se sustituye de una glicina (G), y se fusiona

5 con un dominio reductasa de P450RhF de *Rhodococcus sp.* NCIMB9784. La P450RhF de citocromo es autosuficiente, expresa un alto grado de promiscuidad de substrato y cataliza una amplia gama de grupos funcionales. En otras modalidades, una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa

10 para el uso en practicar la descripción tiene al menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o al menos 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID

15 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 o SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 46, también puede incluir una o más sustituciones que da

20 por resultado características útiles y/o propiedades como se describe en la presente. En otras modalidades, una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa para el uso en practicar la descripción tiene al menos aproximadamente 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%,

91% o 90% de identidad de secuencia a SEQ ID 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 o SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 46. En aún otras modalidades, el dominio catalítico P450 de la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa se deriva de un organismo diferente a *Marinobacter aquaeolei*. Tales otros organismos incluyen, pero no se limitan a, *Acinetobacter* sp., *Mycobacterium marinum*, *Polaromonas* sp., *Alcanivorax borkumensis*, *Burkholderia fungorum*, *Caulobacter crescentus*, *Hyphomonas neptunium*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Sphingomonas* sp., *Mycobacterium* sp. En aún otras modalidades, el dominio reductasa de la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa se deriva de un organismo diferente a *Rhodococcus* sp. Tales otros organismos incluyen, pero no se limitan a, *Rhodococcus equi*, *Acinetobacter radioresistens*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia mallei*, *Ralstonia eutropha*, *Cupriavidus metallidurans*.

En una modalidad relacionada, la descripción incluye una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa tiene al menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o al menos 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47. En algunas modalidades la secuencia de ácido nucleico codifica una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa con una o más sustituciones que da por resultado características mejoradas y/o propiedades como se describen en la presente. En todavía otra modalidad relacionada, una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa para el uso en practicar la descripción se codifica por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% o 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47. En otro aspecto, la descripción se refiere a las variantes de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa que abarcan una secuencia de aminoácidos codificada por una

secuencia de ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones rigurosas sobre sustancialmente la longitud completa de una secuencia de ácido nucleico que corresponde a SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47. En algunas modalidades la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa se deriva de *Marinobacter aquaeolei*. En otras modalidades, el polipéptido de fusión híbrido P450 se deriva de *Acinetobacter* sp., *Mycobacterium marinum*, *Polaromonas* sp., *Alcanivorax borkumensis*, *Burkholderia fungorum*, *Caulobacter crescentus*, *Hyphomonas neptunium*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Sphingomonas* sp., y *Mycobacterium* sp.

Variantes de Polipéptido de Fusión Híbrido CYP153A-reductasa Adicionales

La descripción identifica variantes de polinucleótidos y polipéptidos relacionados con fusión híbrida CYP153A-reductasa adicionales, en donde una variante se usa como una plantilla. La plantilla de variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa se basa en el polipéptido de fusión CYP153A(G307A)-RedRhF híbrido e incluye además la

mutación A796V (SEQ ID NO: 38). Una genoteca de saturación completa de la proteína de fusión cyp153A-Red450RhF se construyó y se clasificó para variantes que mostraron mejoras sobre cyp153A(G307A)-Red450RhF(A796V) (SEQ ID NO: 38) (ver Ejemplo 7). Las mutaciones G307A y A796V son mutaciones benéficas que mejoran la actividad ω -hidroxilasa de cyp153A (ver SEQ ID NO: 38). Las variantes de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa resultantes se muestran en la Tabla 11 (*infra*). Estas variantes de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa produjeron una cantidad incrementada de ácidos grasos ω -hidroxi (título ω -OH FFA) cuando se compararon con SEQ ID NO: 38 e incluyen SEQ ID NOS: 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 y 96. Estas variantes de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa pueden producir cantidades incrementadas de ácidos grasos ω -OH incluyendo ácidos grasos C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} y/o o derivados de ácido graso.

Las variantes de ácido nucleico de fusión híbrido CYP153A-reductasa (secuencias de ADN) incluyen SEQ ID NOS: 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93 y 95. Sin embargo, será

reconocido que la identidad de secuencia absoluta a las variantes de polinucleótido de fusión híbrido CYP153A-reductasa no es necesaria. Por ejemplo, los cambios en una secuencia de polinucleótidos particular se puede hacer y el

5 polipéptido codificado se clasifica para actividad. Tales cambios incluyen típicamente mutaciones conservadoras y mutaciones silenciosas tales como, por ejemplo, a través de optimización con codón. Los polinucleótidos o mutados (es decir, mutantes) y polipéptidos variantes codificados se

10 pueden clasificar para una función deseada, tal como, una función mejorada comparada con el polipéptido de tipo natural o de plantilla, incluyendo pero no limitado a actividad catalítica incrementada, estabilidad incrementada, o inhibición disminuida (por ejemplo, inhibición de

15 retroalimentación disminuida), usando métodos conocidos en la técnica. La descripción identifica actividades enzimáticas implicadas en varios pasos (es decir, reacciones) de las rutas biosintéticas de ácidos grasos descritas en la presente de acuerdo con el Número de Clasificación de Enzimas (EC), y

20 proporciona polipéptidos ejemplares (por ejemplo, esta función como enzimas específicas y muestra actividad enzimática específica) clasificada por tales números EC, polinucleótidos ejemplares que codifican tales polipéptidos. Tales polipéptidos ejemplares y polinucleótidos, que se

identifican en la presente por los Números de Identificadores de Secuencia (SEQ ID NOs; *supra*), son útiles para modificar rutas de ácidos grasos en células hospederas tales como la mostrada en la Figura 1. Se va a entender sin embargo, que
5 los polipéptidos y polinucleótidos descritos en la presente son ejemplares y, de esta manera, no limitantes. Las secuencias de homólogos de polipéptidos ejemplares descritos en la presente son disponibles para aquellas personas de experiencia en la técnica usando base de datos tales como,
10 por ejemplo, las bases de datos Entrez proporcionadas por the National Center for Biotechnology Information (NCBI), las bases de datos ExPasy proporcionadas por el Instituto Suizo de Bioinformática, la base de datos BRENDA proporcionada por la Universidad Técnica de Braunschweig, y la base de datos
15 KEGG proporcionada por el Centro de Bioinformática de la Universidad de Kioto y Universidad de Tokio, todas de las cuales están disponibles en la Red Mundial.

En una modalidad, una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa para el uso en practicar la
20 descripción tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68 o SEQ

ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94 y SEQ ID NO: 96. En algunas modalidades la variante

5 de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa se deriva de un polipéptido CYP153A (G307A) de *Marinobacter aquaeolei* donde una glicina (G) se reemplaza con una alanina (A), y se fusiona con un dominio reductasa de P450RhF de *Rhodococcus* sp. NCIMB9784, e incluye una mutación adicional de A796V

10 donde una alanina (A) se reemplaza con una valina (V). La P450RhF de citocromo es autosuficiente, expresa un alto grado de promiscuidad de sustrato y cataliza una amplia gama de grupos funcionales. En otras modalidades, una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa para el uso

15 en practicar la descripción tiene al menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o al menos 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ

20 ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94 o SEQ

ID NO: 96, y también puede incluir una o más sustituciones que da por resultado características y/o propiedades útiles como se describe en la presente. En otras modalidades, una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa para el uso en practicar la descripción tiene al menos aproximadamente 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% o 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94 o SEQ ID NO: 96. En aún otras modalidades, el dominio catalítico P450 de la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa se deriva de un organismo diferente a *Marinobacter aquaeolei*. Tales otros organismos incluyen, pero no se limitan a, *Acinetobacter* sp., *Mycobacterium marinum*, *Polaromonas* sp., *Alcanivorax borkumensis*, *Burkholderia fungorum*, *Caulobacter crescentus*, *Hyphomonas neptunium*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Sphingomonas* sp., *Mycobacterium* sp. En aún otras modalidades, el dominio reductasa de la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa se deriva de un organismo diferente a *Rhodococcus* sp. Tales otros organismos incluyen, pero no se

limitan a, *Rhodococcus equi*, *Acinetobacter radioresistens*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia mallei*, *Ralstonia eutropha*, *Cupriavidus metallidurans*.

En una modalidad relacionada, la descripción incluye una
 5 variante de polinucleótido de fusión híbrido CYP153A-reductasa que tiene al menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o al menos 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID
 10 NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID
 15 NO: 91, SEQ ID NO: 93 o SEQ ID NO: 95. En algunas modalidades la secuencia de ácidos nucleico codifica una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa con una o más sustituciones que da por resultado características y/o propiedades mejoradas como se describe en la presente. En
 20 todavía otra modalidad relacionada, una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa para el uso en practicar la descripción se codifica por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% o 90% de identidad de

secuencia a SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ
 ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ
 ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ
 ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ
 5 ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ
 ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ
 ID NO: 93 o SEQ ID NO: 95. En otro aspecto, la descripción se
 refiere a variantes de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-
 reductasa que abarca una secuencia de aminoácidos codificada
 10 por una secuencia de ácido nucleico que se hibrida bajo
 condiciones rigurosas sobre sustancialmente la longitud
 completa de una secuencia de ácido nucleico que corresponde a
 SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53,
 SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61,
 15 SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69,
 SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77,
 SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85,
 SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93 o
 SEQ ID NO: 95. En algunas modalidades la variante de
 20 polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa se deriva de
 una especie *Marinobacter aquaeolei*. En otras modalidades, el
 polipéptido de fusión híbrido P450 se deriva de *Acinetobacter*
sp., *Mycobacterium marinum*, *Polaromonas sp.*, *Alcanivorax*
borkumensis., *Burkholderia fungorum*, *Caulobacter crescentus*,

Hyphomonas neptunium, *Rhodopseudomonas palustris*,
Sphingomonas sp., y *Mycobacterium* sp.

Secuencias

Las variantes mostradas en la siguiente tabla se basan
 5 en la proteína de fusión cyp153A16(G307A)-RedRhF P450 de
 citocromo híbrida.

TABLA DE SECUENCIAS con Variantes basadas en el Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-Proteína de Fusión RedRhF	
Descripción	Número de Identificación de la Secuencia (SEQ ID NO)
P450 Cyp153A Secuencia de tipo natural <i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8 (ADN)	1
P450 Cyp153A Secuencia de tipo natural <i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8 (protein)	2
Citocromo P450 Cyp153A16(G307A) de <i>Marinobacter aquaeolei</i> , YP_957888 (ADN)	3
Citocromo P450 Cyp153A16(G307A) de <i>Marinobacter aquaeolei</i> , YP_957888 (proteína)	4
15 Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)- RedRhF (Plantilla) (ADN)	5
Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)- RedRhF (Plantilla) (proteína)	6
Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R27L (ADN)	7
Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R27L (proteína)	8
20 Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R82D (ADN)	9
Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R82D (proteína)	10
Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141I (ADN)	11
Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141I (proteína)	12

5	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141Q (ADN)	13
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141Q (proteína)	14
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141G (ADN)	15
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141G (proteína)	16
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141M (ADN)	17
10	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141M (proteína)	18
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141L (ADN)	19
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141L (proteína)	20
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141T (ADN)	21
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141T (proteína)	22
15	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R178N (ADN)	23
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R178N (proteína)	24
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF N309R (ADN)	25
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF N309R (proteína)	26
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF N407A (ADN)	27
20	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF N407A (proteína)	28
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V415R (ADN)	29
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V415R (proteína)	30
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141I and A231T (ADN)	31
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141I and A231T (proteína)	32

5	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R27L, R82D, V141M, R178N and N407A (ADN)	33
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R27L, R82D, V141M, R178N and N407A (proteína)	34
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF P666A (ADN)	35
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF P666A (proteína)	36
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF A796V (ADN)	37
10	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF A796V (proteína)	38
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF T516V, P666D and A796V (ADN)	39
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF T516V, P666D and A796V (proteína)	40
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141I, A231T and A796V (ADN)	41
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141I, A231T and A796V (proteína)	42
15	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R27L, R82D, V141M, R178N, N407A and A796V (ADN)	43
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R27L, R82D, V141M, R178N, N407A and A796V (proteína)	44
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141T, A231T and A796V (ADN)	45
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141T, A231T and A796V (proteína)	46

20

Las variantes mostradas en la siguiente tabla se basan en la proteína de fusión cyp153A(G307A)-Red450RhF(A796V) P450 de citocromo híbrida.

TABLA DE SECUENCIAS con Variantes basadas en la Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 cyp153A(G307A)-Red450RhF(A796V)	
Descripción	Número de Identificación de Secuencia (SEQ ID NO)
Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A(G307A)-Red450RhF(A796V) (Plantilla) (ADN)	37
Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A(G307A)-Red450RhF(A796V) (Plantilla) (proteína)	38
Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) D747N (ADN)	47
Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) D747N (proteína)	48
Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) Q12W (ADN)	49
Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) Q12W (proteína)	50
Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) P327D (ADN)	51
Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) P327D (proteína)	52
Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) R14F (ADN)	53
Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) R14F (proteína)	54
Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) N61L (ADN)	55
Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) N61L (proteína)	56

5	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) Q28M (ADN)	57
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) Q28M (proteína)	58
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) S13K (ADN)	59
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) S13K (proteína)	60
10	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) V771F (ADN)	61
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) V771F (proteína)	62
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) Q12T (ADN)	63
15	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) Q12T (proteína)	64
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) K119R (ADN)	65
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) K119R (proteína)	66
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) D10Y (ADN)	67
20	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) D10Y (proteína)	68
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) Q12R (ADN)	69
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) Q12R (proteína)	70

5	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) I11L (ADN)	71
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) I11L (proteína)	72
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) Q28T (ADN)	73
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) Q28T (proteína)	74
10	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) A231Y (ADN)	75
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) A231Y (proteína)	76
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) P745R (ADN)	77
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) P745R (proteína)	78
15	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) D9N (ADN)	79
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) D9N (proteína)	80
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) T770G (ADN)	81
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) T770G (proteína)	82
20	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) Y413R (ADN)	83
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) Y413R (proteína)	84

5	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) M784I (ADN)	85
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) M784I (proteína)	86
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) D9K (ADN)	87
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) D9K (proteína)	88
10	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) E749L (ADN)	89
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) E749L (proteína)	90
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) S233L (ADN)	91
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) S233L (proteína)	92
15	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) E757A (ADN)	93
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) E757A (proteína)	94
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) L703G (ADN)	95
	Variante de Proteína de Fusión Citocromo Híbrido P450 Cyp153A16(G307A) - RedRhF(A796V) L703G (proteína)	96

Variaciones y Mutaciones

Un polipéptido variante como se usa en la presente se

refiere un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de un polipéptido de tipo natural o de plantilla por al menos un aminoácidos. Por ejemplo, la variante (*por ejemplo, mutante*) puede tener una o más de las siguientes

5 sustituciones de aminoácidos conservadoras, incluyendo pero no limitado a, reemplazo de un aminoácido alifático, tal como alanina, valina, leucina, e isoleucina, con otro aminoácido alifático; reemplazo de una serina con una treonina; reemplazo de una treonina con una serina; reemplazo de un

10 residuo ácido, tal como ácido aspártico y ácido glutámico, con otro residuo ácido; reemplazo de un residuo que lleva un grupo amida tal como asparagina y glutamina, con otro residuos que lleva un grupo amida; intercambio de un residuo básico, tal como lisina y arginina, con otro residuo básico;

15 y reemplazo de un residuo aromático, tal como fenilalanina y tirosina, con otro residuo aromático. En algunas modalidades, el polipéptido variante tiene aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 99, o más sustituciones, adiciones, inserciones, o supresiones de

20 aminoácidos. Algunos fragmentos preferidos de un polipéptido que funciona como una variante o un mutante retiene algo o todo de la función biológica (*por ejemplo, actividad enzimática*) del polipéptido de tipo natural correspondiente. En algunas modalidades, el fragmento retiene al menos 75%, al

menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% o más de la función biológica de un polipéptido de tipo natural o de plantilla correspondiente. En otras modalidades, el fragmento o mutante retiene aproximadamente 100% de la

5 función biológica del polipéptido de tipo natural o de plantilla correspondiente. En otras modalidades, algunos fragmentos muestran la función biológica incrementada como es comparada con el polipéptido de tipo natural o de plantilla correspondiente. La guía en determinar que residuos de

10 aminoácidos se pueden sustituir, insertar, o suprimir sin afectar la actividad biológica se pueden encontrar usando programas de computadora bien conocidos en la técnica, por ejemplo, software LASERGENE (DNASTAR, Inc., Madison, WI). En algunas modalidades, un fragmento muestra función biológica

15 incrementada como es comparado con un polipéptido de tipo natural o polipéptido de plantilla correspondiente. Por ejemplo, un fragmento puede expresar al menos a 10%, al menos a 25%, al menos a 50%, al menos a 75%, o al menos 90% de mejora en la actividad enzimática como es comparado con el

20 polipéptido de tipo natural o polipéptido de plantilla correspondiente. En otras modalidades, el fragmento expresa al menos 100%, al menos 200%, o al menos 500% de mejora en la actividad enzimática como es comparado con el polipéptido de tipo natural o polipéptido de plantilla correspondiente.

Se entiende que los polipéptidos descritos en la presente pueden tener sustituciones de aminoácidos conservadoras o no esenciales adicionales que no tienen un efecto sustancial en la función del polipéptido. Si una
5 sustitución particular será tolerada o no (*es decir*, no afectará adversamente la función biológica deseada, tal como la actividad enzimática ω -hidroxilasa), se puede determinar como es conocido en la técnica (ver Bowie y colaboradores (1990) *Science*, 247:1306-1310). Una sustitución de
10 aminoácidos conservadora es una en la que el residuo de aminoácidos se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. estas familias incluyen aminoácidos
15 con cadenas laterales básicas (*por ejemplo*, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (*por ejemplo*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (*por ejemplo*, glicina, asparagina, glutamina, serie, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares
20 (*por ejemplo*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (*por ejemplo*, treonina, valina, isoleucina), y cadenas laterales aromáticas (*por ejemplo*, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Las variantes pueden ser de origen natural o creadas *in vitro*. En particular, tales variantes se pueden crear usando técnicas modificadoras genéticas, tales como mutagénesis, dirigida al sitio, mutagénesis química aleatoria, procedimientos de supresión de Exonucleasa III, o técnicas de clonación estándares. Alternativamente, tales variantes, mutantes, fragmentos, análogos o derivados se pueden crear usando procedimientos de síntesis o modificación química. Los métodos para preparar variantes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las variantes se pueden preparar al usar mutagénesis aleatoria y dirigida al sitio. La mutagénesis aleatoria y dirigida al sitio son general conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Arnold (1993) *Curr. Opin. Biotech.* 4:450-455). La mutagénesis aleatoria se puede lograr usando PCR propensa a errores (ve, por ejemplo, Leung y colaboradores(1989) *Technique* 1:11-15; y Caldwell y colaboradores (1992) *PCR Methods Applic.* 2: 28-33). En la PCR propensa a errores, la PCR actual se lleva a cabo bajo condiciones donde la fidelidad de copiado de la ADN polimerasa es baja, tal que una alta tasa de mutaciones sobrepuntuales se obtiene a lo largo de la longitud completa de producto de PCR. Brevemente, en tales procedimientos, los ácidos nucleicos que se mutagenizan (por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína P450 o

polipéptido de fusión híbrido P450) se mezclan con los cebadores PCR, solución amortiguadora de reacción, $MgCl_2$, $MnCl_2$, Taq polimerasa, y una concentración apropiada de dNTPs para lograr una alta tasa de mutación puntual a lo largo de la longitud completa del producto de PCR. Por ejemplo, la reacción se puede llevar a cabo usando 20 fmoles de ácido nucleico que se mutagenizan, 30 pmoles de cada cebadores de PCR, una solución amortiguadora de reacción que comprende KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM (pH 8.3), 0.01% de gelatina, $MgCl_2$ 7 mM, $MnCl_2$ 0.5 mM, 5 unidades de Taq polimerasa, dGTP 0.2 mM, dATP 0.2 mM, dCTP 1 mM, y dTTP 1 mM. La PCR se puede llevar a cabo durante 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 45°C durante 1 minuto, y 72°C durante 1 minuto. Sin embargo, se apreciará por aquellas personas experta en la técnica que estos parámetros se puedan variar como sea apropiado. Los ácidos nucleicos mutagenizados después se clonan en un vector apropiado, y las actividades de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos mutagenizados se evalúan. La mutagénesis dirigida al sitio se puede lograr usando mutagénesis dirigida a oligonucleótidos para generar mutaciones específicas de sitio en cualquier ADN clonado de interés. La mutagénesis de oligonucleótidos se describe en la técnica (ver, por ejemplo, Reidhaar-Olson y colaboradores (1988) *Science* 241:53-57). Brevemente, en tales

procedimientos una pluralidad de oligonucleótidos de doble hebra que llevan una o más mutaciones se introduce en el ADN clonado que se sintetiza e inserta en el ADN clonado que se mutageniza (por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido P450 o polipéptido de fusión híbrido P450). Los clones que contienen el ADN mutagenizado se recuperan, y se evalúan las actividades de los polipéptidos que los codifican.

Otro métodos para generar variantes es la PCR de ensamble. La PCR de ensamble implica el ensamble de un producto de PCR de una mezcla de fragmentos de ADN pequeños se presenta una gran variedad de reacciones de PCR diferentes en paralelo en el mismo vial, con los productos de una reacción que ceba los productos de otra reacción (ver Patente de E.U.A. 5,965,408). Aún otro método para generar variantes es PCR sexual. En la mutagénesis PCR sexual, se presenta la recombinación homóloga forzada entre las moléculas de ADN de diferentes secuencias de ADN, pero sumamente relacionadas *in vitro* como resultado de la fragmentación aleatoria de la molécula de ADN basada en la homología de secuencia. Esto se sigue por fijación del cruce por la extensión del cebador por una reacción de PCR. La mutagénesis de PCR sexual se describe en las publicaciones conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

91:10747-10751). Las variantes también se pueden crear por mutagénesis *in vivo*. En algunas modalidades, las mutaciones aleatorias en una secuencia de ácido nucleico se generan al propagar la secuencia en una cepa bacteriana, tal como una
5 cepa *E. coli*, que lleva mutaciones en una o más de las rutas de reparación de ADN. Tales cepas mutantes tienen una tasa de mutación aleatoria más alta que aquella de una cepa de tipo natural. La propagación de una secuencia de ADN, (por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos que codifica un
10 polipéptido de fusión P450) en una de las tres cepas se generará eventualmente mutaciones aleatorias dentro del ADN. Las cepas mutantes adecuadas para el uso para la mutagénesis *in vivo* se describen en la publicación en la técnica (ver, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente
15 Internacional No. WO1991/016427). Las variantes también se pueden generar usando mutagénesis de casete. En la mutagénesis de casete, una región pequeña de una molécula de ADN de doble hebra se reemplaza con un casete de nucleótido sintético que difiere de la secuencia nativa. El
20 oligonucleótido contiene frecuentemente una secuencia nativa completa y/o parcialmente aleatorizada. La mutagénesis de conjunto recursiva también se puede usar para generar variantes. La mutagénesis de conjunto recursiva es un algoritmo para la modificación de proteínas (es decir,

mutagénesis de proteína) desarrollado para producir poblaciones diversas de mutantes fenotípicamente relacionados cuyos miembros difieren en la secuencia de aminoácidos. Este método usa un mecanismo de retroalimentación para controlar

5 las corridas sucesivas de la mutagénesis de casete de combinación (ver, por ejemplo, Arkin y colaboradores (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 89:7811-7815). En algunas modalidades, las variantes crean usando mutagénesis de conjuntos exponenciales. La mutagénesis de conjuntos

10 exponenciales es un proceso para generar genotecas de combinación con alto porcentaje de mutantes únicos y funcionales, en donde los grupos pequeños de los residuos se eligen al azar en paralelo para identificar, en cada posición alterada, los aminoácidos que conducen a las proteínas

15 funcionales (ver, por ejemplo, Delegrave y colaboradores (1993) *Biotech. Res.* 11:1548-1552). En algunas modalidades, se crean variantes usando procedimientos de entrelazado en donde las porciones de una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos distintos se fusionan

20 conjuntamente para crear secuencias de ácidos nucleico quiméricas que codifican polipéptidos quiméricos (como se describe en, por ejemplo, Patentes de E.U.A. Nos. 5,965,408 y 5,939,250).

Células Hospederas

Las estrategias para incrementar la producción de composiciones de ácido graso ω -OH por células hospederas recombinantes incluyen flujo incrementado a través de la ruta biosintética de ácidos grasos al expresar un gen de fusión híbrido CYP153A-reductasa y un gen de tioesterasa en el hospedero de producción. Como se usa en la presente, el término célula hospedera recombinante o célula hospedera modificada se refiere a una célula hospedera cuya constitución genética se ha alterado con respecto a la célula hospedera de tipo natural correspondiente, por ejemplo, por introducción deliberadas de nuevos elementos genéticos y/o modificación deliberada de elementos genéticos naturalmente presentes en la célula hospedera. La descendencia de tales células hospederas recombinantes también contienen estos nuevos elementos genéticos y/o modificados. En cualquiera de los aspectos de la descripción descritos en la presente, la célula hospedera se puede seleccionar de una célula de planta, célula de insecto, célula de hongo (por ejemplo, un hongo filamentoso, tal como *Candida* sp., o una levadura en gemación tal como *Saccharomyces* sp.), una célula de alga y una célula bacteriana. En una modalidad, las células hospederas recombinantes son microorganismos recombinantes. Ejemplos de células hospederas que son microorganismos

incluyen, pero no se limitan a, células del género *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Zymomonas*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Mucor*,
5 *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Chrysosporium*, *Saccharomyces*, *Stenotrophomonas*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia*, o *Streptomyces*. En algunas modalidades, la célula hospedera es una célula bacteriana Gram-positiva. En otras modalidades, la célula hospedera es
10 una célula bacteriana Gram-negativa. En algunas modalidades, la célula hospedera es una célula de *E. coli*. En algunas modalidades, la célula hospedera es una célula B de *E. coli*, un célula C de *E. coli*, una célula K de *E. coli*, o una célula W de *E. coli*. En otras modalidades, la célula hospedera es
15 una célula de *Bacillus lentus*, una célula de *Bacillus brevis*, una célula de *Bacillus stearothermophilus*, una célula de *Bacillus licheniformis*, una célula de *Bacillus alkalophilus*, una célula de *Bacillus coagulans*, una célula de *Bacillus circulans*, una célula de *Bacillus pumilis*, una célula de
20 *Bacillus thuringiensis*, una célula de *Bacillus clausii*, una célula de *Bacillus megaterium*, una célula de *Bacillus subtilis*, o una célula de *Bacillus amyloliquefaciens*. En otras modalidades, la célula hospedera es una célula de *Trichoderma koningii*, célula de *Trichoderma viride*, célula de

Trichoderma reesei, célula de *Trichoderma longibrachiatum*,
célula de *Aspergillus awamori*, célula de *Aspergillus*
fumigates, célula de *Aspergillus foetidus*, una célula de
Aspergillus nidulans, una célula de *Aspergillus niger*, una
5 célula de *Aspergillus oryzae*, una célula de *Humicola*
insolens, una célula de *Humicola lanuginosa*, una célula de
Rhodococcus opacus, una célula de *Rhizomucormicoides*, o una
célula de *Mucormicoides*. En todavía otras modalidades, la
célula hospedera es una célula de *Streptomyces lividans* o una
10 célula de *Streptomyces murinus*. En todavía otras modalidades,
la célula hospedera es una célula de *Actinomycetes*. En
algunas modalidades, la célula hospedera es una célula de
Saccharomyces cerevisiae.

En otras modalidades, la célula hospedera es una célula
15 de planta eucariota, una célula de alga, una célula de
cianobacteria, una célula de bacteria de azufre verde, una
célula de bacteria no de azufre verde, una célula de bacteria
de azufre púrpura, una célula de bacteria no de azufre
púrpura, una célula de extremófilo, una célula de levadura,
20 una célula de hongo, una célula modificada o cualquiera de
los organismos descritos en la presente, o un organismo
sintético. En algunas modalidades, la célula hospedera es
dependiente de luz o se fija en carbono. En algunas
modalidades, la célula hospedera tiene actividad autotrófica.

En algunas modalidades, la célula hospedera tiene actividad fotoautotrófica, tal como en presencia de luz. En algunas modalidades, la célula hospedera es heterotrófica o mixotrófica en ausencia de luz. En ciertas modalidades, la

5 célula hospedera es una célula de *Arabidopsis thaliana*, *Panicum virgatum*, *Miscanthus giganteus*, *Zea mays*, *Botryococcuse braunii*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Synechococcus* Sp. PCC 7002, *Synechococcus* Sp. PCC 7942, *Synechocystis* Sp. PCC 6803, *Thermosynechococcus*

10 *elongates* BP-1, *Chlorobium tepidum*, *Chlorojlexus auranticus*, *Chromatiumm vinosum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodopseudomonas palusris*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium thermocellum*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichiapastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*,

15 *Schizosaccharomyces pombe*, *Pseudomonas fluorescens*, o *Zymomonas mobilis*. En una modalidad, la célula microbiana es de una cianobacteria que incluye, pero no se limita a, *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Cyanothece*, y *Nostoc punctiforme*. En otra modalidad, la célula microbiana

20 es de una especie de cianobacteria específica incluyendo, pero no limitado a, *Synechococcus elongatus* PCC7942, *Synechocystis* sp. PCC6803, y *Synechococcus* sp. PCC7001.

Vectores de Expresión

En algunas modalidades, una secuencia de polinucleótidos

(o genes) se proporciona a la célula hospedera por medio de un vector recombinante, que incluye un promotor ligado operablemente a la secuencia de polinucleótido. En ciertas modalidades, el promotor es un promotor desarrolladamente regulado, específico de organelos, específico de tejido, inducible, constitutivo o específico de células. En algunas modalidades, el vector recombinante incluye al menos una secuencia seleccionada de una secuencia de control de expresión acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótidos; un marcador de selección acoplado operativamente a la secuencia de polinucleótido; una secuencia marcadora acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótidos; una porción de purificación acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótidos; una secuencia de secreción acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótidos; y una secuencia de orientación acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótidos. Los vectores de expresión descritos en la presente incluyen una secuencia de polinucleótidos en una forma adecuada para la expresión de la secuencia de polinucleótidos en una célula hospedera. Se apreciará por aquellas personas expertas en la técnica que el diseño del vector de expresión puede depender de tales factores como la elección de la célula hospedera que se transforma en nivel de expresión del polipéptido deseado,

y similares. Los vectores de expresión descritos en la presente se pueden introducir en las células hospederas para producir polipéptidos, incluyendo polipéptidos de fusión, codificados por la secuencias de polinucleótidos como se describe en lo anterior (*supra*). La expresión de los genes que codifican polipéptidos en las procariotas, por ejemplo, *E. coli*, se lleva a cabo más frecuentemente con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de otros de los polipéptidos de fusión o no de fusión. Los vectores de fusión agregan una variedad de aminoácidos a un polipéptido codificado en la presente, usualmente a la amino o carboxi terminal del polipéptido recombinante. Tales vectores de fusión sirven típicamente uno o más de los siguientes propósitos que incluyen incrementar la expresión del polipéptido recombinante; incrementar la expresión del polipéptido recombinante; incrementar la solubilidad del polipéptido recombinante; y ayudar en la purificación del polipéptido recombinante al actuar como un ligando en la purificación por afinidad. Frecuentemente, en los vectores de expresión de fusión, un sitio de escisión proteolítico se introduce en la unión de la porción de fusión y el polipéptido recombinante. Esto permite la separación del polipéptido recombinante de la porción de fusión después de la purificación del polipéptido recombinante de fusión.

Ejemplos de tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento cognadas, incluyen Factor Xa, trombina, y enterocinasa. Los vectores de expresión de fusión ejemplares incluyen el vector pGEX (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ; Smith y
5 colaboradores (1988) *Gene* 67:31-40), vector pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA), y vector pRITS (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, N.J.), los cuales fusionan la glutational S-transferasa (GST), la proteína de ligación a maltosa E, o la proteína A, respectivamente, al polipéptido recombinante
10 objetivo.

De vectores de expresión de *E. coli* no de fusión, inducibles incluyen el vector pTrc (Amann y colaboradores (1988) *Gene* 69:301-315) y el vector pET 11d (Studier y
colaboradores, *Gene Expression Technology: Methods in*
15 *Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89). La expresión del gen objetivo del vector pTrc depende de la transcripción de ARN polimerasa hospedera de un promotor de opresión trp-lac híbrido. La expresión del gen objetivo del vector pET 11d depende de la transcripción de un promotor
20 de fusión T7 gn10-lac mediado por una ARN polimerasa viral co-expresada (T7 gn1). Esta polimerasa viral es suministrada por cepas hospederas tales como BL21(DE3) o HMS174(DE3) de un macrófago λ residente que aloja un gen T7 gn1 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5. Los sistemas de

expresión adecuados para células tanto procariotas como eucariotas son bien conocidos en la técnica (ver, *por ejemplo*, Sambrook y colaboradores (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory). Ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* no de fusión, inducibles incluyen el vector pTrc (Amann y colaboradores (1988) *Gene* 69:301-315) y el vector PET 11d (Studier y colaboradores (1990) *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA, pp. 60-89). En ciertas modalidades, una secuencia de polinucleótido de la descripción se liga operablemente a un promotor derivado de bacteriófago T5. En una modalidad, la célula hospedera es una célula de levadura. En esta modalidad, el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Los vectores se pueden introducir en células procariotas o eucariotas a través de una variedad de técnica reconocidas en el campo para introducir ácido nucleico extraño (*por ejemplo*, DNA) ADN en una célula hospedera. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células hospederas se pueden encontrar en, *por ejemplo*, Sambrook y colaboradores (*supra*). Para la transformación estable de células bacterianas, se sabe que (dependiendo del vector de expresión y la técnica de transformación usada) una cierta fracción de células captará y replicará el vector de

expresión. A fin de identificar y seleccionar estas transformantes, un gen que codifica el marcador seleccionable (*por ejemplo*, resistencia a un antibiótico) se puede introducir en las células hospederas junto con el gen de
5 interés. Los marcadores seleccionables incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos tales como pero no limitados a, ampicilina, canamicina, cloranfenicol, o tetraciclina. Los ácidos nucleicos que codifican un marcador seleccionable se pueden introducir en una célula hospedera en el mismo vector
10 como aquel que codifica un polipéptido descrito en la presente o que se puede introducir en un vector separado.

Modificación de la Ruta Opcional

Las células hospederas o microorganismos de la descripción incluyen cepas hospederas o células hospedera que
15 se modifican genéticamente o se modifican para contener alteraciones a fin de someter a prueba la eficiencia de las mutaciones específicas en las actividades enzimáticas (*es decir*, células o microorganismos recombinantes). Varias manipulaciones y alteraciones genético opcionales se pueden
20 usar intercambiabilmente de una célula hospedera a otra, dependiendo en que rutas enzimáticas nativas están presentes en la célula hospedera original. En una modalidad, se puede usar una célula hospedera para probar la expresión de una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa

en combinación con otros polipéptidos biosintéticos (*por ejemplo, enzimas*). Una cepa hospedera puede abarcar una variedad de alteraciones genéticas a fin de probar las variables específicas, incluyendo pero no limitado a, condiciones de cultivo que incluyen componentes de fermentación, fuente de carbono (*por ejemplo, materia prima*), temperatura, presión, condiciones reducidas de contaminación de cultivos y niveles de oxígeno.

En una modalidad, una cepa hospedera abarca una supresión *fadE* y *fhuA* opcional. La Acil-CoA deshidrogenasa (FadE) es una enzima que es importante para metabolizar ácidos grasos. Cataliza el segundo paso en la utilización de ácido graso (beta-oxidación), que el proceso de romper las cadenas largas de ácidos grasos (acil-CoAs) en moléculas de acetil-CoA. Más específicamente, el segundo paso del ciclo de β -oxidación de la degradación de ácido graso en las bacterias es la oxidación de acil-CoA a 2-enoil-CoA, que se cataliza por FadE. Cuando *E. coli* carece de FadE, no puede desarrollarse en ácidos grasos como una fuente de carbono sino puede desarrollarse en el acetato. La incapacidad de utilizar ácidos grasos de cualquier longitud de cadena es consistente con el fenotipo reportado de las cepas *fadE*, es decir, las cepas del mutante *fadE* donde se interrumpe la función FadE. El gen *fadE* se puede inactivar opcionalmente o

atenuar para asegurar que la acil-CoAs, que puede ser intermediaria en una ruta derivada de ácido graso, puede acumularse en la célula tal que todas las acil-CoAs se pueden convertir eficientemente a derivados de ácido grasos. Sin embargo, la atenuación de *fadE* es opcional cuando el azúcar se usa como una fuente de carbono puesto que bajo tal expresión de condición de FadE se reprime probablemente el FadE por lo tanto solo puede estar presente en pequeñas cantidades y no es capaz de competir eficientemente con la éster sintasa u otras enzimas para los substratos de acil-CoA. La FadE es reprimida debido a la represión catabólica. El *E. coli* y muchos otros microbios prefieren consumir azúcar sobre los ácidos grasos, de modo que cuando ambas fuentes están disponibles el azúcar se consume primero al reprimir el regulón *fad* (ver D. Clark, *J Bacteriol.* (1981) 148(2):521-6)). Por otra parte, la ausencia de los azúcares y la presencia de ácidos grasos induce a la expresión de FadE. Los intermediarios de Acil-CoA podrían perderse a la ruta de beta-oxidación puesto que las proteínas expresadas por el regulón *fad* (incluyendo *FadE*) se regulan por incremento y competirán eficientemente por acil-CoAs. De esta manera, puede ser benéfico tener el gen *fadE* inactivado o atenuado. Puesto que la mayoría de fuentes de carbono se basan principalmente en azúcar, es opcional atenuar el *FadE*. El gen

fhuA codifica para la proteína TonA, que es un transportador y receptor acoplado a energía en la membrana exterior del *E. coli* (V. Braun (2009) *J Bacteriol.* 191(11):3431-3436). Su supresión es opcional. La supresión de *fhuA* permite que la

5 célula sea más resistente al ataque de fagos lo cual puede ser benéfico en ciertas condiciones de fermentación. De esta manera, puede ser deseable suprimir el *fhuA* en una célula hospedera que probablemente se someta a contaminación potencial durante las corridas de fermentación.

10 En otra modalidad, la cepa hospedera (*supra*) también abarca la sobreexpresión opcional de uno o más de los siguientes genes incluyendo *fadR*, *fabA*, *fabD*, *fabG*, *fabH*, *fabV*, y/o *fabF*. Ejemplos de tales genes son *fadR* de *Escherichia coli*, *fabA* de *Salmonella typhimurium* (NP_460041),

15 *fabD* de *Salmonella typhimurium* (NP_460164), *fabG* de *Salmonella typhimurium* (NP_460165), *fabH* de *Salmonella typhimurium* (NP_460163), *fabV* de *Vibrio cholera* (YP_001217283), y *fabF* de *Clostridium acetobutylicum* (NP_350156). La sobreexpresión de uno o más de estos genes,

20 que codifican para enzimas y reguladores en la biosíntesis de ácidos grasos, puede servir para incrementar el título de los compuestos derivados de ácidos grasos incluyendo ácidos grasos ω -OH y derivados de los mismos bajo diversas condiciones de cultivo.

En otra modalidad, las cepas de *E. coli* se usan como células hospederas para la producción de ácidos grasos ω -OH y derivados de los mismos. Similarmente, estas células hospederas proporcionan sobreexpresión opcional de un o más genes de biosíntesis (es decir, genes que codifican para enzimas y reguladores de biosíntesis de ácidos grasos) que pueden incrementar o mejorar adicionalmente el título de los compuestos derivados de ácidos grasos tales como derivados de ácidos grasos (por ejemplo, ácidos grasos ω -OH y α,ω -diácidos, etc.) bajo varias condiciones de cultivo incluyendo, pero no limitado a, *fadR*, *fabA*, *fabD*, *fabG*, *fabH*, *fabV* y/o *fabF*. Ejemplos de alteraciones genéticas incluyen *fadR* de *Escherichia coli*, *fabA* de *Salmonella typhimurium* (NP_460041), *fabD* de *Salmonella typhimurium* (NP_460164), *fabG* de *Salmonella typhimurium* (NP_460165), *fabH* de *Salmonella typhimurium* (NP_460163), *fabV* de *Vibrio cholera* (YP_001217283), y *fabF* de *Clostridium acetobutylicum* (NP_350156). En algunas modalidades, en algunas modalidades, los operones sintéticos que llevan estos genes biosintéticos se pueden modificar y expresar en células a fin de probar la expresión P450 bajo varias condiciones de cultivo y/o mejorar adicionalmente el ácido graso ω -OH y la producción de α,ω -diácidos. Tales operones sintéticos contienen uno o más genes biosintéticos. Un operón modificado puede contener genes

biosintéticos de ácidos grasos opcionales, incluyen fabV de *Vibrio cholera*, fabH de *Salmonella typhimurium*, fabD de *S. typhimurium*, fabG de *S. typhimurium*, fabA de *S. typhimurium* y/o fabF de *Clostridium acetobutylicum* que se pueden usar para facilitar la sobreexpresión de los derivados de ácidos grasos a fin de probar las condiciones de cultivo específicas. Una ventaja de tales operones sintéticos es que la velocidad de producción del derivado de ácido graso ω -OH puede incrementarse adicionalmente o mejorar.

En algunas modalidades, en algunas modalidades, las células hospederas o microorganismos que se usan para expresar ACP y enzimas biosintéticas (por ejemplo, ω -hidroxilasa, tioesterasa, etc.) expresarán adicionalmente genes que abarcan ciertas actividades enzimáticas que pueden incrementar la producción a uno o más derivado(s) de ácidos grasos particular tal como ácidos grasos ω -OH, derivados de ácidos grasos ω -OH, α,ω -diácidos y similares. En una modalidad, la célula hospedera tiene actividad de tioesterasa (E.C. 3.1.2.* o E.C. 3.1. 2.14 o E.C. 3.1.1.5) para la producción de ácidos grasos que se puede incrementar al sobreexpresar el gen. En otra modalidad, la célula hospedera tiene actividad de éster sintasa (E.C. 2.3.1.75) para la producción de ésteres grasos. En otra modalidad, la célula hospedera tiene actividad de acil-ACP reductasa (AAR) (E.C.

1.2.1.80) y/o actividad de alcohol deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.1.) y/o actividad de alcohol graso acil-CoA reductasa (FAR) (E.C. 1.1.1.*) y/o actividad de ácido carboxílico reductasa (CAR) (EC 1.2.99.6) para la producción de alcoholes

5 grasos. En otra modalidad, la célula hospedera tiene actividad de acil-ACP reductasa (AAR) (E.C. 1.2.1.80) para la producción de aldehídos grasos. En otra modalidad, la célula hospedera tiene actividad de acil-ACP reductasa (AAR) (E.C. 1.2.1.80) y actividad de descarbonilasa (ADC) para la

10 producción de alcanos y alquenos. En otra modalidad, la célula hospedera tiene actividad de acil-CoA reductasa (E.C. 1.2.1.50), actividad de acil-CoA sintasa (FadD) (E.C. 2.3.1.86), y actividad de tioesterasa (E.C. 3.1.2.* o E.C. 3.1. 2.14 o E.C. 3.1.1.5) para la producción de alcoholes

15 grasos. En otra modalidad, la célula hospedera tiene actividad de éster sintasa (E.C. 2.3.1.75), actividad de acil-CoA sintasa (FadD) (E.C. 2.3.1.86), y actividad de tioesterasa (E.C. 3.1.2.* o E.C. 3.1. 2.14 o E.C. 3.1.1.5) para la producción de ésteres grasos. En otra modalidad, la

20 célula hospedera tiene actividad de OleBCD para la producción de cetonas. En otra modalidad, la célula hospedera tiene actividad de acil-ACP reductasa (AAR) (E.C. 1.2.1.80) y actividad de alcohol deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.1.) para la producción de alcoholes grasos. En otra modalidad, la célula

hospedera tiene actividad de tioesterasa (E.C. 3.1.2.* o E.C. 3.1. 2.14 o E.C. 3.1.1.5) y actividad de descarboxilasa para preparar olefinas terminales. La expresión de las actividades enzimáticas en los microorganismos y células microbianas es enseñado por los Números de Patentes de E.U.A. 8,097,439; 8,110,093; 8,110,670; 8,183,028; 8,268,599; 8,283,143; 8,232,924; 8,372,610; y 8,530,221, que se incorporan en la presente a manera de referencia. En otras modalidades, las células hospederas o microorganismos que se usan para expresar ACP y otras enzimas biosintéticas incluirán ciertas actividades enzimáticas nativas, que se regulan por incremento o se sobreexpresan a fin de producir un derivado(s) de ácido graso particular tal como ácidos grasos ω -OH, derivados de ácidos grasos ω -OH, y α,ω -diácidos. En una modalidad, la célula hospedera tiene una actividad de tioesterasa nativa (E.C. 3.1.2.* o E.C. 3.1. 2.14 o E.C. 3.1.1.5) para la producción de ácidos grasos que se puede incrementar al sobreexpresar el gen de tioesterasa.

La presente descripción incluye cepa hospederas o microorganismos que expresan genes que codifican para las variantes de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa y otras enzimas biosintéticas (*supra*). Las células hospederas recombinantes producen derivados de ácidos grasos tales como ácidos grasos ω -OH, derivados de ácidos grasos ω -OH, α,ω -

diácidos y composiciones y mezclas de los mismos. Los derivados de ácidos grasos se recuperan típicamente del medio de cultivo y/o se aíslan de las células hospederas. En una modalidad, los derivados de ácidos grasos se recuperan del medio de cultivo (extracelular). En otra modalidad, los derivados de ácidos grasos se aíslan de las células hospederas (intracelulares). En otra modalidad, los derivados de ácidos grasos se recuperan del medio de cultivo y se aíslan de las células hospederas. Los derivados o composiciones de ácidos grasos producidos por una célula hospedera se pueden analizar usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo GC-FID, a fin de determinar la distribución de los derivados de ácidos grasos particulares así como las longitudes de cadena ligado de saturación de los componentes de los derivados de ácidos grasos ω -OH tales como ácidos grasos ω -OH, ésteres de ácidos grasos ω -OH, α,ω -diácidos, y similares.

Cultivo y Fermentación

Como se usa en la presente, el término fermentación se refiere ampliamente a la conversión de materiales orgánicos en las estancias objetivo por células hospederas, por ejemplo, la conversión de una fuente de carbono por células hospederas recombinantes en ácidos grasos ω -OH o derivados de los mismos al propagar un cultivo de las células hospederas

recombinantes en un medio que comprende la fuente de carbono. Las condiciones permisivas para la producción se refieren a cualquier condición que permita que una célula hospedera produzca un producto deseado, tal como ácidos grasos ω -OH.

5 Similarmente, la condición o condiciones en las cuales la secuencia de polinucleótidos de un vector se expresa significan cualquiera de las condiciones que permiten que una célula hospedera sintetice un polipéptido. Las condiciones adecuadas incluyen, por ejemplo, condiciones de fermentación.

10 Las condiciones de fermentación pueden incluir muchos parámetros incluyendo, pero no limitado a, intervalos de temperatura, niveles de aireación, velocidades de alimentación y composición de medios. Cada una de estas condiciones, individualmente y en combinación, permiten que

15 la célula hospedera se desarrolle. La fermentación puede ser aeróbica, anaeróbica, o variaciones de las mismas (tal como micro-aerobic). Los medios de cultivo ejemplares incluyen caldos o geles. En general, el medio incluye una fuente de carbono que se puede metabolizar por una célula hospedera

20 directamente. Además, las enzimas se pueden usar en el medio para facilitar la movilización (por ejemplo, la despolimerización del almidón o celulosa a azúcares fermentables) y metabolismos subsecuentes de la fuente de carbono.

Para la producción de escala pequeña, las células hospederas modificadas se pueden desarrollar en lotes de, por ejemplo, aproximadamente 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 400 μ L, 500 μ L, 1mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL, 25 mL, 50 mL, 75 mL, 100 mL, 500 mL, 1 L, 2 L, 5 L, o 10 L; se pueden fermentar; e inducir para expresar una secuencia de polinucleótidos deseada, tal como una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de fusión híbrido P450. Para la producción a gran escala, las células hospederas modificadas se pueden desarrollar en lotes de aproximadamente 10 L, 100 L, 1000 L, 10,000 L, 100,000 L, y 1,000,000 L o 1 más grandes; se pueden fermentar; e inducir ara expresar una secuencia de polinucleótidos deseada. Alternativamente, se puede llevar a cabo la fermentación en lotes alimentados de escala grande.

Los ácidos grasos ω -OH derivados y composiciones de los mismos como se describe en la presente se encuentran en el medio ambiente intracelular del cultivo de células hospederas recombinantes y se puede aislar fácilmente del medio de cultivo. Un ácido graso ω -OH o derivado del mismo se puede secretar por la célula hospedera recombinante, transportar el medio ambiente extracelular o transferir pasivamente en el medio amiente extracelular del cultivo de células hospederas recombinante. Los ácidos grasos ω -OH o derivados de los mismos se aíslan de un cultivo de células hospederas

recombinante usando métodos de rutina conocidos en la técnica.

Productos Derivados de Células Hospedera Recombinantes

Como se usa en la presente, la fracción de carbono modern
5 o FM tiene el mismo significado como se define por National
Institute of Standards and Technology (NIST) Standard
Reference Materials (SRMs4990B y 4990C, conocido como
estándares de ácidos oxálicos HOxI y HOxII, respectivamente.
La definición fundamental se refiere a 0.95 veces en la
10 relación de isotopos $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ HOxI (referida como AD 1950).
Esto es aproximadamente equivalente a la madera de la
revolución pre-industrial corregida por decaimiento. Para la
biosfera viviente actual (material vegetal), FM es
aproximadamente 1.1. Los bioproductos (*por ejemplo*, derivados
15 de ácidos grasos que incluyen ácidos grasos ω -OH y derivados
de producidos de acuerdo con la presente descripción)
incluyen compuestos orgánicos biológicamente producidos. En
particular, los derivados de ácidos grasos (*por ejemplo*,
ácidos grasos ω -OH y derivados de los mismos) producidos
20 usando una ruta biosintética de ácido graso en la presente,
no se han producido de fuentes renovables y, como tal, son
nuevas composiciones de materia. Estos nuevos bioproductos se
pueden distinguir de los compuestos orgánicos derivados de
carbono petroquímico sobre la base de la huella de carbono-

isotópica doble o datación ^{14}C . Adicionalmente, la fuente específica de carbono bio-originado (*por ejemplo*, glucosa vs. glicerol) se puede determinar por huella de carbono-isotópica doble (*ver, por ejemplo*, Patente de E.U.A. No. 7,169,588). La

5 capacidad para distinguir los bioproductos de compuestos orgánicos basados en petróleo es benéfica en rastrear estos materiales en el comercio. Por ejemplo, los compuestos o químicos orgánicos que incluyen ambos perfiles de isotopos de carbono biológicamente basados y basados en petróleo se puede

10 distinguir de los compuestos orgánicos y químicos fabricados solamente de materiales basados en petróleo. Por consiguiente, los bioproductos en la presente pueden ser seguidos o rastreados en el comercio sobre la base de su perfil de isotopos de carbono únicos. Los bioproductos se

15 pueden distinguir de los compuestos orgánicos basados en petróleo al comparar la relación de isotopos de carbono estable ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) en cada muestra. La relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en un bioproducto dado es una consecuencia de la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en el dióxido de carbono atmosférico en el momento en que se

20 fija el dióxido de carbono. También refleja la ruta metabólica precisa. También pueden presentarse variaciones regionales. El petróleo, planta C3 (la hoja ancha), planta C4 (los pastos), y carbonatos marinos todos muestran diferencias significativas en $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y los valores $\delta^{13}\text{C}$ correspondientes.

Adicionalmente, la materia de lípidos de las plantas C3 y C4 analiza de manera diferente que los materiales derivados de los componentes de carbohidratos de las mismas plantas como una consecuencia de la ruta metabólica. Dentro de la
5 precisión de la medición, el ^{13}C muestra grandes variaciones debido a los efectos de fraccionamiento isotópicos, lo más significativo de los cuales para los bioproductos es el mecanismo fotosintético. La causa principal de diferencias en la relación de isótopos de carbono en las plantas se
10 estrechamente con diferencias en la ruta del metabolismo de carbono fotosintético en las plantas, particularmente la reacción que se presenta durante la carboxilación primaria (es decir, la fijación inicial de CO_2 atmosférico). Dos grandes clases de vegetaciones son aquellas que incorporan el
15 ciclo fotosintético C3 (o Calvin-Benson) y aquellos que incorporan el ciclo fotosintético C4 (o Hatch-Slack). En las plantas C3, la fijación de CO_2 primaria o reacción de carboxilación implica la enzima ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa, y el primer producto estable es un compuesto de
20 3 carbonos. Plantas C3 tales como maderas duras y coníferas, son dominantes en las zonas climas templadas. En las plantas C4, una región de carboxilación adicional que implica otra enzima, fosfoenol-piruvato carboxilasa, es la reacción de carboxilación primaria. El primer compuesto de carbón estable

es un ácido de 4 carbonos, que se descarboxila subsecuentemente. El CO₂ relacionado de esta manera se vuelve a fijar por el ciclo C3. Ejemplos de plantas C4 tropicales, maíz y caña de azúcar. Ambas plantas C4 y C3 muestran un

5 intervalo de relaciones isotópicas ¹³C/¹²C, pero los valores típicos son aproximadamente -7 a aproximadamente -13 por mil para C4 y aproximadamente -19 a aproximadamente -27 por mil para planta C3 (ver, por ejemplo, Stuiver y colaboradores (1977) *Radiocarbon* 19:355). El carbón mineral y el petróleo

10 se encuentran en general en este último intervalo. La escala de medición ¹³C se definió originalmente por un conjunto cero por piedra caliza de Belemnita Pee Dee (PDB), donde los valores se proporcionan en partes por miles desviaciones de este material. Los valores δ¹³C se expresan en partes por mil

15 (por mil), abreviado, ‰, y se calcula como sigue:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = [({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}) \text{ muestra} - ({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}) \text{ estándar}] / ({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}) \text{ estándar} \times 1000$$

Puesto que el material de referencia de PDB (RM) se ha agotado, se han desarrollado una serie de RMs alternativas en

20 cooperación con IAEA, USGS, NIST, y otros laboratorios de isótopos internacionales. Las anotaciones para las desviaciones por mil de PDB es δ¹³C. Las mediciones se hacen en CO₂ mediante espectrometría de masa de relación estable de alta precisión (IRMS) o iones moleculares de masas 44, 45, y

46. Las composiciones descritas en la presente incluyen bioproductos producidos por cualquiera de los métodos descritos en la presente, incluyendo, por ejemplo, productos derivados de ácidos grasos. Específicamente, el bioproducto puede tener un $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente -28 o mayor, aproximadamente -27 o mayor, -20 o mayor, -18 o mayor, -15 o mayor, -13 o mayor, -10 o mayor, o -8 o mayor. Por ejemplo, el bioproducto puede tener un $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente -30 a aproximadamente -15, aproximadamente -27 a aproximadamente -19, aproximadamente -25 a aproximadamente -21, aproximadamente -15 a aproximadamente -5, aproximadamente -13 a aproximadamente -7, o aproximadamente -13 a aproximadamente -10. En otros casos, el bioproducto puede tener un $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente -10, -11, -12, o -12.3. Los bioproductos producidos de acuerdo con la descripción en la presente, también se pueden distinguir de los compuestos orgánicos basados en petróleo al comparar la cantidad de ^{14}C en cada compuesto. Debido al ^{14}C tiene una vida media nuclear de 5730 años, los combustibles basados en petróleo que contienen carbonos más antiguos se pueden distinguir de los bioproductos que contienen carbono más reciente (ver, por ejemplo, Currie, Source Apportionment of Atmospheric Particles, Characterization of Environmental Particles, J. Buffle and H. P. van Leeuwen, Eds., 1 of Vol. I of the IUPAC

Environmental Analytical Chemistry Series (Lewis Publishers, Inc.) 3-74, (1992)). La suposición básica de la datación del radiocarbono es que la constancia de la concentración de ^{14}C en la atmósfera conduce a la constancia de ^{14}C en los organismos vivos. Sin embargo, debido a la prueba nuclear atmosférica desde 1950 y la quema de combustible fósil de 1850, el ^{14}C ha adquirido una segunda característica de tiempo geoquímica. Su concentración en el CO_2 atmosférico, y por consiguiente en la biosfera viviente, se duplicó aproximadamente al pico de la prueba nuclear, a mediados de 1960. Desde entonces ha regresado gradualmente a la tasa de isotopos de línea base cosmogénica de estos permanente (atmosférica) ($^{14}\text{C} / ^{12}\text{C}$) de aproximadamente 1.2×10^{-12} , con una "vida media" de relajación aproximada de 7-10 años. Esta última vida media no se debe tomar literalmente; sino, se debe usar la función de entrada/decaimiento nuclear atmosférica para rastrear las variaciones de ^{14}C atmosférico y bioesférico desde el inicio de la edad nuclear. Esta es la característica de tiempo de ^{14}C bioesférico posterior que mantiene la promesa de la datación anual de carbono bioesférico reciente. El ^{14}C se puede medir por espectrometría de masa aceleradora (AMS), con resultados dados en unidades de fracción de carbono moderno (fM). El fM se define por National Institute of Standards and Technology (NIST)

Standard Reference Materials (SRMs) 4990B y 4990C. Como se usa en la presente, la fracción de carbono moderno fM tiene el mismo significado como se define por National Institute of Standards and Technology (NIST) Standard Reference Materials (SRMs) 4990B y 4990C, conocido como estándares de ácidos oxálicos HOxI y HOxII, respectivamente. La definición fundamental se relaciona con 0.95 veces la relación de isotopos $^{14}\text{C} / ^{12}\text{C}$ HOxI (referido como 1950 AD). Esto es particularmente equivalente a la madera de la revolución pre-industrial corregida por decaimiento. Para la biosfera viviente actual (material vegetal), el fM es de aproximadamente 1.1. Las composiciones descritas en la presente incluyen bioproductos que pueden tener un fM ^{14}C de al menos aproximadamente 1. Por ejemplo, el bioproducto de la descripción puede tener un fM ^{14}C de al menos aproximadamente 1.01, un fM ^{14}C de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.5, un fM ^{14}C de aproximadamente 1.04 a aproximadamente 1.18, o un fM ^{14}C de aproximadamente 1.111 a aproximadamente 1.124.

Otra medición de ^{14}C es conocida como el porcentaje del carbono moderno (pMC). Para un arqueólogo o geólogo que usa las dataciones ^{14}C , en 1950 AD iguala a cero años de antigüedad. Esto también representa 100 pMC. El carbono de la bomba en la atmósfera alcanzó casi dos veces el nivel normal en 1963 en el pico de armas termonucleares. Su distribución

dentro de la atmósfera ha sido aproximada desde su aparición, mostrando valores que son mayores que 100 pMC para plantas y animales vivos desde 1950 AD. Ha disminuido gradualmente a través del tiempo con el valor en la actualidad que está
5 cerca de 107.5 pMC. Esto significa que un material de biomasa reciente, tal como maíz, proporcionaría una firma de ^{14}C cerca de 107.5 pMC. Los compuestos basados en petróleo tendrán un valor pMC de cero. La combinación de carbono fósil con el carbono de la actualidad dará por resultado una dilución del
10 contenido de pMC. Al presumir que 107.5 pMC representa el contenido de ^{14}C de los materiales de biomasa de la actualidad y 0 pMC representa el contenido ^{14}C de productos basados en petróleo, el valor pMC medido para ese material reflejará las proporciones de los dos tipo de componente. Por ejemplo, un
15 material derivado de 100% de soja en la actualidad proporcionará una firma de radiocarbono cerca de 107.5 pMC. Si ese material se diluyó 50% co productos basados de petróleo, proporcionaría una firma de radiocarbono de aproximadamente 54 pMC. Un contenido de carbono
20 biológicamente basado se deriva al asignar 100% igual 107.5 pMC y 0% igual a 0 pMC. Por ejemplo, una muestra que mide 99 pMC proporcionará un contenido de carbono biológicamente basado equivalente de 93%. Este valor es referido como el resultado de carbono biológicamente basado medio y asume en

todos los componentes dentro del material analizado originados ya sea del material biológico de la actualidad o el material basado en petróleo. Un bioproducto que comprende uno o más derivados de ácidos grasos como se describe en la presente puede tener un pMC de al menos aproximadamente 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, o 100. En otros casos, el derivado de ácido graso descrito en la presente puede tener un pMC de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100; aproximadamente 60 y aproximadamente 100; aproximadamente 70 y aproximadamente 100; aproximadamente 80 y aproximadamente 100; aproximadamente 85 y aproximadamente 100; aproximadamente 87 y 98; o aproximadamente 90 y aproximadamente 95. En todavía otros casos, un derivado de ácido graso descrito en la presente puede tener un pMC de aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, o 94.2.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos se proponen para ilustrar la descripción y nos deben considerar como limitantes del alcance de las reivindicaciones.

Protocolos y Métodos

Clasificación de una Genoteca

Todos los protocolos descritos en la presente dependen

de un sistema de 2mL de bloque maestro de placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Monroe, NC o Corning, Ámsterdam, Los Países Bajos) para desarrollar cultivos, y placas (Costar, Inc.) para extraer especies de ácidos grasos del
 5 caldo de cultivo. Los protocolos proporcionados a continuación son ejemplos de condiciones de fermentación. Los protocolos alternativos se pueden usar para evaluar la producción de especies de ácidos grasos.

Protocolo de Cultivo Plim a 32°C

10 Se usaron 30µL de cultivo LB (de un cultivo de LB que se desarrollan en una placa de 96 para inocular 290µL de medio Plim (Tabla 2), que después se incubó durante aproximadamente 16 horas a 32°C con agitación. 40µL de las semillas de la noche se usaron para inocular 360µL de medio Plim. Después
 15 del desarrollo a 32°C durante 2 horas, los cultivos se indujeron con IPTG (concentración final 1 mM) (siguiente Tabla 3). Los cultivos después se incubaron a 32°C con agitación durante 20 horas si no se indicó de otra manera, después de lo cual se extrajeron siguiente el protocolo de
 20 extracción estándar detallado a continuación.

Protocolo de Cultivo Nlim a 35°C

Se usaron 40µL de cultivo LB (de un cultivo LB que se desarrolla en una placa de 96 pocillos) para inocular 360µL de medio LB (siguiente Tabla 3), que después se incubó

durante aproximadamente 4 horas a 32°C con agitación. 40µL de la semilla LB se usaron para inocular 360µL de medio Nlim. Después del crecimiento a 32°C durante 2 horas a 35°C, los cultivos se adujeron con IPTG (concentración final 1 mM) (siguiente Tabla 3). Los cultivos después se incubaron a 35°C con agitación durante 20 horas si no se indicó de otra manera, después de lo cual se extrajeron siguiendo el protocolo de extracción estándar detallado a continuación.

Tabla 3: Nombres y Formulaciones de los Medios

10	Nombre del Medio	Formulación		
	Plim	1	x	5x de Solución Salina Plim con (NH ₄) ₂ SO ₄
		1	x	1000x de Vitaminas Trazas
		1	mg/L	10mg/mL de Tiamina
		1	mM	MgSO ₄ 1M
		0.1	mM	CaCl ₂ 1M
		40	g/L	500g/L de glucosa
		1	x	1000x de Minerales Trazas
15		10	mg/L	10g/L de Fe Citrato
		100	µg/mL	100 mg/ml de espectinomicina
		100	mM	BisTris 2M (pH7.0)
		0.5	mM	Ácido aminolevulínico
	Nlim	1	x	5x de solución salina con NH ₄ Cl
		1	x	1000x vitaminas trazas
		1	mg/L	10mg/mL de Tiamina
		1	mM	MgSO ₄ 1M
20		0.1	mM	CaCl ₂ 1M
		40	g/L	500g/L de glucosa
		1	x	1000x de minerales trazas
		10	mg/L	10g/L de Fe Citrato
		100	µg/mL	100 mg/ml de espectinomicina
		100	mM	BisTris 2M (pH7.0)
		0.5	mM	Ácido aminolevulínico

Protocolo de Extracción Estándar de Especies de Ácidos Grasos

Se agregaron a cada pocillo 80µL de HCl 1M extraído, seguido por un 400µL de acetato de butilo (con 500mg/L de pentadecanol como estándar interno). Las placas de 96
5 pocillos después sellaron con calor usando un sellador de placa. Calentador (ALPS-300; Abgene, ThermoScientific, Rockford, IL), y se agitó durante 15 minutos a 2000rpm usando un mezcladora MIXMATE (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Después de la agitación, las placas se centrifugaron durante
10 10 minutos a 4500rpm a temperatura ambiente (Allegra X-15R, rotor SX4750A, Beckman Coulter, Brea, CA) para separar las capas acuosas y orgánicas. 100µL de la capa orgánica se transfirió a una placa de 96 (polipropileno, Corning, Ámsterdam, Los Países Bajos) y se derivaron con 100uL de
15 BSTFA. La placa se selló con calor subsecuentemente y se almacenó a -20°C hasta que se evaluó por GC-FID usando el método w-OH FFA que se llevó a cabo como sigue: 1µL de una muestra se inyectó en una columna analítica (DB-1, espesor de la película 10 m × 180 µm × 0.2 µm, disponible de JW 121-
20 101A) en un dispositivo Agilent 7890A GC Ultra (Agilent, Santa Clara, CA) con un detector de ionización de llama (FID) con una división de 1-20. El instrumento se ajustó para detectar y cuantificar ácidos grasos C₁₀ a C₁₈ y ácidos grasos ω-hidroxilados. El protocolo detallado en lo anterior

representa las condiciones estándares, que se pueden modificar como sea necesario para optimizar los resultados analíticos.

Preparación de Genotecas Propensas a Errores

5 Las técnicas estándares conocidas por aquellas personas de experiencia en el campo se usaron para preparar genotecas propensas a errores. En un ejemplo, la cadena principal del vector se preparó usando endonucleasas de restricción en el vector, mientras que la creación de la diversidad en el
10 inserto de ADN se generó por amplificación de PCR de una plantilla de ADN bajo condiciones que favorecen la incorporación de nucleótidos no coincidentes. En un procedimiento, la clonación de la cadena principal del vector y un inserto de ADN con diversidad se llevó a cabo usando el
15 Sistema de Clonación INFUSION (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Preparación de Genotecas de Saturación

Las técnicas estándares conocidas por aquellas personas
20 de experiencia en el campo se usaron para preparar genotecas de saturación. En un ejemplo, la cadena principal del vector se preparó usando endonucleasas de restricción en el vector, mientras que la creación de la diversidad en el inserto de ADN se generó usando cebadores de degeneración. En un

procedimiento, la clonación de la cadena principal del vector y un inserto de ADN con diversidad se llevó a cabo usando el Sistema de Clonación INFUSION (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Preparación de Genotecas de Combinación

Las mutaciones identificadas como benéficas se combinaron para proporcionar variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153-reductasa (*por ejemplo*, variantes de proteína CYP153A-RedRhF híbridas) con mejoras adicionales en la producción de especies de derivados de ácidos grasos ω -OH. Las técnicas estándares conocidas por aquellas personas de experiencia en el campo se usaron para preparar las genotecas de combinación. En un ejemplo, la cadena principal de vector se preparó usando endonucleasas de restricción en el vector, mientras que la creación de la diversidad en el inserto de ADN se generó usando cebadores para introducir las mutaciones deseadas. Como se describe en lo anterior, en un procedimiento, la clonación de la cadena principal del vector y un inserto de ADN con la diversidad se llevó a cabo usando el Sistema de Clonación INFUSION (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las genotecas de combinación se pueden generar usando el protocolo de PCR de transferencia (tPCR) (Erijman y

colaboradores (2011) *J. Structural Bio.*175:171-177).

Clasificación de Genotecas

Una vez que la diversidad de genotecas se generó en una genoteca de saturación, propensa a errores o genoteca de combinación, se clasificó usando uno de los métodos descritos en lo anterior. Dos tipos de aciertos fueron identificados: (1) cantidad incrementada de ácidos grasos ω - (título ω -OH FFA); y/o (2) conversión incrementada de ácidos grasos a ácidos grasos ω -hidroxi. Las mutaciones en las variantes de proteína cyp153A-RedRhF híbridas dentro de cada acierto se identificaron por secuenciación, usando técnicas estándares rutinariamente empleadas por aquellas personas de experiencia en el campo. Las siguientes Tablas 5, 6 y 7 listan las mutaciones (aciertos) identificados como benéficas en las genotecas de saturación.

EJEMPLO 1: Construcción de la Cepa y Plásmido para la Clasificación de Genotecas

Este ejemplo describe las cepas y plásmidos para saturación o clasificación de genoteca de mutagénesis de combinación.

Un gen que codifica para una proteína de fusión híbrida preparada de la proteína catalítica CYP153A(G307A) P450 de *Marinobacter aquaeoli* y el dominio reductasa que contiene FMN- y Fe/S- c-terminal de P450RhF de *Rhodococcus* sp.

NCIMB9784 se creó como sigue: El gen *cyp165A*(G307A)_Maqu se amplificó del ADN genómico y se fusionó con un dominio reductasa P450RhF sintético optimizado con codón por PCR cruzada. El gen de fusión resultante (SEQ ID NO: 5) se clonó
5 en un derivado de pACYC (*es decir*, replicón p15A, marcador de resistencia a la canamicina) tal que su transcripción se controló por el promotor *P_{trc}* inducible por IPTG. El plásmido fue nombrado pEP125 (ver Tabla 4, *infra*).

El gen que codifica para la proteína de fusión
10 *cyp153A*(G307A)-Red450RhF híbrida también se amplificó de pEP125 y se clonó en un vector de derivado de pCL1920 (replicón SC101, marcador de resistencia a espectinomicina), tal que su transcripción se controló por el promotor *P_{trc}* inducible por IPTG y formó un operón con los genes que
15 codifican para una tioesterasa de planta (*fatB1*), una variante de 3-ceto-acil-ACP sintasa (*fabB*) y un regulador transcripcional (*fadR*). El plásmido fue nombrado pLC81 (ver Tabla 4, *infra*).

Se crearon plásmidos adicionales como sigue: el gen que
20 codifica una tioesterasa de planta (*fatB1*) de *Umbellularia californica* se sintetizó como el ADN utilizado con codón y se clonó en un vector de derivado de pCL1920 (replicón SC101, marcador de resistencia a la espectinomicina), tal que su transcripción se controló por el promotor *P_{trc}* inducible por

IPTG y formó un operón que con genes que codifican ara
acetil-CoA carboxilasa (accDACB), biotina ligasa (birA) y una
proteína portadora de acilo. El plásmido fue nombrado pNH305
(ver Tabla 4, *infra*). El plásmido pAS033 se creó al
5 reemplazar fatB1 en pNH305 con una tioesterasa de planta
sintética optimizada con codón (fatA3) de *Arabidopsis*
thaliana (ver Tabla 4, *infra*). El plásmido pEP146 se creó al
reemplazar fatB1 en pLC81 con una tioesterasa de planta
sintética optimizada con codón (fatA3) de *Arabidopsis*
10 *thaliana* (ver Tabla 4, *infra*). El pEP146 también llevó una
mutación en la proteína repA codificado con plásmido.

Las cepas base usadas para la transformación del
plásmido fueron GLP077 y BZ128. Brevemente, el genoma de la
cepa base GLPH077 se manipuló como sigue: el gen de acil-CoA
15 deshidrogenasa (*fadE*) se suprimió y se sobreexpresó un
regulador transcripcional (*fadR*) y un operón de síntesis de
ácidos grasos sintéticos. Brevemente, el genoma de la cepa
base BZ128 se manipuló como sigue: el gen *fadE* (acil-CoA
deshidrogenasa) se suprimió y se sobreexpresó un operón de
20 biosíntesis de ácido graso sintético, una β -hidroxi acil-ACP
grasa deshidratasa (*fabZ*) y una variante de una tioesterasa
(*tesA*). Además, la cepa se había sometido previamente al
transposon así como a la mutagénesis de N-metil-N'-nitro-N-
nitrosoguanidina (NTG) y clasificación.

Tabla 4: Plásmidos usados para la clasificación de la genoteca

Plásmido	Descripción
pAS033	pCL-fatA3 _Atal-accDCBAbirA_Cglu-acp_Ecol
pEP125	pACYC-cyp153A (G307A) _Maqu-RedRhF_Rhod
pNH305	pCL-fatB1_Ucal-accDCBAbirA_Cglu-acp_Ecol
pLC81	pCL- cyp153A (G307A) _Maqu-RedRhF_Rhod-fatB1_Ucal-fadB_Ecol-fadR_Ecol
pEP146	pCL*- cyp153A (G307A) _Maqu-RedRhF_Rhod-fatA3-Atal-fadB_Ecol-fadR_Ecol

La proteína de fusión cyp153A (G307A)-Red450RhF híbrida se sometió a prueba para ver si la expresión en las células hospederas podría producir derivados de ácido graso ω -OH. Un microorganismo que expresa SEQ ID NO: 5 fue capaz de producir más de 1 g/L de derivados de ácido graso ω -OH de glucosa. De esta manera, esta enzima modificada se seleccionó para estudios de evolución adicionales.

EJEMPLO 2: Genotecas de saturación del dominio catalítico P450 de la proteína de fusión cyp153A (G307A)-Red450RhF

Una genoteca de saturación completa del dominio catalítico P450 de la proteína de fusión cyp153A-Red450RhF, se construyó y se clasificó para variantes que mostraron mejoras sobre cyp153A (G307A)-Red450RhF (es decir, el polipéptido de plantilla). G307A (es decir, un residuo de alanina reemplazó una glicina en la posición 307) es una mutación benéfica que mejora la actividad de ω -hidroxilasa de

cyp153A (ver Honda Malca y colaboradores (2012) *Chem. Commun.* 48:5115). Los criterios de selección para los aciertos fueron (1) cantidad incrementada de ácidos grasos ω -hidroxi (título ω -OH FFA); y/o (2) conversión incrementada de ácidos grasos a ácidos grasos ω -hidroxi.

Las técnicas estándares conocidas por aquellas personas de experiencia en la técnica se usaron para preparar genotecas de saturación. Los plásmidos pEP125 y pLC81 (ver Tabla 4, *supra*) se usaron para preparar las genotecas de saturación completas. Se clasificaron tres genotecas de saturación: Para la primera genoteca el pNH305 se transformó junto con en una cepa GLPH077, para la segunda genoteca el pLC81 se transformó en BZ128, y para la tercera genoteca el pEP125 se transformó junto con pAS.033 en la cepa GLPH077. La 1° y 2° genotecas se clasificaron en particular para variantes mejoradas en la formación de ácido ω -hidroxi dodecanoico y la 3° genoteca se clasificó en particular para variantes mejoradas en la formación de ácido ω -hidroxi hexadecenoico. Las genotecas se clasificaron usando uno de los protocolos estándares descritos en lo anterior. Las variantes mejoradas se muestran en las siguientes Tablas 5 a 7 (*infra*). En particular, las variantes de la posición 141 se identificaron muchas veces y se descubrió que son enzimas significativamente mejoradas tanto para el ácido ω -hidroxi-

dodecanoico como la formación de ácido ω -hidroxi hexadecenoico.

Tabla 5: Resumen de las variantes mejoradas de la 1^o genoteca de saturación de sitio del dominio catalítico de cyp153A(G307A)-Red450RhF.

ω -OH	FFA	FAS	Total	% de ω -OH	FFA	FIOC	% de C12:0	ω -OH en C12:0	FIOC	Aminoácidos	Codones
1346.3	2236.6			60.2	1.33			83.1	1.08	V141Q	GTG/CAG
1201.1	2149.3			55.9	1.23			84.1	1.10	D134G	GAC/GGG
1106.2	2006.9			55.1	1.22			82	1.07	R40H	AGG/CAC
1007.9	1839.7			54.8	1.21			86.1	1.12	V141I	GTG/ATC
962.5	1791.2			53.7	1.19			81.1	1.06	K41V	AAG/GTG
1228.6	2298.6			53.4	1.18			80.2	1.05	M419V	ATG/GTC
1046.8	1958.5			53.4	1.18			80.1	1.05	V154A	GTG/GCC
990.7	1865.4			53.1	1.17			84.9	1.11	D134G	GAC/GGT
1203.1	2313.1			52	1.15			81.6	1.07	D134G	GAC/GGG
908.7	1773.2			51.2	1.13			80.3	1.05	I11C	ATT/TGC
1020.1	2057			49.6	1.09			81.4	1.06	R205L	CGC/TTG
1256	2688.4			46.7	1.03			72.6	0.95	L304W	CTC/TGG
883.2	1960.8			45.3	1.00			76.6	1.00		

FIOC: Mejora de veces sobre el control; el control está en negritas

Tabla 6: Resumen de las variantes mejoradas de la 2^o genoteca de saturación de sitio del dominio catalítico de cyp153A(G307A)-Red450RhF

<u>Mutación</u>	<u>Mutación</u>	<u>ω-OH FFA</u>	<u>FAS</u>	<u>% de ω-OH</u>		<u>% de C12:0 ω-OH en C12:0</u>	
<u>1</u>	<u>2</u>	<u>Total</u>	<u>Total</u>	<u>FFA</u>	<u>FIOC</u>	<u>FAS</u>	<u>FIOC</u>
V415R	0	928.10	2880.10	32.23	1.85	33.29	1.96
V415R	0	941.13	2980.97	31.58	1.81	32.98	1.94
V154A	0	694.63	2959.63	23.47	1.35	23.06	1.36
V154A	0	716.00	2963.77	24.16	1.39	23.88	1.40
V154A	0	686.93	2926.97	23.47	1.35	23.40	1.38
V141M	E142Q	717.80	2873.73	24.98	1.44	28.51	1.68
V141I	0	749.07	2971.23	25.21	1.45	31.96	1.88
V141I	0	778.87	2886.77	26.98	1.55	34.27	2.02
V141I	0	754.67	2918.90	25.85	1.49	32.85	1.93
V141I	R258Y	672.13	2909.13	23.10	1.33	29.24	1.72

5	V141I	0	810.23	2912.67	27.83	1.60	35.86	2.11
	S233R	0	720.13	2838.00	25.37	1.46	30.82	1.81
	S233R	0	746.20	2912.97	25.61	1.47	31.15	1.83
	S233N	0	735.57	2905.40	25.33	1.46	25.77	1.52
	S233N	0	698.80	2915.17	23.97	1.38	24.40	1.44
	S233N	0	732.47	2949.93	24.83	1.43	25.29	1.49
	S233N	0	725.97	3018.60	24.05	1.38	24.76	1.46
	R82D	E271F	629.03	2914.83	21.58	1.24	20.90	1.23
	R6F	R178N	792.33	2845.17	27.85	1.60	28.56	1.68
	R6F	V141I	833.13	2871.87	29.01	1.67	36.28	2.13
	R27L	0	742.57	2857.53	25.99	1.49	26.10	1.54
	R178N	0	701.17	2983.60	23.50	1.35	24.98	1.47
	Q129R	0	675.07	2847.37	23.71	1.36	27.97	1.65
	Q129R	0	812.23	3044.30	26.68	1.53	31.29	1.84
	Q129R	0	660.53	2967.23	22.26	1.28	26.24	1.54
10	P149R	S157V	684.03	3011.80	22.71	1.31	23.04	1.36
	P149R	0	771.40	2959.70	26.06	1.50	26.12	1.54
	P149R	0	731.10	2966.13	24.65	1.42	24.75	1.46
	P149R	0	757.97	3014.93	25.14	1.45	25.49	1.50
	P149R	0	765.90	2963.50	25.84	1.49	26.16	1.54
	P149R	0	734.30	2923.70	25.12	1.44	25.50	1.50
	P149R	0	745.00	2993.83	24.88	1.43	25.47	1.50
	P136T	0	724.53	2980.20	24.31	1.40	24.97	1.47
	P136T	0	729.37	3017.67	24.17	1.39	24.90	1.46
	P136T	0	678.33	2850.87	23.79	1.37	24.39	1.43
15	P136C	0	702.27	2947.23	23.83	1.37	25.36	1.49
	P136C	0	689.77	3069.63	22.47	1.29	24.01	1.41
	N407A	0	731.50	3042.77	24.04	1.38	24.56	1.44
	N407A	0	704.47	3015.93	23.36	1.34	23.75	1.40
	M228R	0	344.60	2992.27	11.52	0.66	18.33	1.08
	L168V	0	793.20	2938.23	27.00	1.55	27.84	1.64
	G161P	0	718.33	2938.47	24.45	1.41	24.28	1.43
	G161A	0	639.93	2943.40	21.74	1.25	21.65	1.27
	G138F	N407A	667.93	2825.43	23.64	1.36	26.09	1.53
	F116R	V415R	678.77	2854.97	23.78	1.37	24.14	1.42
20	E142R	0	663.67	2925.83	22.68	1.30	22.86	1.34
	E142R	0	628.03	2930.57	21.43	1.23	21.62	1.27
	E142R	0	639.23	2972.03	21.51	1.24	21.86	1.29
	D153G	0	787.87	3018.90	26.13	1.50	26.94	1.58
	D153G	0	746.20	3039.10	24.55	1.41	25.31	1.49
	0	0	543.65	3117.75	17.44	1.00	17.04	1.00

FIOC: La mejora de veces sobre el control; el control está en negritas

Tabla 7: Resumen de las variantes mejoradas de la tercera genoteca de saturación de sitio del dominio catalítico de cyp153A(G307A)-Red450RhF

ω -OH	Total	% de ω -OH		% de C16:0 ω -OH		% de C16:1 ω -OH			
FFA	FAS	FFA	FIOC	en C16:0	FIOC	en C16:1	FIOC	Aminoácidos	Codones
1298.5	2342.5	55.43	1.53	64.61	1.33	49.02	2.00	N309R	AAC/CGG
1095.9	2374.3	46.16	1.28	58.36	1.20	34.41	1.40	V141G	GTG/GGG
1564	3448.1	45.36	1.25	62.78	1.29	32.88	1.34	L132T	CTC/ACT
1092.9	2391.4	45.70	1.26	60.82	1.25	32.96	1.34	F144R	TTC/AGG
1170.5	2529.6	46.27	1.28	62.41	1.28	31.91	1.30	I131L	ATT/TTG
1232.9	2685.8	45.90	1.27	55.17	1.13	37.63	1.53	G308W	GGC/TGG
931.1	2570.1	36.2	1.00	48.70	1.00	24.53	1.00		

FIOC: La mejora de veces sobre el control; el control está en negritas

EJEMPLO 3: Genotecas de saturación de sitio parciales del dominio reductasa de la proteína de fusión cyp153A(G307A)-Red450RhF

Una genoteca de saturación parcial (se mutó cada 10° de aminoácido) de los dominios reductasa de la proteína de fusión cyp153A-Red450RhF híbrida, se preparó y se clasificó para variantes que mostraron mejoras sobre cyp153A(V141I, A231T, G307A)-Red450RhF (SEQ ID NO: 32), una variante modificada en la genoteca de mutagénesis de saturación de sodio del dominio P450 cyp153A catalítico. Los criterios de selección para los aciertos fueron (1) cantidad incrementada de ácido ω -hidroxi dodecanoico (título ω OH FFA); y/o (2) conversión incrementada de ácido dodecanoico a ácido ω -hidroxi-dodecanoico.

Las técnicas estándares conocidas por aquellas personas de experiencia en el campo se usaron para preparar genotecas de saturación. Para la genoteca, el cyp153A(V141I, A231T, G307A)-Red450RhF que alojan pLC81 se transformó en BZ128. La genoteca se clasificó usando uno de los protocolos estándares descritos en lo anterior. Las variantes mejoradas se muestran en la Tabla 8. En particular las variantes A796V (SEQ ID: 42) y P666A fueron enzimas significativamente mejoradas.

Tabla 8: Resumen de las variantes mejoradas de una genoteca de saturación parcial del dominio reductasa de cyp153A(V141I A231T G307A)-Red450RhF

Mutación	RhF	ω -OH	FFA	FAS	% de ω -OH	FFAFIOC	C12:0 ω -OH en C12:0	FASFIOC
P666K		1012.1	2945.5		34.36	1.09	44.08	1.07
P666A		1575.9	2918.7		53.99	1.71	68.35	1.66
T516E		1150.4	2966.2		38.78	1.23	49.01	1.19
V696K		983.4	2955.4		33.27	1.05	43.02	1.05
0		950.3	3004.6		31.63	1.00	41.13	1.00
A796V		2458.0	3884.7		63.27	1.81	76.58	1.70
0		1363.7	3905.2		34.92	1.00	44.96	1.00

FIOC: La mejora de veces sobre el control; el control está en negritas

EJEMPLO 4: Genoteca de combinación del dominio reductasa de la proteína de fusión cyp153A(G307A)-Red450RhF

Las mutaciones benéficas identificadas en la genoteca de saturación parcial del dominio reductasa (Ejemplo 3) fueron la base de una genoteca de combinación para mejorar adicionalmente la proteína de fusión cyp153A(G307A)-Red450RhF. Los criterios de selección fueron (1) cantidad

incrementada de ácido ω -hidroxi dodecanoico (título ω OH FFA); y/o (2) conversión incrementada de ácido dodecanoico a ácido ω -hidroxi dodecanoico.

La genoteca de combinación se preparó en cyp153A(V141I, A231T, G307A)-Red450RhF que aloja pLC81 (SEQ ID: 32) y se transformó en BZ128. Las técnicas estándares conocidas por aquellas personas de experiencia en el campo se usaron para preparar genotecas de combinación. La genoteca se clasificó usando uno de los protocolos estándares descritos en lo anterior. Las variantes mejoradas se muestran en la siguiente Tabla 9.

Tabla 9: Resumen de las variantes mejoradas de una genoteca de combinación del dominio reductasa de cyp153A(V141I, A231T, G307A)-Red450RhF

Mutación	Mutación RhF	ω -OH		% de ω -OH		% de C12:0 ω -OH en C12:0	
		FFA	FAS	FFA	FIOC	FAS	FIOC
P450	T516G, P666M,						
141I, 231T	A769V	851	983	86.8	1.29	88.3	1.23
	T516G, P666H,						
141I, 231T	A769V	1557	2214	69.2	1.03	73.1	1.02
	T516V, P666D,						
141I, 231T	A769V	1491	1999	74.5	1.11	76.9	1.07
141I, 231T	P666M, V696T	916.88	1125	81.4	1.21	82.9	1.15
141I, 231T	A769V	1528.33	2280	67.1	1.00	71.8	1.00

FIOC: La mejora de veces sobre el control; el control está en negritas

EJEMPLO 5: Genoteca de combinación del dominio catalítico y reductasa de la proteína de fusión cyp153A(G307A)-Red450RhF

Las mutaciones benéficas identificadas en las genotecas

de saturación (Ejemplos 2 y 3) fueron la base de una genoteca de combinación para mejorar adicionalmente la proteína de fusión cyp153A(G307A)-Red450RhF. Los criterios de selección fueron (1) cantidad incrementada de ácido ω -hidroxi dodecanoico (título ω OH FFA); y/o (2) conversión incrementada de ácido dodecanoico a ácido ω -hidroxi dodecanoico. La genoteca de combinación se construyó en pLC81 y se transformó en BZ128. Las técnicas estándares conocidas por aquellas personas de experiencia en el campo se usaron para preparar genotecas de combinación. La genoteca se clasificó usando uno de los protocolos estándares descritos en lo anterior. Las mejores dos variantes mejoradas se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Mejores variantes mejoradas de una genoteca de combinación de cyp153A(G307A)-Red450RhF

15	<u>Mutaciones</u>	<u>SEQ ID</u>	<u>ω-OH FFA*</u>	<u>FAS*</u>	<u>ω-OH FFAC12:0</u>	<u>ω-OH en C12:0</u>	<u>FAS</u>
	R271, R82D, V141M, R178N, N407A	34	2290.3	3665.1	62.4%	74.1%	
	R271, R82D, V141M, R178N, N407A, A796V	44	3499.5	4154.9	84.5%	93.1%	
	* Título (mg/L) después de 48 horas						

EJEMPLO 6: Mutagénesis de saturación de sitio de la posición 141 y 309 de cyp153A(G307A, A796V)-Red450RhF

Se observó que los cambios en la posición 141 influenciaron en la especificidad de sustrato. Por lo tanto, una mutagénesis de saturación de sitio de estas dos posiciones se llevaron a cabo en cyp153A(G307A, A796V)-Red450RhF. Los criterios de selección para los aciertos

fueron (1) cantidad incrementada de ácido ω -hidroxi hexadecenoico; y/o (2) conversión incrementada de ácido hexadecenoico a ácido ω -hidroxi hexadecenoico.

Para la genoteca, el pEP146 que aloja cyp153A(G307A
 5 A796V)-Red450RhF (SEQ ID: 38) se transformó en BZ128. Las técnicas estándares conocida por aquellas personas expertas en el campo se usaron para preparar las genotecas de saturación de sitio. La genoteca se clasificó usando uno de los protocolos estándares descritos en lo anterior. Las
 10 variantes mejoradas se muestran en la Figura 2. En particular, las variantes con V141T (SEQ ID: 46) mostraron un título de ácido ω -hidroxi hexadecenoico más alto y conversión más alta de ácido hexadecenoico.

EJEMPLO 7: Genotecas de saturación de la proteína de fusión

15 cyp153A(G307A) -Red450RhF(A796V)

Una genoteca de saturación completa de la proteína de fusión cyp153A-Red450RhF, se construyó y se clasificó para variantes que muestran mejoras sobre cyp153A(G307A)-Red450RhF(A796V) (*es decir*, el polipéptido de plantilla),
 20 G307A (*es decir*, un residuo de alanina reemplazó una glicina en la posición 307) y A796V (*es decir*, un residuo de valina reemplazó una alanina en la posición 796) son mutaciones benéficas que mejoran la actividad de ω -hidroxilasa de cyp153A (ver lo anterior). Los criterios de selección para

estos aciertos fueron (1) una cantidad incrementada de ácidos grasos ω -hidroxi (título ω -OH FFA); y/o (2) conversión incrementada de ácidos grasos a ácidos grasos ω -hidroxi.

Las técnicas estándares conocidas por aquellas personas de experiencia en el campo se usaron para preparar la genoteca de saturación. El pEP302 se usó para preparar la genoteca de saturación completa, que fue un derivado de pEP146 (ver Tabla 4), en el cual el orden de los genes se alteró (*fatA3-fadB-fadR-cyp153A(G307A)-Red450RhF(A796V)*) y el último en se expresó de un promotor separado. La genoteca se transformó en la cepa stNH1525. Brevemente, el genoma de la cepa base stNH1525 se manipuló como sigue: el gen *fadE* (acil-CoA deshidrogenasa) se suprimió y se sobreexpresó el operón de biosíntesis de ácidos grasos sintéticos. Además la cepa se había sometido previamente a mutagénesis de transposones así como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) y clasificación.

Las genotecas se clasificaron usando uno de los protocolos estándares descritos en lo anterior. Las variantes mejoradas se muestran en la siguiente Tabla 11, en particular, las variantes que mejoraron significativamente la formación de ácido ω -hidroxi hexadecanoico y ω -hidroxi hexadecenoico.

Tabla 11: Resumen de las variantes mejoradas de la genoteca de saturación de sideo de cyp153A(G307A)-Red450RhF(A796V)

	<u>w-OH FFA</u>	<u>FAS Total</u>	<u>% de w-OH</u>		<u>% de C16:1 w-</u>		<u>% de C16:0 w-OH</u>		<u>Amino-</u>	<u>Codones</u>
			<u>FFA</u>	<u>FOIC</u>	<u>OH en C16:1</u>	<u>FOIC</u>	<u>en C16:0</u>	<u>FOIC</u>	<u>ácidos</u>	
5	1201.0	1751.4	68.6	1.8	59.7	2.1	80.1	1.4	D747N	AAC
	1007.7	1733.3	58.1	1.6	50.6	1.9	79.0	1.4	Q12W	TGG
	793.2	1366.8	58.0	1.6	54.4	2.0	77.1	1.3	P327D	GAT
	955.6	1714.9	55.7	1.5	50.6	1.7	74.9	1.3	R14F	TTC
	678.7	1235.6	54.9	1.4	52.6	1.8	73.1	1.3	N61L	TTG
10	855.8	1629.3	52.5	1.4	44.6	1.6	72.9	1.3	R27L	TTG
	911.6	1763.5	51.7	1.4	44.7	1.6	72.3	1.2	Q28M	ATG
	858.1	1678.7	51.1	1.3	46.8	1.6	69.9	1.2	S13K	AAG
	1247.9	2458.5	50.8	1.3	44.3	1.6	67.8	1.2	V771F	TTC
	850.2	1686.3	50.4	1.3	42.1	1.5	71.6	1.2	Q12T	ACG
	810.3	1615.4	50.2	1.3	46.8	1.6	65.0	1.1	K119R	CGG
	821.1	1639.9	50.1	1.3	43.7	1.6	70.1	1.2	D10Y	TAC
	807.4	1676.8	48.2	1.3	40.8	1.4	68.7	1.2	Q12R	AGG
	722.5	1519.4	47.6	1.3	39.3	1.4	68.9	1.2	I11L	TTG
	748.9	1576.6	47.5	1.2	42.4	1.5	66.3	1.1	Q28T	ACG
15	733.8	1546.2	47.5	1.3	38.7	1.4	68.9	1.2	A231Y	TAC
	1198.9	2528.5	47.4	1.2	39.9	1.4	67.5	1.2	P745R	CGC/CGG
	769.8	1647.1	46.7	1.2	38.1	1.4	68.0	1.2	D9N	AAT
	1133.4	2469.6	45.9	1.2	38.1	1.4	65.6	1.1	T770G	GGT
	763.7	1672.4	45.7	1.2	39.0	1.4	63.2	1.1	Y413R	AGG
	1146.2	2514.4	45.6	1.2	37.0	1.3	66.0	1.1	M784I	ATC
	729.8	1610.4	45.3	1.2	36.5	1.3	65.8	1.1	D9K	AAG
	1078.0	2390.8	45.1	1.2	35.7	1.3	66.7	1.1	E749L	TTG
	752.9	1682.8	44.7	1.2	38.1	1.3	63.7	1.1	S233L	TTG
	940.3	2111.2	44.5	1.2	35.9	1.3	65.4	1.1	E757A	GCG
20	1063.1	2405.5	44.2	1.2	35.5	1.3	65.0	1.1	L703G	GGG
	632.5	1434.9	44.1	1.2	37.5	1.3	61.5	1.1	N309S	TCT
	755.7	1715.3	44.1	1.2	35.0	1.3	64.5	1.1	S140N	AAC
	1070.7	2441.3	43.9	1.2	37.6	1.3	60.9	1.0	L706E	GAG
	757.3	1753.4	43.2	1.2	33.7	1.2	65.2	1.1	I480G	GGT
	880.6	2044.0	43.1	1.2	33.6	1.2	65.3	1.1	G481I	ATT
	989.8	2301.4	43.0	1.1	35.0	1.2	62.5	1.1	R719W	TGG
	1062.9	2478.7	42.9	1.1	35.7	1.3	61.1	1.0	L706S	TCG
	906.2	2116.3	42.8	1.1	34.8	1.3	62.5	1.1	E557W	TGG
	734.0	1717.3	42.7	1.1	34.1	1.3	60.6	1.0	S157R	CGG
	651.4	1527.0	42.7	1.1	35.9	1.2	61.1	1.1	S233V	GTC
	710.4	1667.8	42.6	1.1	35.6	1.2	60.6	1.0	A231V	GTA
	663.4	1558.7	42.6	1.1	33.4	1.1	62.1	1.1	A164N	AAC
	664.3	1564.2	42.5	1.1	32.3	1.2	64.7	1.1	A244R	CGG
	711.2	1675.3	42.5	1.1	38.3	1.3	56.0	1.0	T302M	ATG
	1010.3	2381.5	42.4	1.1	34.1	1.2	62.4	1.1	P708S	TCG

5	1015.6	2394.2	42.4	1.1	32.3	1.1	64.9	1.1	N741G	GGG
	690.6	1630.5	42.4	1.1	33.3	1.2	63.0	1.1	P149G	GGG
	656.9	1552.9	42.3	1.1	34.8	1.3	60.9	1.0	V154G	GGC
	905.2	2139.9	42.3	1.1	33.1	1.2	63.6	1.1	E557R	CGG/AGG
	946.6	2247.5	42.1	1.1	32.9	1.2	63.4	1.1	V710Q	CAG
10	1159.1	2753.7	42.1	1.1	32.6	1.2	65.7	1.1	E567S	TCC
	640.8	1522.8	42.1	1.1	34.4	1.3	59.7	1.0	P149R	AGG
	665.7	1587.4	41.9	1.1	33.0	1.2	61.8	1.1	N407G	GGG
	1026.9	2465.0	41.7	1.1	31.7	1.1	63.9	1.1	D544N	AAC
	941.4	2265.1	41.6	1.1	32.5	1.2	62.6	1.1	D709L	CTG
15	721.3	1747.4	41.3	1.1	35.1	1.2	58.3	1.0	G204V	GTT
	985.6	2393.7	41.2	1.1	31.7	1.1	62.7	1.1	V710C	TGT
	696.6	1694.0	41.1	1.1	32.3	1.2	61.5	1.1	R254G	GGG
	664.3	1616.1	41.1	1.1	32.8	1.1	61.1	1.1	P273M	ATG
	739.2	1801.0	41.0	1.1	33.8	1.2	59.9	1.0	F111A	GCG
	1042.8	2540.9	41.0	1.1	31.6	1.1	62.5	1.1	E749M	ATG
	681.8	1661.6	41.0	1.1	30.0	1.1	64.3	1.1	A231W	TGG
	1017.8	2487.3	40.9	1.1	31.1	1.1	63.2	1.1	P546G	GGG
	719.6	1760.1	40.9	1.1	32.2	1.2	60.4	1.0	V162C	TGC
	950.8	2327.9	40.8	1.1	31.8	1.1	61.8	1.1	A736V	GTC
	945.2	2314.2	40.8	1.1	34.2	1.2	58.5	1.0	L706H	CAC
	914.2	2241.1	40.8	1.1	31.4	1.1	62.3	1.1	V710R	AGG
	1055.3	2587.4	40.8	1.1	32.0	1.1	61.2	1.0	D707E	GAG
	883.4	2168.3	40.7	1.1	32.5	1.2	60.7	1.0	D527E	GAG
	921.4	2266.5	40.7	1.1	32.9	1.2	60.3	1.0	P745K	AAG
	728.9	1804.5	40.4	1.1	32.2	1.1	60.3	1.0	E271D	GAC
	1031.5	2558.2	40.3	1.1	30.2	1.1	62.2	1.1	E557R	AGG
	974.6	2429.2	40.1	1.1	30.6	1.1	61.8	1.1	D720V	GTG
	647.6	1616.5	40.1	1.1	30.2	1.1	61.2	1.1	P56Q	CAG
	934.9	2358.1	39.6	1.1	30.6	1.1	61.5	1.1	V648L	TTG
	938.8	2376.0	39.5	1.1	32.0	1.1	58.6	1.0	S649I	ATC
	672.1	1709.2	39.3	1.1	30.5	1.1	59.7	1.0	P477G	GGG
	878.5	2245.0	39.1	1.1	30.2	1.1	60.1	1.1	E591Q	CAG
	598.2	1582.9	37.8	1	28.4	1.0	57.8	1.0		

FIOC: La mejora de veces sobre el control; el control está en negritas

20 Como es evidente para una persona con experiencia en la técnica, varias modificaciones y variaciones de los aspectos anterior y modalidades se pueden hacer sin apartarse del espíritu y alcance de la descripción. Tales modificaciones y variantes están dentro del alcance de esta descripción.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2016/0005882
Recibo: 18-61174
Fecha: 15/08/2018

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 207327
CUS: 361147868

Patente PCT
POLIPÉPTIDOS DE FUSIÓN RELACIONADOS CON OMEGA-HIDROXILASA CON PROPIEDADES
MEJORADAS

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-01	Solicitud examen de patentabilidad Patente de Invención (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 1,053,500	\$ 1,053,500
TOTAL					\$ 1,053,500

P-12637

Nuevo capítulo reivindicatorio

Agosto 15, 2018

REIVINDICACIONES

1. Una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa que comprende de 90% a 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 y tiene al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste de A796V, V141I, V141Q, V141M, V141G, V141L, V141T, A231T, A231Y, A231V, A231W, R27L, R82D, R178N, N309R, N309S, N407A, V415R, T516V, P666A y P666D, en donde dicha variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso a un ácido graso omega-hidroxilado.
2. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de la reivindicación 1, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa es una variante de proteína de fusión cyp153A-RedRhF híbrida.
3. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de la reivindicación 1, que comprende cualquiera de las SEQ ID 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, SEQ ID NO: 46, y SEQ ID NO: 76.
4. Una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de la reivindicación 1 que tiene una mutación en:
 - (a) V141I y A231T, comprendiendo la SEQ ID NO: 32;
 - (b) R27L, R82D, V141M, R178N y N407A, comprendiendo la SEQ ID NO: 34;
 - (c) A796V, comprendiendo la SEQ ID NO: 38;
 - (d) A796V, P666D y T516V, comprendiendo la SEQ ID NO: 40;
 - (e) V141I, A231T y A796V, comprendiendo la SEQ ID NO: 42,
 - (f) R27L, R82D, V141M, R178N, N407A y A796V, comprendiendo la SEQ ID NO: 44, o

(g) V141T, A231T y A796V, comprendiendo la SEQ ID NO: 46.

5. La variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de la reivindicación 4, en donde dicha variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso a un ácido graso omega-hidroxiado.

6. Una célula huésped microbiana recombinante que expresa la variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además expresa un polipéptido tioesterasa de EC 3.1.2., EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14.

7. La célula huésped microbiana recombinante de la reivindicación 6 que comprende además un ácido graso omega-hidroxiado.

8. Un cultivo celular que comprende la célula microbiana recombinante de la reivindicación 7, en donde el ácido graso omega-hidroxiado comprende uno o más ácidos grasos omega-hidroxiados C₁₂, C₁₆ y C_{16:1}.

9. El cultivo celular de la reivindicación 8, en donde el ácido graso omega-hidroxiado comprende:

- (a) un ácido graso C_{16:1} omega-hidroxiado insaturado; o
- (b) un ácido graso C₁₂ omega-hidroxiado saturado.

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

- i. cultivar la célula huésped de la reivindicación 6 con una fuente de carbono de una fuente renovable; y
- ii. recolectar un ácido graso omega-hidroxiado.

11. El método de la reivindicación 10, en donde el ácido graso omega-hidroxiado es un ácido graso omega-hidroxiado saturado.

12. Un microorganismo recombinante para producir un derivado de ácido graso omega-hidroxiado *in vivo* cuando se cultiva en un caldo de fermentación en presencia de

una fuente de carbono de una materia prima renovable, dicho microorganismo comprende una ruta modificada para expresar al menos dos secuencias de ácido nucleico heterólogas 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 CYP153A-reductasa que tiene de 90% a 100% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID 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, SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 76.

13. Una variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa que comprende de 90% a 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 38 y tiene una mutación que 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, en donde dicha variante de polipéptido de fusión híbrido CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso a un ácido graso omega-hidroxilado.