(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 603 952**

(51) Int. CI.:

C12P 7/18 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2013 PCT/EP2013/073107**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2014 WO14079683**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2013 E 13791954 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2922963**

(54) Título: **Procedimiento para producir alfa,omega-dioles a partir de alcanos de C4 o 1-alcanoles de C4 que emplean una CYP153 alcano hidroxilasa**

(30) Prioridad:

20.11.2012 EP 12193378

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2017

(73) Titular/es:

EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE

(72) Inventor/es:

ENGEL, PHILIP;
HAAS, THOMAS;
PFEFFER, JAN CHRISTOPH;
THUM, OLIVER y
GEHRING, CHRISTIAN

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir alfa,omega-dioles a partir de alcanos de C4 o 1-alcanoles de C4 que emplean una CYP153 alcano hidroxilasa

La presente invención se refiere a un método que comprende las etapas de

a) proporcionar un alcano o 1-alcanol,

b) poner en contacto dicho alcano o 1-alcanol en una disolución acuosa con un citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 y oxígeno durante al menos 3 horas,

en el que el alcano o 1-alcanol se convierte en el α,ω-diol correspondiente,

y el alcano o 1-alcanol es butano, isobutano, butanol o isobutanol.

Los alcanos sustituidos, por ejemplo alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y aminas, representan una clase de compuestos industrialmente buscados preparados tradicionalmente mediante conversión de compuestos obtenidos a partir de fuentes de carbono fósiles. En una era de suministros cada vez más restrictivos de combustibles fósiles no renovables, hay un considerable interés en procedimientos biotecnológicos para producir alcanos y derivados de los mismos partiendo de fuentes renovables, es decir, materiales que son fácil y, en términos de escalas de tiempo geológicas, rápidamente reponibles.

En la técnica anterior se han dado a conocer numerosos métodos para convertir un alcano en alcano sustituido, en particular alcanos oxidados. La metano monooxigenasa cataliza la inserción, dependiente de NADH, de un átomo de oxígeno en el enlace C-H excepcionalmente estable de metano para formar metanol, la primera etapa en la degradación de metano mediante metanotrofos tales como *Methylosinus trichosporium* y *Methylococcus capsulatus.* La metano monooxigenasa soluble tiene típicamente un espectro ancho de sustratos, incluyendo hidrocarburos saturados e insaturados, lineales, ramificados, y cíclico, de hasta alrededor de C8, así como compuestos aromáticos, heterocíclicos, y clorados (Merkx M, Kopp DA, Sazinsky MH, Blazyk JL, Müller J, Lippard SJ (2001), Angew Chem Int Ed Engl 40:2782-2807; Higgins IJ, Best DJ, Hammond RC. 1980). Los nuevos hallazgos en bacterias que utilizan metano destacan su importancia en la biosfera y su potencial comercial. Las alcano monooxigenasas dependientes de rubredoxina, tales como la alcano monooxigenasa de *Pseudomonas putida* GPo1, catalizan la oxidación de alcanos de longitudes de cadena medias, produciendo una mezcla de alcoholes y ácidos carboxílicos (Grant C., Woodley, J. M, y Baganz, F (2011) Enzyme and Microbial Technology 48, 480-486).

Sin embargo, aunque los alquilos que tienen dos o más sustituciones son esenciales para muchos usos, por ejemplo como agentes de reticulación en la producción de polímeros industriales, el grado de sustitución que se puede lograr usando tales enfoques biotecnológicos es limitado. Se han dado a conocer muchos sistemas para convertir un alcano en el 1-alcanol correspondiente, pero existen pocos procedimientos biotecnológicos que se puedan usar para producir el α,ω-diol correspondiente, es decir, una cadena de alquilo, en el que los dos átomos de carbono terminales poseen cada uno un grupo hidroxilo. Además, muchas oxidasas tienden a sobreoxidar el sustrato de alcano con el efecto de que aldehídos y ácidos carboxílicos no deseados contaminan el producto de alcohol buscado. Finalmente, la oxidación necesita ser selectiva, queriendo decir que no se deberían de oxidar átomos de carbono alcánicos distintos de los terminales.

El documento de FUJII, T. ET AL.: "Production of alpha,omega-Alkanediols Using Escherichia coli Expressing a Cytochrome P450 from Acinetobacter sp. OC4" (BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY, vol. 70, nº 6, junio de 2006, páginas 1379-1385) describe un método para convertir un alcano de C_5-C_{14} o un 1-alcanol de C_6-C_{12} en el α,ω-diol correspondiente, que comprende poner en contacto dicho alcano o 1-alcanol en una disolución acuosa con una citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 y oxígeno durante 24 horas.

Además, el documento de SCHEPS, D. ET AL.: "Regioselective omega-hydroxylation of medium-chain n-alkanes and primary alcohols by CYP153 enzymes from Mycobacterium marinum and Polaromonas sp. strain JS666" (ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY, vol. 9, nº 19, 7 de octubre de 2011, páginas 6727-6733) describe un método para convertir un alcano de C_5-C_{12} o un 1-alcanol de C_8-C_{12} en el α,ω-diol correspondiente, que comprende poner en contacto dicho alcano o 1-alcanol en una disolución acuosa con un citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 y oxígeno durante 4 horas.

El documento de KOCH, D.J. ET AL.: "In Vivo Evolution of Butane Oxidation by Terminal Alkane Hydroxylases AlkB and CYP153A6" (APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 75, nº 2, enero de 2009, páginas 337-344) describe un método para convertir un C_3-C_8 en el 1-alcanol correspondiente, que comprende poner en contacto dicho en una disolución acuosa con una citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 y oxígeno durante 1 hora.

Por lo tanto, el problema subyacente de la presente invención es proporcionar una ruta biotecnológica hacia la conversión de un alcano o 1-alcanol al α,ω-diol correspondiente, en la que el grado de sobreoxidación esté limitado y/o la reacción sea suficientemente específica, preferiblemente por cuanto los átomos de carbono distintos de los

átomos de carbono terminales no se sustituyan o se sustituyan en menor grado.

El problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante un método que comprende las etapas de

a) proporcionar un alcano o 1-alcanol,

b) poner en contacto dicho alcano o 1-alcanol en una disolución acuosa con una citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 y oxígeno durante al menos 3 horas,

en el que el alcano o 1-alcanol se convierte en el α,ω-diol correspondiente,

y el alcano o 1-alcanol es butano, isobutano, butanol o isobutanol.

En una primera realización, el problema se resuelve mediante un método en el que, además de la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153, está presente una ferredoxina y una ferredoxina reductasa, en el que tanto la ferredoxina como la ferredoxina reductasa son capaces de interaccionar funcionalmente con dicha citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153.

En una segunda realización, el problema se resuelve mediante un método en el que la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 es la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 de *Alcanivorax borkumensis* (código de acceso YP_691921) o una variante de la misma, la ferredoxina es la ferredoxina procedente de *Alcanivorax borkumensis* o una variante de la misma, y la ferredoxina reductasa es la ferredoxina reductasa de *Alcanivorax borkumensis* (código de acceso YP_691923) o una variante de la misma.

En una tercera realización que es también una realización de las realizaciones primera a segunda, el problema se resuelve mediante un método en el que el alcano es butano o isobutano.

En una 4ª realización que es también una realización de las realizaciones primera a tercera, el problema se resuelve mediante un método en el que el alcano o 1-alcanol es butanol o isobutanol.

En una 5ª realización que es también una realización de las realizaciones primera a 4ª, el problema se resuelve mediante un método en el que el alcano es un alcano gaseoso proporcionado a una presión parcial de 1 a 50, preferiblemente 1 a 20, lo más preferible 1 a 10 bares.

En una 6ª realización, que es también una realización de las realizaciones primera a 5ª, el problema se resuelve mediante un método en el que al menos una de las enzimas seleccionada del grupo que comprende la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153, la ferredoxina y la ferredoxina reductasa se proporcionan en forma de un catalizador de célula completa que expresa dicha enzima o enzimas.

En una 7ª realización, que es también una realización de las realizaciones primera a 6ª, el problema se resuelve mediante un método en el que todas las enzimas seleccionadas del grupo que comprende la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153, la ferredoxina y la ferredoxina reductasa se proporcionan en forma de un biocatalizador de célula completa que expresa dichas enzimas.

En una 8ª realización, que es también una realización de las realizaciones primera a 7ª, el problema se resuelve mediante un método en el que al menos una, preferiblemente todas, de las enzimas seleccionadas del grupo que comprende la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153, la ferredoxina y la ferredoxina reductasa son recombinantes y/o están sobreexpresadas, preferiblemente están sobreexpresadas.

En una 9ª realización, que es también una realización de las realizaciones primera a 8ª, el problema se resuelve mediante un método en el que el biocatalizador de célula completa expresa un polipéptido de la familia de AlkL, preferiblemente AlkL de *Pseudomonas putida* (código de acceso CAB69081) o una variante de la misma.

En una 10ª realización, que es también una realización de las realizaciones primera a 9ª, el problema se resuelve mediante un método en el que el biocatalizador de célula completa es una célula procariota, preferiblemente *E. coli*.

La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que se puede usar citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 para convertir un alcano no solo en el 1-alcanol correspondiente, sino también en el α,ω-diol correspondiente.

La presente invención se centra alrededor de un método que comprende la etapa de poner en contacto butano, isobutano, butanol o isobutanol con una citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153. En una realización preferida, la expresión “citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153”, como se usa aquí, se refiere a una citocromo oxidasa citosólica que es naturalmente parte de un sistema de 3 componentes que comprende no solo la oxidasa sino también una ferredoxina y una ferredoxina reductasa, oxidasa la cual tiene un sitio de unión a alcano y es capaz de hidroxilar alcanos. En una realización más preferida, la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 tiene al menos 80, preferiblemente 90, más preferiblemente 95, y lo más preferible 99 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con la citocromo P450 oxidasa de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código de acceso YP_691921), y tiene, además, actividad de alcano hidroxilasa. En otra

realización preferida, la citocromo P450 alcano hidroxilasa tiene, además de dicho grado de identidad de secuencia de aminoácidos, dicho sitio de unión y dicha actividad de alcano hidroxilasa, el motivo de secuencia de aminoácidos LL(I/L)(V/I)GGNDTTRN. Los códigos de las bases de datos citados a lo largo de esta solicitud se refieren a aquellos de la versión en línea de la base de datos de NCBI el 12 de octubre de 2012.

Para proporcionar un suministro de electrones tan eficiente como sea posible desde el agente reductor para sostener la actividad de hidroxilasa de la citocromo P450 alcano hidroxilasa, se prefiere que la alcano hidroxilasa se use en combinación con una ferredoxina reductasa y una ferredoxina que interaccionan funcionalmente con dicha alcano hidroxilasa. La ferredoxina y la ferredoxina reductasa pueden ser polipéptidos aislados, o se pueden coexpresar en el caso de que se use un biocatalizador de célula completa para proporcionar la citocromo P450 alcano hidroxilasa. El hecho de si una ferredoxina reductasa y/o una ferredoxina interaccionan funcionalmente o no con una citocromo P450 alcano hidroxilasa de interés se puede determinar mediante la persona experta en la técnica monitorizando si el agente reductor se oxida más allá de un nivel de fondo en presencia de un sustrato alcánico y los tres polipéptidos, siendo estos últimos preferiblemente polipéptidos aislados. Como alternativa, se puede usar un ensayo enzimático descrito por Scheps, D., Malca, H., Hoffmann, B., Nestl, B. M, y Hauer, B. (2011) Org. Biomol. Chem., 9, 6727, que indica una velocidad de reacción incrementada en el caso de que se usen polipéptidos que interaccionan funcionalmente. En una realización preferida, la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153, la ferredoxina y la ferredoxina reductasa proceden del mismo organismo, más preferiblemente de *Alcanivorax borkumensis* SK2, en cuyo caso los códigos de acceso son YP_691921, YP_691923 y YP_691920, respectivamente.

En una realización preferida, la expresión “poner en contacto”, como se usa aquí, significa provocar el contacto directo entre butano, isobutano, butanol o isobutanol y oxidorreductasa de manera que esta última sea capaz de oxidar al primero. Por ejemplo, la célula y el alcano o 1-alcanol pueden no estar en diferentes compartimentos separados por una membrana tal como una membrana inorgánica impermeable para la célula y el butano, isobutano, butanol o isobutanol. Si el alcano o 1-alcanol es sólido o soluble, simplemente se puede añadir a la oxidorreductasa en una disolución acuosa. Si el alcano o 1-alcanol es gaseoso, la disolución acuosa que comprende la célula se puede rociar con un gas que comprende dicho alcano o 1-alcanol gaseoso.

En el caso de que el alcano o 1-alcanol sea sólido, se puede solubilizar usando disolventes orgánicos adecuados, y después se puede añadir a la disolución acuosa. Los disolventes orgánicos preferidos son disolventes biocompatibles, es decir, disolventes que permiten la viabilidad de la célula usada y/o la actividad de la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 escogida. El disolvente orgánico es un ácido graso que comprende 5 o más, más preferiblemente 8 o más, lo más preferible 12 o más átomos de carbono, o derivados del mismo, tales como ésteres alquílicos. El disolvente orgánico es éster metílico del ácido láurico.

La citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 puede ser una hidroxilasa recombinante. En una realización preferida, la expresión citocromo P450 alcano hidroxilasa “recombinante” de la familia de CYP153, como se usa aquí, significa que el ácido nucleico que codifica la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 no es un ácido nucleico endógeno del organismo usado para expresarla, o no es de hecho endógeno para ningún organismo de tipo natural, sino que se ha obtenido usando ingeniería genética. La persona experta en la técnica está familiarizada con plásmidos adecuados, elementos de ácidos nucleicos, por ejemplo secuencias promotoras, y métodos que se pueden usar para obtener tales plásmidos. Los métodos de biología molecular estándar se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. (Molecular Cloning-A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Aunque en principio se puede usar una cepa de tipo natural que exprese una citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153, se prefiere que la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 se sobreexprese en una cepa recombinante. En una realización preferida, el término “sobreexpresada”, como se usa aquí, significa que la concentración del polipéptido en cuestión, en comparación con su concentración en la célula de tipo natural respectiva, es elevada. La persona experta en la técnica está familiarizada con técnicas que se pueden usar para sobreexpresar una citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153, por ejemplo el uso del sistema pET o pGEX de plásmidos.

La citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 puede ser un polipéptido purificado o aislado. En una realización preferida, el término “purificado”, como se usa aquí, significa que el polipéptido citado como tal es más puro que lo que lo es en el momento de su expresión en una célula. La pureza se puede juzgar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida seguido de tinción con azul de Coomassie del gel producido. En una realización preferida, el polipéptido es más de 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 99 % puro, pero en principio se puede usar en cualquier grado de pureza, desde el lisado celular bruto hasta el polipéptido 100% puro. La persona experta en la técnica está familiarizada con métodos de purificación de proteínas, por ejemplo cromatografía de afinidad, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de filtración en gel.

El alcano o 1-alcanol se pone en contacto con la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 en un entorno compatible con la actividad de la citocromo P450 alcano hidroxilasa. La persona experta en la técnica está familiarizada con parámetros estándar, tales como fuerza iónica, temperatura y composición de amortiguadores acuosos adecuados que necesitan ser considerados con respecto a la actividad enzimática, y es capaz de

determinar condiciones adecuadas dentro del alcance de la experimentación habitual. Las condiciones adecuadas para mantener la actividad de la citocromo P450 alcano hidroxilasa se describen, por ejemplo, en Scheps, D., Malca, H., Hoffmann, B., Nestl, B. M, y Hauer, B. (2011) Org. Biomol. Chem., 9, 6727.

Es esencial que el oxígeno esté presente mientras que se produzca la oxidación del alcano o 1-alcanol catalizada por la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153. Típicamente, la hidroxilasa está en una disolución acuosa, y el oxígeno se introduce agitando la vasija de reacción en condiciones aerobias, es decir, en presencia de oxígeno molecular (O_2). Como alternativa, la disolución se puede rociar con oxígeno molecular puro o mezclas de gases que comprenden oxígeno molecular, preferiblemente además de gases inertes tales como nitrógeno o argón. Si el alcano o 1-alcanol a oxidar es gaseoso en las condiciones contempladas, puede ser parte de tal mezcla. En una realización preferida, la disolución acuosa está en contacto con el aire para proporcionar oxígeno.

En una realización preferida, el oxígeno molecular puede estar presente a una presión parcial que supere la presión atmosférica, preferiblemente medida a temperatura ambiente (25ºC), preferiblemente a más de 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 bares.

Las enseñanzas de la presente invención pueden llevarse a cabo no solo usando macromoléculas biológicas que tienen las secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos exactas citadas explícitamente en esta solicitud, por ejemplo mediante el nombre o número de acceso, o implícitamente, sino también usando variantes de tales secuencias. El término “variante”, como se usa aquí, comprende secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos, respectivamente, que son más de 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idénticas a la secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos de referencia, en el que preferiblemente los aminoácidos distintos de aquellos esenciales para la función, por ejemplo la actividad catalítica de una proteína, o el plegamiento o la estructura de la molécula, se suprimen, sustituyen o reemplazan por inserciones, o los aminoácidos esenciales se sustituyen de manera conservativa. El estado de la técnica comprende algoritmos que se pueden usar para alinear dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos dadas y para calcular el grado de identidad; véanse Arthur Lesk (2008), Introduction to bioinformatics, 3ª edición, Thompson et al., Nucleic Acids Research 22, 4637-4680, 1994, y Katoh et al., Genome Information, 16(1), 22-33, 2005. El término “variante” se usa de forma sinónima e intercambiable con el término “homólogo”. Tales variantes se pueden preparar introduciendo supresiones, inserciones o sustituciones en secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos, así como fusiones que comprenden tales macromoléculas o variantes de las mismas. En una realización preferida, el término “variante”, con respecto a la secuencia de aminoácidos, comprende, preferiblemente además de la identidad de secuencia anterior, secuencias de aminoácidos que comprenden uno o más cambios de aminoácidos conservativos con respecto a la secuencia de referencia o de tipo natural respectiva, o comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos que comprenden uno o más cambios de aminoácidos conservativos. En una realización preferida, el término “variante” de una secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico comprende, preferiblemente además del grado anterior de identidad de secuencia, cualquier porción activa y/o fragmento de la secuencia de aminoácidos o de la secuencia de ácido nucleico, respectivamente, o cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique una porción activa y/o fragmento de cualquier secuencia de aminoácidos. En una realización preferida, la expresión “porción activa”, como se usa aquí, se refiere a una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico que es menor que la secuencia de aminoácidos de longitud completa o codifica menos de la secuencia de aminoácidos de longitud completa, respectivamente, en el que la secuencia de aminoácidos o la secuencia de aminoácidos codificada, respectivamente, retiene al menos algo de su actividad biológica esencial. Por ejemplo, una porción activa y/o fragmento de una proteasa es capaz de hidrolizar enlaces peptídicos en polipéptidos. En una realización preferida, la expresión “retiene al menos algo de su actividad biológica esencial”, como se usa aquí, significa que la secuencia de aminoácidos en cuestión tiene una actividad biológica que excede y es distinta de la actividad de fondo, y los parámetros cinéticos que caracterizan dicha actividad, más específicamente, k_{cat} y K_M, están preferiblemente dentro de 3, más preferiblemente 2, lo más preferible un orden de magnitud de los valores presentados por la molécula de referencia con respecto a un sustrato específico. En una realización preferida, el término “variante” de un ácido nucleico comprende ácidos nucleicos cuya hebra complementaria se hibrida, preferiblemente en condiciones restrictivas, al ácido nucleico de referencia o de tipo natural. La restricción de las reacciones de hibridación es fácilmente determinable por alguien de pericia normal en la técnica, y en general es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, de la temperatura del lavado y de la concentración de sal. En general, sondas más largas requieren mayores temperaturas para la recombinación apropiada, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para volver a recombinarse a hebras complementarias que están presentes en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor es la temperatura relativa que se puede usar. Como resultado, se deduce que mayores temperaturas relativas tenderían a hacer a las condiciones de reacción más restrictivas, mientras que menores temperaturas las harían menos. Para detalles adicionales y explicación de la restricción de las condiciones de hibridación, véase F. M. Ausubel (1995), Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc. Además, la persona experta en la técnica puede seguir las instrucciones dadas en el manual “The DIG System Users Guide for Filter Hybridization”, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania, 1993 y en Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991) sobre cómo identificar secuencias de ADN por medio de la hibridación. En una realización preferida, las condiciones restrictivas se aplican para cualquier hibridación, es decir, la hibridación se produce solamente si la sonda es 70% o más idéntica a la secuencia diana. Las sondas que tienen

un grado menor de identidad con respecto a la secuencia diana se pueden hibridar, pero tales híbridos son inestables y se eliminarán en una etapa de lavado en condiciones restrictivas, por ejemplo reduciendo la concentración de sal hasta 2 x SSC u, opcional y subsiguientemente, hasta 0,5 x SSC, mientras que la temperatura es, a fin de incrementar la preferencia, aproximadamente 50ºC–68ºC, aproximadamente 52ºC–68ºC, aproximadamente 54ºC-68ºC, aproximadamente 56ºC–68ºC, aproximadamente 58ºC–68ºC, aproximadamente 60ºC–68ºC, aproximadamente 62ºC–68ºC, aproximadamente 64ºC–68ºC, aproximadamente 66ºC–68ºC. En una realización particularmente preferida, la temperatura es aproximadamente 64ºC-68ºC o aproximadamente 66ºC-68ºC. Es posible ajustar la concentración de sal hasta 0,2 x SSC, o incluso 0,1 x SSC. Los fragmentos polinucleotídicos que tienen un grado de identidad con respecto a la secuencia de referencia o de tipo natural de al menos 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% se pueden aislar. En una realización preferida, el término "homólogo" de una secuencia de ácido nucleico, como se usa aquí, se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de ácido nucleico de referencia, en línea con la degeneración del código genético.

Como alternativa, la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 se puede proporcionar como un biocatalizador de célula completa en lugar de un polipéptido aislado. En una realización preferida, la expresión "biocatalizador de célula completa", como se usa aquí, se refiere a cualquier célula viable que expresa la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 de una manera que permite poner en contacto esta última con el alcano o 1-alcanol. En una realización preferida, la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 está situada fuera de la célula en la membrana celular exterior, y se expone así a la disolución acuosa que rodea al biocatalizador de célula completa. Como alternativa, la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 se expresa en el interior de la célula, preferiblemente en el citosol de la célula. La persona experta en la técnica está familiarizada con las maneras para generar de forma rutinaria biocatalizadores de células completas; véase, por ejemplo, el documento US 12/742.318.

La conversión de un alcano en un diol usando una citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 expresada por un biocatalizador de célula completa está limitada no solo por la actividad de la hidroxilasa expresada, sino también por la cantidad de sustrato importando al citosol del biocatalizador de célula completa usado. En una realización preferida, el biocatalizador de célula completa expresa, además de la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153, el polipéptido codificado por alkL de *Pseudomonas putida* (código de acceso CAB69081.1) o una variante de la misma, para facilitar la importación del sustrato de alcano. En el documento WO2011/131420 se describen células ejemplares que expresan AlkL y maneras para hacer uso de su capacidad para importar sustratos al citosol de una célula biotecnológicamente relevante.

Si el α,ω-diol no es el producto final buscado, se puede convertir en otros productos aguas abajo, tal como una diamina, usando reacciones catalizadas por catalizadores sintéticos u otras enzimas. En el caso de que se haga uso de otras enzimas, se prefiere que se use un biocatalizador de célula completa que exprese, además de la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153, otras enzimas, por ejemplo una o más del grupo que comprende una transaminasa, una alcohol deshidrogenasa, una alanina deshidrogenasa, y similar. En el documento US 12/742.318 se describen otras enzimas ejemplares.

Si se usa un biocatalizador de célula completa que expresa la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153, y opcionalmente además otras enzimas, el biocatalizador de célula completa se puede modificar adicionalmente para incrementar el rendimiento del producto, por ejemplo mediante supresión o inactivación de enzimas capaces de degradar o metabolizar dicho producto. Por ejemplo, si el producto buscado es un éster, se pueden suprimir o inactivar una o más éster hidrolasas, preferiblemente aquellas endógenas a la célula y codificadas en el genoma de la célula. Además, se puede suprimir o inactivar cualquier oxidasa capaz de sobreoxidar uno o dos de los grupos hidroxilo terminales del $\alpha.\omega$-diol buscado.

Las enseñanzas de la invención se pueden llevar a cabo usando un amplio intervalo de células como biocatalizador de célula completa. En una realización preferida, el término "célula", como se usa aquí, se refiere a cualquier célula permanentemente unicelular que comprende bacterias, arqueas, hongos, algas y similares. En una realización preferida, la célula es una célula bacteriana, más preferiblemente una del grupo que comprende *Pseudomonas, Corynebacterium* y *Escherichia*, lo más preferible *Escherichia coli*. En otra realización preferida, la célula es una eucariota inferior, más preferiblemente un hongo del grupo que comprende *Saccharomyces, Candida, Picchia, Schizosaccharomyces* y *Yarrowia,* y es muy preferiblemente *Saccharomyces cerivisiae.* A lo largo de esta solicitud, el término "célula" se usa de forma sinónima e intercambiable con el término "microorganismo".

La célula puede ser una célula aislada, en otras palabras, un cultivo puro de una única cepa de célula, o puede comprender una mezcla de al menos dos cepas. Las células biotecnológicamente relevantes están disponibles comercialmente de, por ejemplo, la American Type Culture Collection (ATCC) o la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ). Los protocolos para conservar y modificar microorganismos están disponibles en la técnica anterior, por ejemplo Sambrook/Fritsch/Maniatis (1989): Molecular cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Press, 2ª edición, y Fuchs/Schlegel (2007), Allgemeine Mikrobiologie, 2008, Georg Thieme Verlag.

En una realización preferida, el biocatalizador de célula completa usado para llevar a cabo las enseñanzas de la

invención tiene una capacidad reducida de degradación de ácidos grasos. La degradación de ácidos grasos en microorganismos se logra mediante una secuencia de reacciones y sucesos como sigue. En primer lugar, es necesario que los ácidos grasos sean transportados a través de la membrana celular vía un mecanismo de transporte/activación acílica que implica al menos una proteína de la membrana exterior y una proteína asociada a la membrana interior que tiene actividad de ácido graso-CoA ligasa, denominadas en el caso de *E. coli* como FadL y FadD, respectivamente. Dentro de la célula, el ácido graso a degradar se somete a la ruta de β-oxidación. La primera etapa implica la conversión de acil-CoA en enoil-CoA a través de acil-CoA deshidrogenasa, denominada FadE en el caso de *E. coli*. La enoil-CoA resultante se convierte en 3-cetoacil-CoA vía 3-hidroxilacil-CoA a través de hidrogenación y oxidación, catalizadas por enoil-CoA hidratasa/3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, denominada FadE en el caso de *E. coli*. Finalmente, 3-cetoacil-CoA tiolasa, FadA en el caso de *E. coli*, cataliza la escisión de 3-cetoacil-CoA, para dar acetil-CoA y una acil-CoA acortada en dos átomos de carbono. En una realización preferida, la expresión "un microorganismo que tiene una capacidad reducida de degradación de ácidos grasos", como se usa aquí, se refiere a un microorganismo que tiene una capacidad reducida para captar y/o degradar ácidos grasos, preferiblemente aquellos que tienen cadenas de al menos ocho carbonos. La capacidad de degradación de ácidos grasos de un microorganismo se puede reducir de diversas maneras. En una realización preferida, el microorganismo tiene, en comparación con su tipo natural, una actividad reducida de una enzima implicada en la ruta de β-oxidación, por ejemplo una enzima que interacciona directamente con un ácido graso o un derivado del mismo formado como parte de la degradación de dicho ácido graso vía la ruta de β-oxidación, preferiblemente reconociendo el ácido graso o derivado del mismo como un sustrato y convirtiéndolo en un metabolito formado como parte de la ruta de β-oxidación y más próximo a una acetil-CoA en vez de al ácido de longitud completa. En una realización particularmente preferida, este incluye un importador de ácidos grasos, más específicamente cualquier componente de la maquinaria de importación de ácidos grasos. Por ejemplo, la acil-CoA deshidrogenasa es una enzima implicada en la ruta de β-oxidación puesto que interacciona con el éster de ácido graso-CoA y convierte el éster en enoil-CoA, que está más próximo a acetil-CoA que a éster de ácido graso-CoA. En una realización preferida, la expresión "enzima implicada en la ruta de oxidación de ácidos grasos", como se usa aquí, comprende cualquier polipéptido del grupo que comprende importador de ácidos grasos y componentes del mismo, acil-CoA deshidrogenasa, 2,4-dienoil-CoA reductasa, enoil-CoA hidratasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y 3-ceto-acil-CoA tiolasa.

El método de la invención comprende incubar butano, isobutano, butanol o isobutanol en una disolución acuosa en presencia de la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153. Esta etapa puede comprender no solo poner en contacto temporalmente el alcano o 1-alcanol con la disolución, sino de hecho incubar el alcano o 1-alcanol en presencia de la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 durante un tiempo suficientemente largo para permitir que se produzca una reacción de oxidación, por ejemplo durante al menos 3, 4, 5, 10 o 20 horas. La temperatura escogida debe ser tal que la célula de la invención permanezca catalíticamente competente y/o metabólicamente activa, por ejemplo 10 a 42ºC, preferiblemente 30 a 40ºC, lo más preferible 32 a 38ºC en el caso de que la célula sea una célula de *E. coli*.

El alcano o 1-alcanol a oxidar puede ser cualquier alcano o 1-alcanol. El término "alcano", como se usa aquí, se refiere a cualquier compuesto representado por la fórmula C_nH_{2n+2}, en la que n es o es más de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30. El alcano es un cicloalcano representado por la fórmula C_nH_{2n}, en la que n es o es más de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30. El alcano o 1-alcanol es, a temperatura ambiente (25ºC) y presión atmosférica, un alcano o 1-alcanol gaseoso, por ejemplo isobutano. El término "1-alcanol", como se usa aquí, se refiere a cualquier compuesto representado por la fórmula $C_nH_{2n+2}O$, en la que n es o es más de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30. El término "1-alcanol", como se usa aquí, se refiere a cualquier compuesto acíclico representado por la fórmula $C_nH_{2n}O$, en la que n es o es más de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30. El 1-alcanol es un 1-alcanol alifático primario.

Un alcano o 1-alcanol gaseoso se proporciona preferiblemente a una presión parcial, medida preferiblemente a temperatura ambiente (25ºC), que excede la presión atmosférica, por ejemplo a más de 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 bares. La presión combinada total de todos los compuestos gaseosos presentes, por ejemplo oxígeno, alcanos o 1-alcanoles gaseosos y nitrógeno, puede ser más de 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 bares.

La expresión "una disolución acuosa" comprende cualquier disolución que comprende, como disolvente principal, agua, que se puede usar para mantener al biocatalizador de célula completa que expresa la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153, al menos temporalmente, en un estado metabólicamente activo y/o viable, o la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 catalíticamente competente, y comprende, si tal es necesario, cualesquiera sustratos adicionales. La persona experta en la técnica está familiarizada con numerosas disoluciones acuosas, habitualmente denominadas como medios, que se pueden usar para hacer crecer y sostener células, por ejemplo medio LB en el caso de *E. coli*. La disolución acuosa se mantiene en condiciones aerobias. Es ventajoso usar, para células en crecimiento a usar como biocatalizadores de células completas, un medio completo, dado el incremento en la velocidad de crecimiento en comparación con el medio mínimo.

Es ventajoso usar como disolución acuosa para llevar a cabo el método de la invención un amortiguador simple o

medio mínimo, es decir, un medio de composición simple razonable que comprenda solamente el conjunto mínimo de sales y nutrientes indispensables para mantener a la célula en un estado metabólicamente activo y/o viable, en contraste con los medios complejos. Por ejemplo, como medio mínimo, se puede usar medio M9. Si el alcano o 1-alcanol a oxidar tiene solubilidad limitada en agua, se puede añadir a la disolución acuosa un disolvente orgánico o detergente, tal como Tween o Triton, o se puede usar un disolvente hidrófobo para solubilizar el alcano o 1-alcanol a oxidar. La persona experta en la técnica está familiarizada con la preparación de diversas disoluciones acuosas y orgánicas.

La reacción se puede llevar a cabo en un modo discontinuo o en un modo continuo. La persona experta en la técnica está familiarizada con fermentadores y/o vasijas de reacción adecuados.

La Fig. 1 muestra un análisis de GC/MS de los productos formados en el Ejemplo 1, en la que el panel superior muestra el análisis de una muestra normal, en la que el análisis de la muestra mostrado en el panel inferior se lleva a cabo en una muestra a la que se ha añadido como patrón 1,4-butanodiol sintético.

La Fig. 2 muestra la producción de butanol y 1,4-butanodiol en el Ejemplo 1 a lo largo del tiempo.

La Fig. 3 muestra la producción de 1,4-butanodiol en el Ejemplo 2 a lo largo del tiempo.

Ejemplo 1: Oxidación de butano usando W3110 pCOM10[Ab_Fd/CYP153-2/FdOR/alkL] de *E.coli* que expresa la citocromo P450 alcano hidroxilasa de *Alcanivorax borkumensis*

Tres matraces de 100 ml, que comprenden cada uno 25 ml de medio LB suplementado con kanamicina (composición: 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de peptona, 0,5 g/l de NaCl, 50 mg/l de sulfato de kanamicina), se inocularon usando cada 100 ml de criocultivo en glicerol de W3110 pCOM10[Ab_Fd/CYP153-2/FdOR/alkL] de *E. coli*, y se incubaron durante 20 horas a 37ºC y 200 rpm.

Subsiguientemente, se transfirieron cada 25 ml de un medio de cultivo en 75 ml de medio M9 modificado (composición: 15 g/l de glucosa, 6,8 g/l de Na_2PO_4, 3 g/l de KH_2PO_4, 0,5 g/l de NaCl, 2 g/l de NH_4Cl, 15 g/l de extracto de levadura, 0,49 g/l de $MgSO_4*7H_2O$, 50 mg/l de sulfato de kanamicina, 15 ml/l de disolución de oligoelementos US3. La composición de la disolución de oligoelementos US3: 36,5 g/l de ácido clorhídrico al 37%, 1,91 de $MnCl_2*4H_2O$, 1,87 g/l de $ZnSO_4*7H_2O$, 0,84 g/l de Na-EDTA*$2H_2O$, 0,3 g/l de H_3BO_3, 0,25 g/l de $Na_2MoO_4*2H_2O$, 4,7 g/l de $CaCl_2*2H_2O$, 17,3 g/l de $FeSO_4*7H_2O$, 0,15 g/l de $CuCl_2*2H_2O$). Los matraces se incubaron a 37ºC y a 200 rpm durante 2,5 horas. Subsiguientemente, la temperatura se redujo hasta 25ºC. Después de 0,5 horas a 25ºC, el cultivo se indujo usando diciclopropilcetona 0,4 mM. Los cultivos se incubaron durante otras 16 horas a 25ºC y 200 rpm.

Los cultivos se combinaron, se transfirieron a tubos Falcon de 50 ml y se hicieron girar a 5500 g a 25ºC durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó, los peletes de 300 ml de cultivo se resuspendieron en 50 ml de amortiguador de conversión a pH 7 (composición del amortiguador de conversión: 8 g/l de $(NH_4)H_2PO_4$, 0,5 g/l de NaCl, 0,49 g/l de $MgSO_4*7H_2O$, 50 mg/l de sulfato de kanamicina, 15 ml/l de disolución de oligoelementos US3; pH ajustado a 7,0 usando disolución de amoníaco al 25%).

Se montó un fermentador de 300 ml que comprende 130 ml de amortiguador de conversión, pH 7, y aproximadamente 3 gotas de agente reaccionante antiespumante sometido a autoclave (Delamex). El fermentador se suministró con gas a partir de un matraz de gas a presión (presión inicial 4 bares) que comprende una mezcla que consiste en 25% de n-butano y 75% de aire sintético vía un sinterperlator que tiene un tamaño de poros de 0,2 μm y a un caudal de aproximadamente 10 l_N/h. El fermentador se agitó en un baño de agua, y la temperatura del fermentador se ajustó en un baño de agua a 30ºC y se agitó usando un agitador magnético a 900 rpm. El valor del pH se mantuvo a 7,0 usando amoníaco acuoso al 2,5%. Se alimentó continuamente disolución de glucosa (caudal de glucosa a 0,3 g/h). El aire a descartar se transfirió a una botella de lavado enfriada con hielo que comprende 150 ml de agua.

El fermentador se inoculó usando 50 ml de los peletes del precultivo resuspendidos.

La concentración de la biomasa en el fermentador, según se indica mediante la densidad óptica a 600 nm, fue 16. Se retiraron muestras de 10 ml del fermentador y de la botella de lavado en diversos puntos de tiempo. Las muestras del fermentador se hicieron girar durante 10 minutos a 10000 g y a temperatura ambiente, y el sobrenadante se filtró usando un filtro de 0,2 μm.

El análisis de 1-butanol se llevó a cabo cromatográficamente usando HPLC-RID y un sistema de Agilent Technologies 1200. Se usó una columna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm). El sistema se hizo funcionar usando H_2SO_4 10 mM como agente de pasada, a un caudal de 0,6 ml/min. y a una temperatura de columna de 40ºC. Los patrones de todas las sustancias a analizar se prepararon en el agua más pura, y se midieron en condiciones idénticas. El análisis se llevó a cabo comparando los valores de los tiempos de retención.

El análisis de 1,4-butanodiol se llevó a cabo cualitativamente usando GC-MS (TraceGC Ultra/DSQ II de ThermoScientific, columna capilar: 30 m x 0,25 mm ZB-WAX df: 0,259 m, P013). La precipitación de las proteínas de

la muestra se llevó a cabo usando acetona fría (muestra/acetona 1:9). El sobrenadante que se hizo girar se sometió a análisis de GC-MS. Las sustancias se identificaron comparando los espectros medidos y los espectros de las bases de datos. El 1,4-butanodiol se pudo identificar usando su espectro de EI, y se pudo asignar al pico a un tiempo de retención de 19,88 min.

A fin de confirmar la identidad, la muestra se roció usando 10 mg/l de 1,4-butanodiol. La Fig. 1 muestra la cromatografía de corriente de iones para el ion del fragmento característico m/z 71 de 1,4-butanodiol. La concentración de 1,4-butanodiol a 17 mg/l se pudo estimar comparando las áreas de los picos de la muestra rociada y no rociada, considerando el factor de elución (VF = 10).

Ejemplo 2:

Oxidación de 1-butanol a 1,4-butanodiol

Se puede mostrar que la cepa usada en el Ejemplo 1 convierte no solo butano sino también 1-butanol en 1,4-butanodiol.

Cultivo de presiembra: se preparó 1 l de medio LB (5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de peptona, 0,5 g/l de NaCl, disuelto en 1 l de agua, sometido a autoclave durante 20 minutos a 121ºC).

Cada 25 ml de esta disolución se transfirió a tres matraces de 100 ml con pantallas, se complementó con 25 µl de disolución de kanamicina (50 g/l) esterilizada mediante filtración, y se inoculó usando cada 200 ml de un criocultivo en glicerol de W3110 pCOM10[Ab_Fd/CYP153-2/FdOR/alkL] de *E. coli*. Estos cultivos se incubaron a 37ºC y 200 rpm (amplitud 2,5 cm) durante 20 horas.

Cultivo de siembra: se preparó 1 l de medio M9 modificado, que comprende 6,8 g/l de Na_2HPO_4, 3 g/l de KH_2PO_4, 15 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de NaCl, 2 g/l de NH_4Cl, 15 ml de disolución de oligoelementos US3 (1 l de la disolución de oligoelementos US 3 comprende 36,5 g de HCl 37%, 1,91 g de $MnCl_2$ x $4H_2O$, 1,87 g de $ZnSO_4$ x $7H_2O$, 0,84 g de EDTA sódico x $2H_2O$, 0,3 g de H_3BO_3, 0,25 g de Na_2MoO_4 x $2H_2O$, 4,7 g de $CaCl_2$ x $2H_2O$, 17,3 g de $FeSO_4$ x 7 H_2O, 0,15 g de $CuCl_2$, disueltos en 1 l de agua), 1 ml de disolución de ($MgSO_4$ x $7H_2O$) (246,47 g/l), 30 ml de disolución de glucosa (500 g/l). 954 de la disolución que comprende Na_2HPO_4 a NH_4Cl se sometieron a autoclave, los otros componentes se esterilizaron por separado mediante filtración y se añadieron subsiguientemente. El pH fue 6,8.

Se transfirieron 3 x 175 ml del medio M9 modificado a un matraz de agitación de 1000 ml con pantallas, se complementó con 75 µl de una disolución de kanamicina (50 g/l) esterilizada mediante filtración, se inoculó con 25 ml de cultivo de presiembra cada uno, y se incubó durante a 37ºC y 200 rpm (amplitud 2,5 cm). Después de 2,5 h a 37ºC, la temperatura se redujo hasta 25ºC. Después de 0,5 h a 25ºC, los cultivos se indujeron usando DCPK 0,4 mM, y se incubaron a 25ºC durante 16 h adicionales.

Los cultivos de los matraces de agitación se reunieron de manera estéril y se hicieron girar (6000 g, 10 min., 25ºC) en matraces de centrifugación. El sobrenadante se desechó, y los peletes se resuspendieron en 30 ml de amortiguador de fosfato de amonio 70 mM a pH 7 (composición: 8 g/l de $(NH_4)H_2PO_4$, 0,5 g/l de NaCl, 0,49 g/l de $MgSO_4$ x $7H_2O$, 15 ml de disolución de oligoelementos US3 y 50 µg/l de kanamicina; para ajustar el pH se usó NH_4OH al 5%).

Biotransformación:

Se transfirieron 150 ml de amortiguador de fosfato de amonio que comprende aproximadamente 3 gotas de reactivo antiespumante sometido a autoclave (Delamex) a un fermentador de 300 ml estéril. Se introdujo aire al fermentador vía un sinterperlator metálico que tiene un tamaño de poros de 0,2 µm, a un caudal de aproximadamente 10 Nl/h. La temperatura del fermentador se mantuvo a 30ºC usando un baño de agua, y sus contenidos se agitaron usando un agitador magnético a 900 rpm. El aire de salida se hizo pasar a través de una botella de lavado enfriada con hielo que comprende 150 ml de agua.

El fermentador se inoculó usando 30 ml de los peletes de la biomasa resuspendidos vía el tubo que toma la muestra. El pH se mantuvo a 7,0 usando disolución de amoníaco al 2,5%. Se alimentó continuamente, a un caudal de alimentación de 1,12 ml/h, una disolución de alimentación que contiene 30 g/l de glucosa y 50 g/l de 1-butanol.

Se retiró una muestra de 6 ml del fermentador tras 0,2, 2, 4, 7, 22,5, 30,5 y 46,6 horas cada vez. Las muestras se hicieron girar durante 10 minutos a 10000 g y temperatura ambiente, y el sobrenadante se filtró. El análisis cromatográfico se llevó a cabo usando GC-MS. Los patrones de 1,4-butanodiol se prepararon en amortiguador de fosfato de amonio.

En la Fig. 3 se representa la concentración de 1,4-butanodiol a lo largo del tiempo.

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende las etapas de

a) proporcionar un alcano o 1-alcanol,

b) poner en contacto dicho alcano o 1-alcanol en una disolución acuosa con un citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 y oxígeno durante al menos 3 horas,

en el que el alcano o 1-alcanol se convierte en el α,ω-diol correspondiente, y

el alcano o 1-alcanol es butano, isobutano, butanol o isobutanol.

2. El método según la reivindicación 1, en el que el alcano o 1-alcanol se incuba en presencia de una citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 durante al menos 16 horas.

3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que, además de la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153, está presente una ferredoxina y una ferredoxina reductasa, en el que tanto la ferredoxina como la ferredoxina reductasa son capaces de interaccionar funcionalmente con dicha citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153.

4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 es la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153 de *Alcanivorax borkumensis* (código de acceso YP_691921) o una variante de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos que es más de 70% idéntica a YP_691921 y que retiene al menos algo de su actividad biológica esencial, la ferredoxina es la ferredoxina procedente de *Alcanivorax borkumensis* o una variante de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos que es más de 70% idéntica a la ferredoxina de *Alcanivorax borkumensis* y que retiene al menos algo de su actividad biológica esencial, y la ferredoxina reductasa es (código de acceso YP_691923) o una variante de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos que es más de 70% idéntica YP_691923 y que retiene al menos algo de su actividad biológica esencial.

5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el alcano se proporciona a una presión parcial de 1 a 50 bares.

6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que al menos una de las enzimas seleccionadas del grupo que comprende la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153, la ferredoxina y la ferredoxina reductasa se proporciona en forma de un catalizador de célula completa que expresa dicha enzima o enzimas.

7. El método según la reivindicación 6, en el que todas las enzimas seleccionadas del grupo que comprende la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153, la ferredoxina y la ferredoxina reductasa se proporcionan en forma de un biocatalizador de célula completa que expresa dichas enzimas.

8. El método según las reivindicaciones 6 o 7, en el que al menos una de las enzimas seleccionada del grupo que comprende la citocromo P450 alcano hidroxilasa de la familia de CYP153, la ferredoxina y la ferredoxina reductasa son recombinantes y/o están sobreexpresadas.

9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el biocatalizador de célula completa expresa un polipéptido de la familia de AlkL o una variante del mismo que comprende una secuencia de aminoácidos que es más de 70% idéntica al polipéptido de la familia de AlkL y que retiene al menos algo de su actividad biológica esencial.

10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que el biocatalizador de célula completa es una *E. coli*.

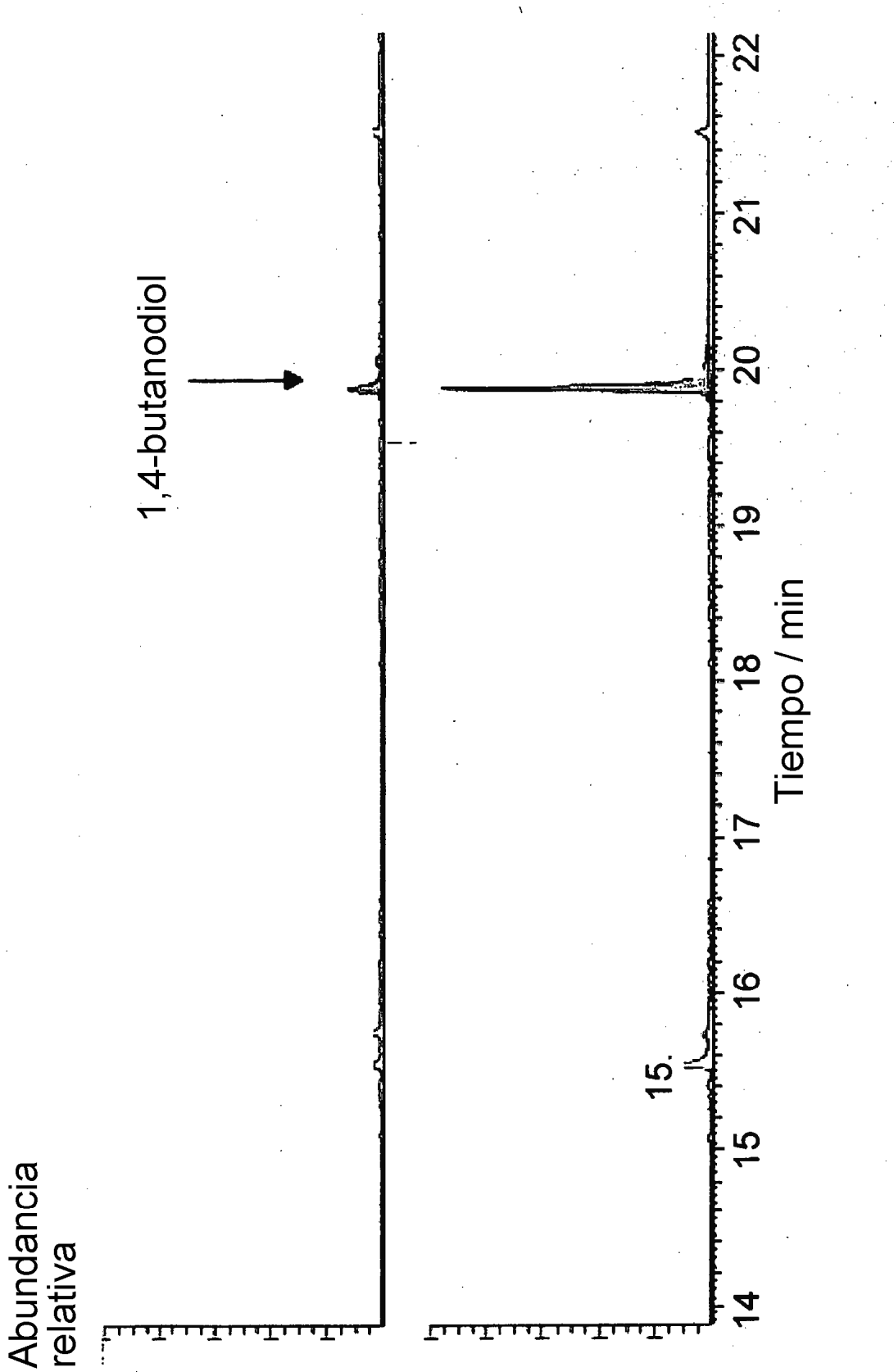
Abundancia relativa
1,4-butanodiol
15.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
Tiempo / min

Fig. 1

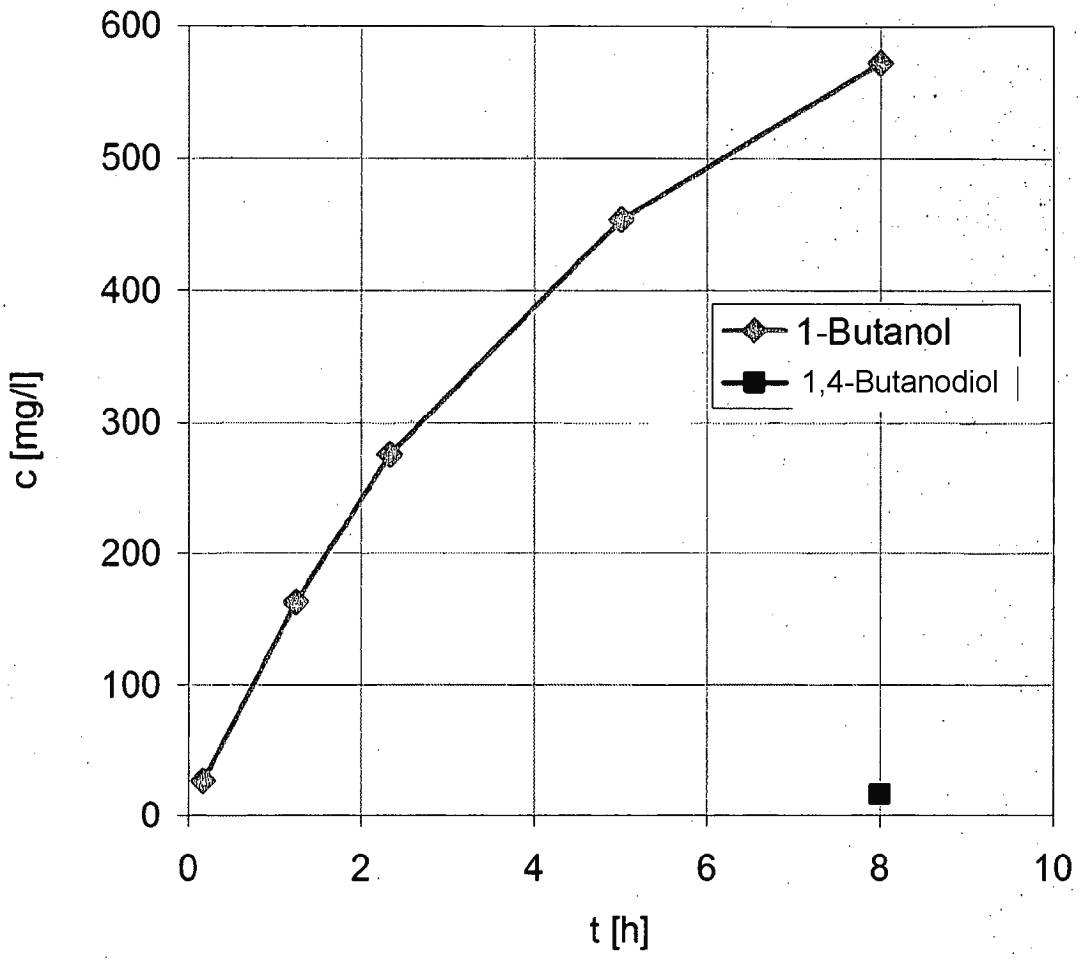
600
500
400
300
200
100
0
c [mg/l]
0
2
4
6
8
10
t [h]
1-Butanol
1,4-Butanodiol

Fig. 2

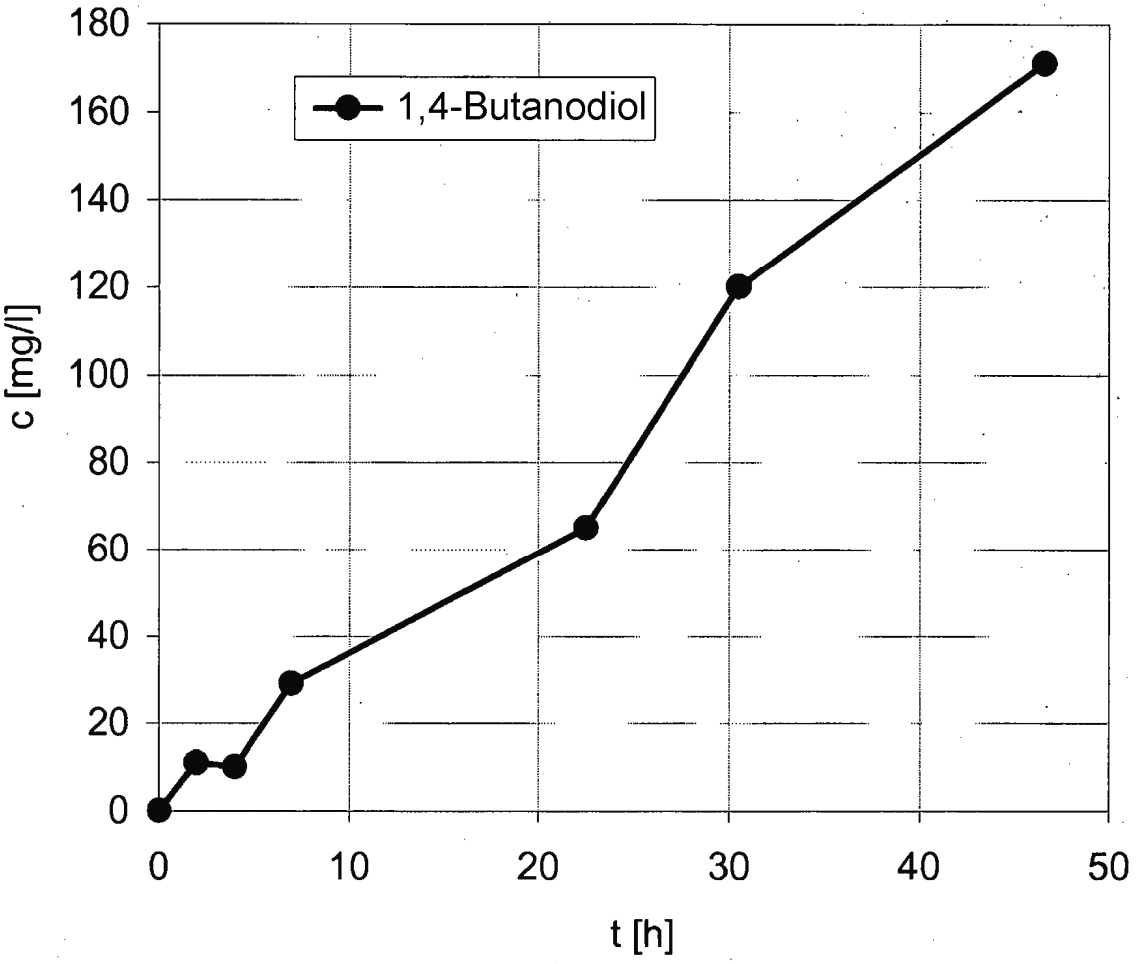
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
c [mg/l]
1,4-Butanodiol
0
10
20
30
40
50
t [h]

Fig. 3