

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 578**

51 Int. Cl.:

C12P 7/18 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2015 PCT/US2015/041031**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16011430**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2015 E 15745054 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 3137614**

54 Título: **Producción microbiana de 1,3-dioles**

30 Prioridad:

18.07.2014 US 201462026573 P

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

18.02.2019

73 Titular/es:

**REG LIFE SCIENCES, LLC (100.0%)
600 Gateway Boulevard
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**SCHIRMER, ANDREAS W.;
HELMAN, NOAH;
WANG, HAIBO;
HU, ZHIHAO;
ARLAGADDA, VIKRANTH;
RAMOS-SOLIS, ALMA ITZEL y
CLARKE, ELIZABETH**

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 700 578 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción microbiana de 1,3-dioles

Lista de secuencias

5 Se ha presentado electrónicamente una lista de secuencias en formato ASCII. Dicha copia ASCII, creada el 17 de julio de 2015, se denomina LS00052PCT_SL.txt y tiene un tamaño de 50.064 bytes.

Campo

10 La invención se refiere a un microorganismo recombinante modificado por ingeniería genética para expresar una secuencia de ácido nucleico que codifica para una tioesterasa y una ácido carboxílico reductasa, y también a un método para producir un 1,3-diol graso que tiene una longitud de cadena de al menos 5 átomos de carbono a partir de una fuente de carbono simple.

Antecedentes

15 Los alcoholes grasos pueden tener muchos usos comerciales como componentes de agentes y procedimientos industriales, particularmente en la producción de detergentes y tensioactivos. Se usan como emulsionantes, emolientes y espesantes en cosméticos y alimentos y como plastificantes y disolventes industriales. Pueden producirse alcoholes grasos a partir de materias primas derivadas de productos petroquímicos u oleoquímicos. Los productos petroquímicos son productos químicos derivados del petróleo. Los productos oleoquímicos son aceites refinados derivados de fuentes naturales tales como grasas vegetales y animales.

20 La ruta química para la obtención de alcoholes grasos consume mucha energía y es medioambientalmente costosa y requiere el uso de reactivos peligrosos. Por ejemplo, puede oligomerizarse etileno usando trietilaluminio seguido por oxidación en aire. Este procedimiento crea alcoholes grasos de número par y se conoce como el procedimiento Ziegler. Alternativamente, puede oligomerizarse etileno para dar mezclas de alquenos, que entonces se someten a hidroformilación, dando como resultado aldehídos de número impar que posteriormente se hidrogenan para dar alcoholes grasos. En otro procedimiento químico, se convierten productos de olefina en aldehídos grasos y luego en alcoholes grasos. Los productos de olefina se obtienen mediante el procedimiento Shell para olefinas superiores que se comercializó en 1977 por Royal Dutch Shell (por ejemplo, produciendo aproximadamente más de un millón de toneladas de olefinas anualmente).

30 La ruta natural para obtener alcoholes grasos, aunque se considera un procedimiento ecológico, todavía es costoso en comparación con la ruta química. Tradicionalmente, los alcoholes grasos se derivaban de ésteres grasos o ésteres de cera, que se extraían originalmente del aceite de esperma de ballenas y más tarde del sebo (por ejemplo, grasa animal procedente de ternera o cordero). Una fuente vegetal alternativa para ésteres de cera es la planta de jojoba. En la actualidad, los alcoholes grasos también pueden producirse a partir de materias primas derivadas de productos oleoquímicos (por ejemplo, aceites vegetales refinados) tales como aceite de colza, aceite de semilla de mostaza, aceite de coco o aceite de palmiste. Tales aceites vegetales están compuestos predominantemente por *triacilgliceroles* (TAG), que contienen glicerol esterificado con tres ácidos grasos (FA). Los diversos usos de los aceites vegetales dependen de la composición de FA de los TAG. Por ejemplo, una alta proporción de ácido láurico (12:0) es necesaria para la producción de jabón, mientras que los aceites ricos en ácido oleico (18:1) están recomendados para cocinar. Los TAG pueden someterse a transesterificación para dar ésteres, que a su vez se hidrogenan para dar alcoholes grasos. Aunque el sebo es principalmente C₁₆-C₁₈, la longitud de cadena de las fuentes vegetales es más variable (por ejemplo, C₆-C₂₄). Pueden obtenerse alcoholes de cadena larga (por ejemplo, C₂₀-C₂₂) a partir de colza o semilla de mostaza, mientras que pueden obtenerse alcoholes grasos medios (por ejemplo, C₁₂-C₁₄) a partir de aceite de coco o palmiste. El aceite de coco y el de palmiste son ricos en ácido láurico (C₁₂) y ácido mirístico (C₁₄). Desde el brote europeo de la encefalopatía esponjiforme bovina (es decir, enfermedad de las vacas locas) en 2000, el sebo se ha reemplazado frecuentemente por ácidos grasos oleicos vegetales, derivados de aceite de palma y aceite de soja.

45 Los dioles grasos o dioles alifáticos son ejemplos de alcoholes grasos y pueden producirse a través de métodos químicos. Por ejemplo, los 1,3-dioles pueden sintetizarse a partir de etileno y cloruros de ácido carboxílico (véase, por ejemplo, Kirchanov *et al.* (1981) Translation from Izvestiya Akademii Nauk SSSR, Seriya Khimicheskaya 4:909-911). Los 1,3-dioles también pueden obtenerse mediante hidratación de cetonas y aldehídos insaturados en α,β , en los que el ceto-alcohol resultante se hidrogena. Otra síntesis química de 1,3-dioles implica la hidroformilación de epóxidos seguido por hidrogenación del aldehído (por ejemplo, obteniendo 1,3-propanodiol a partir de óxido de etileno). Rutas más especializadas para dar 1,3-dioles incluyen la reacción entre un alqueno y un formaldehído y el uso de β -hidroxicetonas. Los 1,3-dioles se han asociado con ser útiles como aditivos alimentarios (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 3.806.615). La configuración 1,3-dihidroxi es responsable de la naturaleza no tóxica de estas entidades químicas.

55 Los 1,3-dioles son bifuncionales y pueden usarse como moléculas de unión entre otras moléculas, por ejemplo en la producción de polímeros. Por ejemplo, se usa un 1,3-propanodiol como monómero en la producción de polímeros. También puede usarse un 1,3-diol graso como precursor para tensioactivos, por ejemplo, un tensioactivo "Gemini"

en que tambos restos de alcohol están modificados químicamente (por ejemplo, etoxilado, glicosilado, sulfatado, etc.). Los restos 3-hidroxilo de los 1,3-dioles grasos también son quirales, lo que los hace útiles como sintones para la producción de compuestos quiralmente importantes tales como monómeros, productos farmacéuticos, productos nutracéuticos, pesticidas, herbicidas, aromas, fragancias, disolventes, y similares.

- 5 Puesto que los dioles grasos son componentes importantes de agentes y procedimientos industriales, sería deseable producirlos en altas cantidades suficientes para cumplir las necesidades industriales, a la vez que se mantiene un menor impacto sobre el medio ambiente.

10 El documento Wang *et al*; Applied and Environmental Microbiology, 2012, páginas 519-527, dan a conocer una nueva estrategia para la producción de polihidroxialcanoatos de longitud de cadena media mediante *E. coli* recombinante.

Peng, en una tesis en la Universidad de Columbia Británica (Vancouver), 2012, se refiere a derivados de beta-cetoácido, posibles productos intermedios de ruta y productos finales.

Sumario

15 Una realización de la invención proporciona un microorganismo recombinante para producir un 1,3-diol graso cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple, incluyendo el microorganismo una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14), y una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42). En un aspecto, el 1,3-diol graso se produce *in vivo*. En otro aspecto, el 1,3-diol graso incluye, pero no se limita a, un 1,3-diol graso C₅, un 1,3-diol graso C₆, un 1,3-diol graso C₇, un 1,3-diol graso C₈, un 1,3-diol graso C₉, un 1,3-diol graso C₁₀, un 1,3-diol graso C₁₁, un 1,3-diol graso C₁₂, un 1,3-diol graso C₁₃, un 1,3-diol graso C₁₄, un 1,3-diol graso C₁₅, un 1,3-diol graso C₁₆, un 1,3-diol graso C₁₇, un 1,3-diol graso C₁₈ y un 1,3-diol graso C₁₉. Todavía en otro aspecto, la fuente de carbono simple se deriva de una materia prima renovable. En una realización, la divulgación proporciona un microorganismo recombinante, en el que el microorganismo incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14), y una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42), y en el que el microorganismo produce un 1,3-diol graso cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple. En otra realización, la secuencia de ácido nucleico es exógena. En otra realización, la secuencia de ácido nucleico incluye una o más secuencia(s) de ácido nucleico.

30 Otra realización de la invención proporciona un microorganismo recombinante para producir un 1,3-diol graso cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple, incluyendo el microorganismo una ruta modificada por ingeniería genética para expresar una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14), y una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42). En un aspecto, el 1,3-diol graso se produce *in vivo*. En otro aspecto, el 1,3-diol graso incluye, pero no se limita a, un 1,3-diol graso C₅, un 1,3-diol graso C₆, un 1,3-diol graso C₇, un 1,3-diol graso C₈, un 1,3-diol graso C₉, un 1,3-diol graso C₁₀, un 1,3-diol graso C₁₁, un 1,3-diol graso C₁₂, un 1,3-diol graso C₁₃, un 1,3-diol graso C₁₄, un 1,3-diol graso C₁₅, un 1,3-diol graso C₁₆, un 1,3-diol graso C₁₇, un 1,3-diol graso C₁₈ y un 1,3-diol graso C₁₉. Todavía en otro aspecto, la fuente de carbono simple se deriva de una materia prima renovable. En una realización, la divulgación proporciona un microorganismo recombinante que tiene una ruta modificada por ingeniería genética para expresar una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14), y una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42), en el que dicho microorganismo produce un 1,3-diol graso cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple. En otra realización, la secuencia de ácido nucleico es exógena. En otra realización, la secuencia de ácido nucleico incluye una o más secuencia(s) de ácido nucleico.

45 Otra realización de la invención proporciona un microorganismo recombinante para producir un 1,3-diol graso cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple, estando el microorganismo modificado por ingeniería genética para expresar una o más secuencia(s) de ácido nucleico que codifican(n) para un polipéptido que tiene una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14), una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42), y opcionalmente una actividad alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.). En un aspecto, el 1,3-diol graso se produce *in vivo*. En otro aspecto, el 1,3-diol graso incluye, pero no se limita a, un 1,3-diol graso C₅, un 1,3-diol graso C₆, un 1,3-diol graso C₇, un 1,3-diol graso C₈, un 1,3-diol graso C₉, un 1,3-diol graso C₁₀, un 1,3-diol graso C₁₁, un 1,3-diol graso C₁₂, un 1,3-diol graso C₁₃, un 1,3-diol graso C₁₄, un 1,3-diol graso C₁₅, un 1,3-diol graso C₁₆, un 1,3-diol graso C₁₇, un 1,3-diol graso C₁₈ y un 1,3-diol graso C₁₉. Todavía en otro aspecto, la fuente de carbono simple se deriva de una materia prima renovable. En una realización, la divulgación proporciona un microorganismo recombinante modificado por ingeniería genética para expresar una o más secuencia(s) de ácido nucleico que codifican(n) para un polipéptido que tiene una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14), una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42) y una actividad alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.), en el que dicho microorganismo es para producir un 1,3-diol graso cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple. En otra realización, la una o más secuencia(s) de ácido nucleico son exógenas.

Otra realización de la invención proporciona un microorganismo recombinante para producir un 1,3-diol graso cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple, incluyendo el microorganismo una ruta modificada por ingeniería genética para expresar una o más secuencia(s) de ácido nucleico que codifican(n) para un polipéptido que tiene una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14), una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42), y opcionalmente una actividad alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.). En un aspecto, el 1,3-diol graso se produce *in vivo*. En otro aspecto, el 1,3-diol graso incluye, pero no se limita a, un 1,3-diol graso C₅, un 1,3-diol graso C₆, un 1,3-diol graso C₇, un 1,3-diol graso C₈, un 1,3-diol graso C₉, un 1,3-diol graso C₁₀, un 1,3-diol graso C₁₁, un 1,3-diol graso C₁₂, un 1,3-diol graso C₁₃, un 1,3-diol graso C₁₄, un 1,3-diol graso C₁₅, un 1,3-diol graso C₁₆, un 1,3-diol graso C₁₇, un 1,3-diol graso C₁₈ y un 1,3-diol graso C₁₉. Todavía en otro aspecto, la fuente de carbono simple se deriva de una materia prima renovable. En una realización, la divulgación proporciona un microorganismo recombinante que tiene una ruta modificada por ingeniería genética para expresar una o más secuencia(s) de ácido nucleico que codifican(n) para un polipéptido que tiene una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14), una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42) y una actividad alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.), en el que dicho microorganismo produce un 1,3-diol graso cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple. En otra realización, la una o más secuencia(s) de ácido nucleico son exógenas.

Otra realización de la invención proporciona un microorganismo recombinante, tal como se define en las reivindicaciones, para producir un 1,3-diol graso cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple, en el que la fuente de carbono simple se deriva de una materia prima renovable.

Otra realización de la invención proporciona un microorganismo recombinante para producir un 1,3-diol graso cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple, en el que el microorganismo expresa una o más secuencia(s) de ácido nucleico que codifican(n) para un polipéptido que tiene una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14), y una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42). En una realización, la tioesterasa incluye, pero no se limita a, fatB1, TE_EEI82564, TE_CAD63310, phaG y tesA. En otra realización, la ácido carboxílico reductasa es carB. Todavía en otra realización, la una o más secuencia(s) de ácido nucleico son exógenas.

Otra realización de la invención proporciona un microorganismo recombinante para producir un 1,3-diol graso cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple, incluyendo el microorganismo una ruta modificada por ingeniería genética para expresar una o más secuencia(s) de ácido nucleico que codifican(n) para un polipéptido que tiene una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14), y una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42). En una realización, la tioesterasa incluye, pero no se limita a, fatB1, TE_EEI82564, TE_CAD63310, phaG y tesA. En otra realización, la ácido carboxílico reductasa es carB. Todavía en otra realización, la una o más secuencia(s) de ácido nucleico son exógenas.

Otra realización de la invención proporciona un microorganismo recombinante para producir un 1,3-diol graso cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple, en el que el microorganismo expresa una o más secuencia(s) de ácido nucleico que codifican(n) para un polipéptido que tiene una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14), una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42) y una actividad alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.). En una realización, la tioesterasa incluye, pero no se limita a, fatB1, TE_EEI82564, TE_CAD63310, phaG y tesA. En otra realización, la ácido carboxílico reductasa es carB. Todavía en otra realización, la alcohol deshidrogenasa es alrA. Aún en otra realización, la una o más secuencia(s) de ácido nucleico son exógenas.

Otra realización de la invención proporciona un microorganismo recombinante para producir un 1,3-diol graso cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple, incluyendo el microorganismo una ruta modificada por ingeniería genética para expresar una o más secuencia(s) de ácido nucleico que codifican(n) para un polipéptido que tiene una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14), una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42) y una actividad alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.). En una realización, la tioesterasa incluye, pero no se limita a, fatB1, TE_EEI82564, TE_CAD63310, phaG y tesA. En otra realización, la ácido carboxílico reductasa es carB. Todavía en otra realización, la alcohol deshidrogenasa es alrA. Aún en otra realización, la una o más secuencia(s) de ácido nucleico son exógenas.

La divulgación engloba además un cultivo celular que incluye un microorganismo recombinante, tal como se define en las reivindicaciones, para producir un 1,3-diol graso cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple. El microorganismo está modificado por ingeniería genética para expresar una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14), y una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42). En otra realización, el microorganismo está modificado por ingeniería genética para expresar una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14), una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42) y una actividad alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.-). El cultivo celular produce 1,3-dioles grasos que tienen una longitud de cadena de al menos 5 átomos de carbono. Por ejemplo, el cultivo celular produce un 1,3-diol graso que incluye un 1,3-diol graso C₅, un 1,3-diol graso C₆, un 1,3-diol graso C₇, un 1,3-diol graso C₈, un 1,3-diol graso C₉, un 1,3-diol graso C₁₀, un 1,3-diol graso C₁₁, un 1,3-diol graso C₁₂, un 1,3-diol graso C₁₃, un 1,3-diol graso C₁₄, un 1,3-diol graso C₁₅, un 1,3-diol graso C₁₆, un 1,3-diol graso C₁₇, un 1,3-diol graso C₁₈, un 1,3-diol graso

C₁₉ y similares. En una realización, la secuencia de ácido nucleico es exógena. En otra realización, la secuencia de ácido nucleico incluye una o más secuencia(s) de ácido nucleico.

Otra realización de la invención proporciona un método de producción de un 1,3-diol graso que incluye proporcionar un microorganismo recombinante en un caldo de fermentación, expresando el microorganismo una o más secuencia(s) de ácido nucleico que codifican(n) para un polipéptido que tiene una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14), una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42), y opcionalmente una actividad alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.-); y aislar un 1,3-diol graso de dicho caldo de fermentación. En una realización, el método incluye además añadir una fuente de carbono simple al caldo de fermentación. Aún en otra realización, la fuente de carbono simple se deriva de una materia prima renovable. En otra realización, la invención proporciona un método de producción de un 1,3-diol graso que incluye proporcionar un microorganismo recombinante en un caldo de fermentación, estando el microorganismo modificado por ingeniería genética para expresar una o más secuencia(s) de ácido nucleico que codifican(n) para un polipéptido que tiene una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14); y una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42); y aislar un 1,3-diol graso del caldo de fermentación. En un aspecto, el 1,3-diol graso incluye, pero no se limita a, un 1,3-diol graso C₅, un 1,3-diol graso C₆, un 1,3-diol graso C₇, un 1,3-diol graso C₈, un 1,3-diol graso C₉, un 1,3-diol graso C₁₀, un 1,3-diol graso C₁₁, un 1,3-diol graso C₁₂, un 1,3-diol graso C₁₃, un 1,3-diol graso C₁₄, un 1,3-diol graso C₁₅, un 1,3-diol graso C₁₆, un 1,3-diol graso C₁₇, un 1,3-diol graso C₁₈ y un 1,3-diol graso C₁₉. En una realización, el método incluye además añadir una fuente de carbono simple al caldo de fermentación. Aún en otra realización, la fuente de carbono simple se deriva de una materia prima renovable.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un microorganismo recombinante para producir un 1,3-diol graso cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple, expresando el microorganismo una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una actividad acil-ACP reductasa (EC 1.2.1.80 o EC 1.2.1.42). En un aspecto, el 1,3-diol graso se produce *in vivo*. En otro aspecto, el diol graso incluye, pero no se limita a, un 1,3-diol graso C₅, un 1,3-diol graso C₆, un 1,3-diol graso C₇, un 1,3-diol graso C₈, un 1,3-diol graso C₉, un 1,3-diol graso C₁₀, un 1,3-diol graso C₁₁, un 1,3-diol graso C₁₂, un 1,3-diol graso C₁₃, un 1,3-diol graso C₁₄, un 1,3-diol graso C₁₅, un 1,3-diol graso C₁₆, un 1,3-diol graso C₁₇, un 1,3-diol graso C₁₈ y un 1,3-diol graso C₁₉. En una realización, la secuencia de ácido nucleico es exógena.

Todavía otro aspecto de la divulgación proporciona un microorganismo recombinante para producir un 1,3-diol graso cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple, expresando el microorganismo una o más secuencia(s) de ácido nucleico que codifican(n) para un polipéptido que tiene una actividad acil-ACP reductasa (EC 1.2.1.80 o EC 1.2.1.42), y una actividad alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.-). En un aspecto, el 1,3-diol graso se produce *in vivo*. En otro aspecto, el diol graso incluye, pero no se limita a, un 1,3-diol graso C₅, un 1,3-diol graso C₆, un 1,3-diol graso C₇, un 1,3-diol graso C₈, un 1,3-diol graso C₉, un 1,3-diol graso C₁₀, un 1,3-diol graso C₁₁, un 1,3-diol graso C₁₂, un 1,3-diol graso C₁₃, un 1,3-diol graso C₁₄, un 1,3-diol graso C₁₅, un 1,3-diol graso C₁₆, un 1,3-diol graso C₁₇, un 1,3-diol graso C₁₈ y un 1,3-diol graso C₁₉. En una realización, la una o más secuencia(s) de ácido nucleico son exógenas.

La divulgación contempla además un cultivo celular que incluye un microorganismo recombinante para producir un 1,3-diol graso cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple, estando el microorganismo modificado por ingeniería genética para expresar una o más secuencia(s) de ácido nucleico que codifican(n) para un polipéptido que tiene una actividad acil-ACP reductasa (EC 1.2.1.80 o EC 1.2.1.42), y opcionalmente una actividad alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.-). En un aspecto, el cultivo celular produce 1,3-dioles grasos. En otro aspecto, el diol graso incluye, pero no se limita a, un 1,3-diol graso C₅, un 1,3-diol graso C₆, un 1,3-diol graso C₇, un 1,3-diol graso C₈, un 1,3-diol graso C₉, un 1,3-diol graso C₁₀, un 1,3-diol graso C₁₁, un 1,3-diol graso C₁₂, un 1,3-diol graso C₁₃, un 1,3-diol graso C₁₄, un 1,3-diol graso C₁₅, un 1,3-diol graso C₁₆, un 1,3-diol graso C₁₇, un 1,3-diol graso C₁₈ y un 1,3-diol graso C₁₉. En una realización, la una o más secuencia(s) de ácido nucleico son exógenas.

Aún en otro aspecto, la divulgación engloba un método de producción de un 1,3-diol graso que incluye proporcionar un microorganismo recombinante en un caldo de fermentación, estando el microorganismo modificado por ingeniería genética para expresar una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una actividad acil-ACP reductasa (EC 1.2.1.80 o EC 1.2.1.42); y aislar un 1,3-diol graso del caldo de fermentación. En una realización, el microorganismo expresa además una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene una actividad alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.-). En otra realización, el método incluye además añadir una fuente de carbono simple al caldo de fermentación. Aún en otra realización, la fuente de carbono simple se deriva de una materia prima renovable. El método produce un diol graso que incluye, pero no se limita a, un 1,3-diol graso C₅, un 1,3-diol graso C₆, un 1,3-diol graso C₇, un 1,3-diol graso C₈, un 1,3-diol graso C₉, un 1,3-diol graso C₁₀, un 1,3-diol graso C₁₁, un 1,3-diol graso C₁₂, un 1,3-diol graso C₁₃, un 1,3-diol graso C₁₄, un 1,3-diol graso C₁₅, un 1,3-diol graso C₁₆, un 1,3-diol graso C₁₇, un 1,3-diol graso C₁₈ y un 1,3-diol graso C₁₉.

En una realización, la invención engloba además la secreción y recuperación de 1,3-dioles grasos de un microorganismo tal como se define en las reivindicaciones. En una realización, los 1,3-dioles grasos se secretan en el caldo de fermentación. En otra realización, los 1,3-dioles grasos se recuperan por medio de separación de aceite-agua tal como por medio de sedimentación por gravedad, centrifugación, decantación, o similares.

Todavía otro aspecto de la divulgación da a conocer el uso de dioles grasos en la producción de tensioactivos, incluyendo etoxilatos y similares.

La divulgación se refiere además a 1,3-dioles grasos quirales, a sus enantiómeros y mezclas quirales.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 representa una ruta a modo de ejemplo para obtener 1,3-dioles, incluyendo funcionalidades enzimáticas.
- La figura 2 representa una ruta a modo de ejemplo para obtener 1,3-dioles, que proporciona ejemplos de funcionalidades enzimáticas para fines ilustrativos.

La figura 3 muestra una ruta alternativa para obtener 1,3-dioles, incluyendo funcionalidades enzimáticas.

- 10 La figura 4 muestra un cromatograma de CG/EM de un extracto de una cepa de *E. coli* recombinante que expresa TE_EEI82564 y CarB. Todas las muestras se derivatizaron con BSTFA + TMCS al 1%. El pico (1) es 1,3-octanol derivatizado y el pico (2) es 1,3-decanol derivatizado.

La figura 5 muestra los espectros de masas del pico 1 y el pico 2 derivatizados de la figura 4, que se derivan de cepas de *E. coli* recombinante que expresan TE_EEI82564 y CarB. El agente de derivatización fue BSTFA + TMCS al 1%.

- 15 La figura 6 ilustra el patrón de fragmentación iónica de 1,3-decanodiol derivatizado con BSTFA + TMCS al 1%.

La figura 7 muestra la composición de 1,3-dioles (Diol) y alcoholes grasos (FALC) producidos por una cepa de *E. coli* recombinante que expresa TE_CAD63310 y CarB.

En las figuras 8-11 se usan las siguientes abreviaturas:

FAS – Biosíntesis de ácidos grasos/ácido graso sintasa

- 20 TE - tioesterasa

ACS - acil CoA sintasa

TL - 3-cetoacil CoA tiolasa (reversible)

(S)3HACS - (S)-3-hidroxi-acil CoA deshidrogenasa (reversible)

(S)2ECOH - (S)-2-enoil CoA hidratasa/(S)-3-hidroxilacil CoA deshidratasa

- 25 CAR - ácido carboxílico reductasa

FAR - acil graso CoA/ACP reductasa y acil graso CoA/ACP reductasa de formación de alcohol graso

ACR - acil CoA reductasa AAR - acil ACP/CoA reductasa

- 30 La figura 8 representa rutas bioquímicas que conducen a 1,3-dioles grasos a partir de acil-ACP. La ruta 1 usa funcionalidades enzimáticas tales como TE, CAR y ADH para producir 1,3-dioles. La ruta 2 usa TE, ACS, ACR y ADH para producir 1,3-dioles. La ruta 3 usa AAR y ADH para producir 1,3-dioles. La ruta 4 usa FAR y ADH para producir 1,3-dioles. La ruta 5 usa FAR para producir 1,3-dioles.

- 35 La figura 9 representa rutas bioquímicas que conducen a 1,3-dioles grasos a partir de acil-CoA. La ruta 1 usa funcionalidades enzimáticas tales como TE, CAR y ADH para producir 1,3-dioles. La ruta 2 usa ACR y ADH para producir 1,3-dioles. La ruta 3 usa AAR y ADH para producir 1,3-dioles. La ruta 4 usa FAR y ADH para producir 1,3-dioles. La ruta 5 usa FAR para producir 1,3-dioles.

La figura 10 muestra la producción de (R)-1,3-diol graso. La ruta 1 usa funcionalidades enzimáticas tales como TE, CAR y ADH para producir 1,3-dioles quirales dextrógiros. La ruta 2 usa TE, ACR y ADH para producir 1,3-dioles quirales dextrógiros. La ruta 3 usa AAR y ADH para producir 1,3-dioles quirales dextrógiros. La ruta 4 usa FAR y ADH para producir 1,3-dioles quirales dextrógiros. La ruta 5 usa FAR para producir 1,3-dioles quirales dextrógiros.

- 40 La figura 11 muestra la producción de (S)-1,3-diol graso. La ruta 1 usa funcionalidades enzimáticas tales como TE, CAR y ADH para producir 1,3-dioles quirales levógiros. La ruta 2 usa ACR y ADH para producir 1,3-dioles quirales levógiros. La ruta 3 usa AAR y ADH para producir 1,3-dioles quirales levógiros. La ruta 4 usa FAR y ADH para producir 1,3-dioles levógiros. La ruta 5 usa FAR para producir 1,3-dioles quirales levógiros. La ruta 6 usa TE, ACS, FadE y (S)2ECOH para producir 1,3-dioles quirales levógiros. La ruta 7 usa ácidos grasos y ACS para producir 1,3-dioles quirales levógiros. La ruta 8 usa TE, ACS, TL y (S)3HACS para producir 1,3-dioles quirales levógiros.
- 45

Descripción detallada

Visión general

El desarrollo de un método nuevo y respetuoso con el medio ambiente para la producción de dioles grasos proporciona una mejora para la industria. El método permite la producción de dioles grasos a partir de una fuente de carbono simple que se deriva de una materia prima renovable incluyendo, pero sin limitarse a, hidratos de carbono procedentes de maíz, caña de azúcar, gas natural o biomasa lignocelulósica; productos residuales tales como residuos sólidos municipales, glicerol, gas de combustión, gas de síntesis, dióxido de carbono; o las corrientes de carbono que resultan de la nueva formación de materiales orgánicos tales como biomasa, gas natural u otros materiales carbonosos. El método permite además la producción de dioles grasos a partir de CO₂ y luz mediante organismos fotosintéticos, tales como cianobacteria y algas. Este método es mejor para el medio ambiente porque no produce los subproductos tóxicos que generan los procedimientos derivados de productos petroquímicos.

Más específicamente, la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, proporciona microorganismos recombinantes que están modificados por ingeniería genética para convertir una fuente de carbono simple derivada de una materia prima renovable en dioles grasos. Los 1,3-dioles son ejemplos de dioles grasos que son entidades químicas estables que son incoloras e inodoras. Se espera que los 1,3-dioles producidos de manera microbiana tengan muchas aplicaciones industriales, incluyendo como componentes de detergentes, tensioactivos, emulsionantes, emolientes, disolventes, plásticos, aromas, fragancias y compuestos bioactivos. Los 1,3-dioles producidos de manera microbiana también encontrarán uso en la industria alimentaria como sustitutos de (o aditivos de) alimentos naturales porque se metabolizan fácilmente, no son tóxicos, no son volátiles y son altamente energéticos con una vida útil de almacenamiento larga.

Los microorganismos recombinantes de la presente invención se usan en procedimientos de fermentación para la producción de dioles grasos que tienen una longitud de cadena de al menos 5 átomos de carbono. En el presente documento, la divulgación engloba metabolismos de ácidos grasos microbianos y la conversión de sus productos intermedios en 1,3-dioles. Una ventaja de la presente invención es un método de producción más limpio, es decir, empleando un procedimiento de fermentación sencillo. El uso de materias primas renovables protege el medio ambiente porque se basa en materiales de partida renovables y sostenibles que no agotan recursos naturales. El uso de productos residuales industriales (por ejemplo, glicerol) como materias primas respalda mejor el tratamiento y reciclado de residuos. Otra ventaja es la opción de fabricar productos objetivo industriales novedosos, es decir, composiciones de diol graso con longitudes de cadena selectivas, quiralidades y en mezclas específicas o en combinación con derivados.

Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, los términos "1,3-diol graso" o "1,3-diol" o "1,3-dialcohol" o "3-OH alcohol graso" o "3-hidroxialcohol graso" o "1,3-dihidroxialcohol" o "1,3-diol alifático" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a una entidad química que tiene una longitud de cadena de al menos 5 carbonos y que se origina a partir de metabolismos de ácidos grasos microbianos por medio de productos intermedios de tioéster de acil-graso y tiene al menos dos grupos OH, es decir, un grupo OH en la posición 1 y un grupo OH en la posición 3 de su cadena de carbonos.

Un "1,3-diol" tal como se menciona en el presente documento se produce mediante un microorganismo recombinante o una célula huésped microbiana recombinante.

Una "composición de 1,3-diol" normalmente incluye al menos un 1,3-diol en combinación con otro componente.

El término "número de clasificación de enzimas (EC)" se refiere a un número que indica una secuencia específica de polipéptido o enzima. Los números de EC clasifican las enzimas según la reacción que catalizan. Los números de EC se establecen mediante el comité de nomenclatura de la unión internacional de bioquímica y biología molecular (IUBMB), cuya descripción está disponible en el sitio web de nomenclatura de enzimas del IUBMB en la red informática mundial.

El término "tioesterasa" se refiere a una actividad enzimática que se caracteriza por el número de EC 3.1.2.14 o el número de EC 3.1.1.5 o el número de EC 3.1.2.-.

El término "ácido carboxílico reductasa (CAR)" se refiere a una actividad enzimática que se caracteriza por el número de EC 6.2.1.3 o el número de EC 1.2.1.42 o el número de EC 1.2.99.6.

Los términos "aldehído reductasa" y "alcohol deshidrogenasa" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a una actividad enzimática que se caracteriza por el número de EC 1.1.-.-.

El término "acil-ACP reductasa (AAR)" se refiere a una actividad enzimática que se caracteriza por el número de EC 1.2.1.80 o el número de EC 1.2.1.42.

El término "acetil-CoA carboxilasa" se refiere a una actividad enzimática que se caracteriza por el número de EC 6.4.1.2.

Los términos “número de registro” y “número de registro de NCBI” y “número de registro de GenBank” se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un número que indica una secuencia específica de ácido nucleico. Los números de registro de secuencia que se comentan en esta descripción se obtuvieron de bases de datos proporcionadas por el NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) mantenida por los Institutos Nacionales de Salud, EE.UU., y de las bases de datos de conocimiento UniProt (UniProtKB) y Swiss-Prot proporcionadas por el Instituto Suizo de Bioinformática (también denominado número de registro de Uni-ProtKB).

Tal como se usa en el presente documento, el término “nucleótido” se refiere a una unidad monomérica de un polinucleótido que consiste en una base heterocíclica, un azúcar y uno o más grupos fosfato. Las bases que se producen de manera natural (guanina, (G), adenina, (A), citosina, (C), timina, (T) y uracilo (U)) normalmente son derivados de purina o pirimidina, aunque debe entenderse que también se incluyen análogos de bases que se producen de manera natural y no natural. El azúcar que se produce de manera natural es la pentosa (azúcar de cinco carbonos) desoxirribosa (que forma ADN) o ribosa (que forma ARN), aunque debe entenderse que también se incluyen análogos de azúcar que se producen de manera natural y no natural. Los ácidos nucleicos normalmente están unidos por medio de uniones fosfato para formar ácidos nucleicos o polinucleótidos, aunque se conocen en la técnica muchas otras uniones (por ejemplo, fosforotioatos, boranofosfatos, y similares).

Tal como se usa en el presente documento, el término “polinucleótido” se refiere a un polímero de ribonucleótidos (ARN) o desoxirribonucleótidos (ADN), que pueden ser monocatenarios o bicatenarios y que pueden contener nucleótidos no naturales o alterados. Los términos “polinucleótido”, “secuencia de ácido nucleico” y “secuencia de nucleótidos” se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, o bien ARN o bien ADN. Estos términos se refieren a la estructura primaria de la molécula, y por tanto incluyen ADN mono y bicatenario y ARN mono y bicatenario. Los términos incluyen, como equivalentes, análogos de o bien ARN o bien ADN compuestos por análogos de nucleótidos y polinucleótidos modificados tales como, aunque sin limitarse a, polinucleótidos metilados y/o tapados. El polinucleótido puede estar en cualquier forma, incluyendo pero sin limitarse a, plásmido, viral, cromosómico, EST, ADNc, ARNm y ARNr.

Los términos “polinucleótido endógeno” y “ADN endógeno” y “secuencia de ácido nucleico endógena” se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a ADN que se origina dentro de la célula huésped.

Los términos “polinucleótido exógeno” y “ADN exógeno” y “secuencia de ácido nucleico exógena” se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a ADN que se origina fuera de la célula huésped. Por ejemplo, un gen de la célula huésped A puede insertarse en la célula huésped B. Sin embargo, un gen que se origina a partir de la célula huésped A puede manipularse o modificarse (dentro o fuera de la célula huésped A) y volver a insertarse dentro de la misma célula huésped A.

Los términos “polinucleótido modificado” y “ADN modificado” y “secuencia de ácido nucleico modificada” se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a ADN que se ha alterado en alguna forma en relación con su estado original o natural. Esta alternación puede afectar a la estabilidad, expresión, actividad o función del ADN o su producto génico codificado (por ejemplo, polipéptido o proteína). En una realización, la expresión del polipéptido codificado está aumentada. En otra realización, la expresión del polipéptido codificado está disminuida. En otra realización, la expresión del polipéptido codificado está ausente.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “polipéptido” y “proteína” y “secuencia de polipéptido” y “secuencia de proteína” se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un polímero de residuos de aminoácido. El término “polipéptido recombinante” se refiere a un polipéptido que se produce mediante técnicas recombinantes, en las que generalmente se inserta ADN o ARN que codifica para la proteína expresada en un vector de expresión adecuado que a su vez se usa para transformar una célula huésped para producir el polipéptido.

Tal como se usa en el presente documento, el término “homólogo” se refiere a un polinucleótido o un polipéptido que comprende una secuencia que es idéntica en al menos aproximadamente el 50% a la secuencia de polinucleótido o polipéptido correspondiente. Preferiblemente, los polinucleótidos o polipéptidos homólogos tienen secuencias de polinucleótido o secuencias de aminoácidos que tienen una homología de al menos aproximadamente el 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o al menos aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos o secuencia de polinucleótido correspondiente. Tal como se usa en el presente documento, los términos “homología” de secuencia e “identidad” de secuencia se usan de manera intercambiable. Un experto habitual en la técnica conocerá métodos para determinar la homología entre dos o más secuencias. Brevemente, pueden realizarse cálculos de “homología” entre dos secuencias tal como sigue. Las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en uno o ambos de un primer y un segundo aminoácido o secuencia de ácido nucleico para la alineación óptima y pueden ignorarse las secuencias no homólogas para fines de comparación). En una realización preferida, la longitud de una primera secuencia que está alineada para fines de comparación es de al menos aproximadamente el 30%, preferiblemente al menos aproximadamente el 40%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 50%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 60%, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos

aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95% o aproximadamente el 100% de la longitud de una segunda secuencia. Entonces se comparan los residuos de aminoácido o nucleótidos en posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótidos correspondientes de las secuencias primera y segunda. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de homología entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias puede llevarse a cabo usando un algoritmo matemático, tal como BLAST (Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215(3): 403-410). El porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG, usando o bien una matriz Blossum 62 o bien una matriz PAM250, y un valor de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un valor de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 (Needleman y Wunsch, (1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-453). El porcentaje de homología entre dos secuencias de nucleótidos también puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz NWSgapdna. CMP y un valor de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un valor de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. Un experto habitual en la técnica puede realizar cálculos de homología iniciales y ajustar los parámetros del algoritmo en consecuencia. Un conjunto de parámetros preferido (y el que debe usarse si un médico no está seguro sobre qué parámetros deben aplicarse 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 hueco de 12, una penalización por extensión de hueco de 4, y una penalización de hueco de desplazamiento de marco de 5. Se conocen métodos adicionales de alineación de secuencia en las técnicas de biotecnología (véase, por ejemplo, Rosenberg (2005) *BMC Bioinformatics* 6:278); Altschul *et al.* (2005) *FEBS J.* 272(20): 5101-5109).

Un péptido “endógeno” se refiere a un polipéptido codificado por el genoma de la célula huésped (por ejemplo, célula microbiana parental) del que se deriva o se modifica por ingeniería genética la célula recombinante.

Un polipéptido “exógeno” se refiere a un polipéptido que no se codifica originalmente por el genoma de la célula microbiana parental o huésped (por ejemplo, la célula huésped). Un polipéptido variante (es decir, mutante) es un ejemplo de un polipéptido exógeno. Otro ejemplo de un polipéptido exógeno es una proteína que se produce en la célula nativa pero que es el resultado de expresión alterada, por ejemplo, expresión de un polinucleótido exógeno (por ejemplo, un vector o plásmido que contiene un gen idéntico a un gen nativo, pero modificado por ingeniería genética para sobreexpresarse en la célula huésped; un gen de este tipo puede insertarse opcionalmente en el ADN del huésped).

El término “heterólogo” generalmente significa derivado de una especie diferente o derivado de un organismo diferente o derivado de una fuente diferente. Tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de nucleótidos o una secuencia de polipéptido que no está presente de manera natural en un organismo particular. Expresión heteróloga significa que una proteína o polipéptido se expresa en una célula que normalmente no expresa esa proteína. Como tal, heterólogo significa que una proteína transferida inicialmente se derivaba de un tipo de célula diferente o una especie diferente o una fuente diferente que el receptor. Por ejemplo, puede introducirse una secuencia de polinucleótido endógena para una célula vegetal en una célula huésped bacteriana mediante métodos recombinantes, y el polinucleótido vegetal es entonces un polinucleótido heterólogo en una célula huésped bacteriana recombinante. Otro ejemplo de un polipéptido heterólogo es una proteína que se produce en la célula nativa pero que es el resultado de expresión alterada, por ejemplo, expresión de un polinucleótido heterólogo (por ejemplo, un vector o plásmido que contiene un gen idéntico a un gen nativo, pero modificado por ingeniería genética para sobreexpresarse en la célula huésped; un gen de este tipo puede insertarse opcionalmente en el ADN del huésped).

Tal como se usa en el presente documento, el término “fragmento” de un polipéptido se refiere a una parte más corta de un polipéptido o una proteína de longitud completa cuyo tamaño oscila entre cuatro residuos de aminoácido y toda la secuencia de aminoácidos menos un residuo de aminoácido. En determinadas realizaciones de la divulgación, un fragmento se refiere a toda la secuencia de aminoácidos de un dominio de un polipéptido o una proteína (por ejemplo, un dominio de unión a sustrato o un dominio catalítico).

Tal como se usa en el presente documento, el término “mutagénesis” se refiere a un procedimiento mediante el cual se cambia la información genética de un organismo de manera estable. La mutagénesis de una secuencia de ácido nucleico que codifica para proteína produce una proteína mutante. Mutagénesis también se refiere a cambios en secuencias de ácido nucleico no codificantes que dan como resultado actividad de proteína modificada.

Tal como se usa en el presente documento, el término “gen” se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican para o bien un producto de ARN o bien un producto de proteína, así como secuencias de ácido nucleico operativamente unidas que afectan a la expresión del ARN o la proteína (por ejemplo, tales secuencias incluyen pero no se limitan a secuencias promotoras o potenciadoras) o secuencias de ácido nucleico operativamente unidas que codifican para secuencias que afectan a la expresión del ARN o la proteína (por ejemplo, tales secuencias incluyen pero no se limitan a sitios de unión al ribosoma o secuencias de control de la traducción).

Se conocen en la técnica secuencias de control de la expresión e incluyen, por ejemplo, promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores de la transcripción, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), y similares, que proporcionan la expresión de la secuencia de polinucleótido en una célula huésped. Las secuencias de control de la expresión interactúan específicamente con proteínas celulares implicadas en la transcripción (Maniatis *et al.* (1987) *Science* 236:1237-1245). Se describen secuencias de control de la expresión a modo de ejemplo, por ejemplo, en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

El término "pluralidad" se refiere a al menos 2 en número (por ejemplo, una pluralidad de secuencias de polinucleótido significa al menos dos secuencias de polinucleótido).

En los métodos de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, una secuencia de control de la expresión está operativamente unida a una secuencia de polinucleótido. Por "operativamente unida" quiere decirse que una secuencia de polinucleótido y una(s) secuencia(s) de control de la expresión se conectan de tal manera que se permita la expresión génica cuando se unen las moléculas apropiadas (por ejemplo, proteínas activadoras de la transcripción) a la(s) secuencia(s) de control de la expresión. Están ubicados promotores operativamente unidos en el sentido de 5' de la secuencia de polinucleótido seleccionada en cuanto a la dirección de transcripción y traducción. Pueden estar ubicados potenciadores operativamente unidos en el sentido de 5', dentro de o en el sentido de 3' del polinucleótido seleccionado.

Tal como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico, es decir, una secuencia de polinucleótido, a la que se ha unido. Un tipo de vector útil es un episoma (es decir, un ácido nucleico que puede realizar replicación extracromosómica). Los vectores útiles son aquellos que pueden realizar replicación y/o expresión autónoma de los ácidos nucleicos a los que se unen. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes a los que se unen operativamente se denominan en el presente documento "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de "plásmidos", que se refieren en general a bucles de ADN bicatenario circular que, en su forma de vector, no se unen al cromosoma. Los términos "plásmido" y "vector" se usan de manera intercambiable en el presente documento, en la medida en que un plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. Sin embargo, también se incluyen otras de tales formas de vectores de expresión que sirven para funciones equivalentes y que se han conocido en la técnica posteriormente al presente documento. En algunas realizaciones, un vector recombinante comprende además un promotor unido operativamente a la secuencia de polinucleótido. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor regulado por el desarrollo, uno específico de orgánulo, uno específico de tejido, uno inducible, uno constitutivo o uno específico de célula. El vector recombinante normalmente comprende al menos una secuencia que incluye (a) una secuencia de control de la expresión acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótido; (b) un marcador de selección acoplado operativamente a la secuencia de polinucleótido; (c) una secuencia de marcador acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótido; (d) un resto de purificación acoplado operativamente a la secuencia de polinucleótido; (e) una secuencia de secreción acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótido; y (f) una secuencia de selección como diana acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótido. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos se incorpora de manera estable en el ADN genómico de la célula huésped, y la expresión de la secuencia de nucleótidos está bajo el control de una región promotora regulada. Los vectores de expresión descritos en el presente documento incluyen una secuencia de polinucleótido descrita en el presente documento en una forma adecuada para la expresión de la secuencia de polinucleótido en una célula huésped. Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que va transformarse, el nivel de expresión del polipéptido deseado, etc. Los vectores de expresión descritos en el presente documento pueden introducirse en células huésped para producir polipéptidos, incluyendo polipéptidos de fusión, codificados por las secuencias de polinucleótido tal como se describe en el presente documento. La expresión de genes que codifican para polipéptidos en procariotas, por ejemplo, *E. coli*, se lleva a cabo con la mayor frecuencia con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de polipéptidos o bien de fusión o bien de no fusión. Los vectores de fusión añaden varios aminoácidos a un polipéptido codificado en los mismos, habitualmente al extremo amino terminal o carboxilo terminal del polipéptido recombinante. Tales vectores de fusión sirven normalmente para uno o más de los tres propósitos siguientes: (1) aumentar la expresión del polipéptido recombinante; (2) aumentar la solubilidad del polipéptido recombinante; y (3) ayudar en la purificación del polipéptido recombinante actuando como ligando en purificación por afinidad. A menudo, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y el polipéptido recombinante. Esto permite la separación del polipéptido recombinante del resto de fusión después de la purificación del polipéptido de fusión. En determinadas realizaciones, una secuencia de polinucleótido de la divulgación está operativamente unida a un promotor derivado del bacteriófago T5. En determinadas realizaciones, la célula huésped es una célula de levadura, y el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari *et al.* (1987) *EMBO J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan *et al.* (1982) *Cell* 30: 933-943), pJRY88 (Schultz *et al.* (1987) *Gene* 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corp., San Diego, CA) y picZ (Invitrogen Corp., San Diego, CA). En otras realizaciones, la célula huésped 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 proteínas en células de insecto en cultivo (por ejemplo, células Sf9) incluyen, por ejemplo, la serie de pAc (Smith *et al.* *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165 (1983)) y la

serie de pVL (Lucklow *et al.* (1989) *Virology* 170:31-39 (1989)). En aún otra realización, las secuencias de polinucleótido descritas en el presente documento pueden expresarse en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero. Se conocen bien en la técnica otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procariontas como eucariotas; véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989).

Tal como se usa en el presente documento, el término "acil-CoA" se refiere a un tioéster de acilo formado entre el carbono de carbonilo de la cadena de alquilo y el grupo sulfhidrilo del resto 4'-fosfopantetionilo de la coenzima A (CoA), que tiene la fórmula R-C(O)S-CoA, en la que R es cualquier grupo alquilo que tiene al menos 4 átomos de carbono.

Tal como se usa en el presente documento, "acil-ACP" se refiere a un tioéster de acilo formado entre el carbono de carbonilo de una cadena de alquilo y el grupo sulfhidrilo del resto fosfopanteteinilo de una proteína transportadora de acilo (ACP). El resto fosfopanteteinilo se une de manera postraduccional a un residuo de serina conservado en la ACP mediante la acción de la proteína sintasa transportadora de holo-acilo (ACPS), una fosfopanteteinilo transferasa que usa coenzima A como sustrato y el donador de fosfopanteteinilo. En algunas realizaciones, una acil-ACP es un producto intermedio en la síntesis de acil-ACP totalmente saturadas. En otras realizaciones, una acil-ACP es un producto intermedio en la síntesis de acil-ACP insaturadas. En algunas realizaciones, la cadena de carbonos tendrá aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ó 26 carbonos. Cada una de estas acil-ACP son sustratos para enzimas que las convierten en derivados de ácido graso. Tal como resulta evidente para un experto, el resto 4'-fosfopantetionilo de holo-ACP se deriva de la coenzima A. Por tanto, las enzimas que utilizan acil-ACP como sustrato a menudo tienen alguna actividad para acil CoA y las enzimas que utilizan acil-CoA como sustrato a menudo tienen alguna actividad para acil-ACP.

Tal como se usa en el presente documento, el término "ruta de biosíntesis de ácidos grasos" significa una ruta de biosíntesis que produce ácidos grasos, tioésteres de ácidos grasos y/o derivados de los mismos. La ruta de biosíntesis de ácidos grasos puede incluir enzimas o polipéptidos adicionales con actividades enzimáticas además de las comentadas en el presente documento para producir derivados de ácidos grasos que tienen características deseadas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "clon" normalmente se refiere a una célula o un grupo de células que descienden de y son esencialmente idénticas de manera genética a un único ancestro común, por ejemplo, las bacterias de una colonia bacteriana clonada surgida a partir de una única célula bacteriana

Tal como se usa en el presente documento, el término "cultivo" se refiere normalmente a un medio líquido que comprende células viables. En una realización, un cultivo comprende células que se reproducen en medios de cultivo predeterminados en condiciones controladas, por ejemplo, un cultivo de células huésped recombinantes hechas crecer en medios líquidos que comprenden una fuente de carbono y nitrógeno seleccionada. "Cultivar" o "cultivo" se refieren al crecimiento de una población de células huésped microbianas en condiciones adecuadas en un medio líquido o sólido. En realizaciones particulares, cultivar se refiere a la bioconversión fermentativa de un sustrato en un producto final. Se conocen bien medios de cultivo y los componentes individuales de tales medios de cultivo están disponibles de fuentes comerciales, por ejemplo, con las marcas comerciales Difco™ y BBL™. En un ejemplo no limitativo, el medio de nutrientes acuoso es un "medio rico" que comprende fuentes complejas de nitrógeno, sales y carbono, tal como el medio YP, que comprende 10 g/l de peptona y 10 g/l de extracto de levadura de un medio de este tipo. La célula huésped de un cultivo puede modificarse por ingeniería genética adicionalmente para asimilar el carbono eficazmente y usar materiales celulósicos como fuentes de carbono según los métodos descritos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses 5.000.000; 5.028.539; 5.424.202; 5.482.846; 5.602.030; documento WO 2010127318. Además, en algunas realizaciones la célula huésped se modifica por ingeniería genética para expresar una invertasa de modo que puede usarse sacarosa como fuente de carbono.

Tal como se usa en el presente documento, el término "en condiciones eficaces para expresar una secuencia de polinucleótido modificada genéticamente por ingeniería genética" significa cualquier condición que permita que una célula huésped exprese la funcionalidad enzimática correspondiente con el fin de producir un derivado de ácido graso deseado tal como un diol graso. Las condiciones adecuadas incluyen, por ejemplo, condiciones de fermentación.

El término "microorganismo recombinante" se refiere a una célula huésped que se ha modificado genéticamente o modificado por ingeniería genética de modo que determinadas actividades enzimáticas dentro de la célula huésped se han alterado, añadido y/o delecionado en relación con la célula parental o célula huésped nativa. Una célula huésped modificada genéticamente o modificada por ingeniería genética es un ejemplo de un microorganismo recombinante. Como tal, un "nivel modificado o alterado de actividad de una proteína", por ejemplo una enzima, en una célula huésped recombinante se refiere a una diferencia en una o más características en la actividad determinada en relación con la célula huésped parental o nativa en que está ausente la misma modificación. Normalmente, las diferencias en la actividad se determinan entre una célula huésped recombinante, que tiene actividad modificada, y la célula huésped silvestre correspondiente (por ejemplo, la comparación de un cultivo de una célula huésped recombinante en relación con la célula huésped silvestre correspondiente), que no tiene la actividad modificada. Las actividades modificadas pueden ser el resultado de, por ejemplo, cantidades modificadas

de proteína expresadas por una célula huésped recombinante (por ejemplo, como resultado del número aumentado o disminuido de copias de secuencias de ADN que codifican para la proteína, el número aumentado o disminuido de transcritos de ARNm que codifican para la proteína, y/o las cantidades aumentadas o disminuidas de traducción de proteína de la proteína a partir de ARNm); cambio en la estructura de la proteína (por ejemplo, cambios en la estructura primaria, tal como, cambios en la secuencia codificante de la proteína que dan como resultado cambios en la especificidad de sustrato, cambios en los parámetros cinéticos observados); y cambios en la estabilidad de la proteína (por ejemplo, degradación aumentada o disminuida de la proteína). En algunas realizaciones, el polipéptido es un mutante o una variante de cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento, siempre que se encuentre dentro de las reivindicaciones. En determinados casos, las secuencias codificantes para los polipéptidos descritos en el presente documento se someten a optimización de codones para la expresión en una célula huésped particular. Por ejemplo, para la expresión en *E. coli*, pueden optimizarse uno o más codones (tal como se describe en, por ejemplo, Grosjean *et al.* (1982) *Gene* 18:199-209). El microorganismo recombinante de la invención produce un 1,3-diol que tiene una longitud de cadena de al menos 5 átomos de carbono.

El término “secuencias reguladoras” tal como se usa en el presente documento se refiere normalmente a una secuencia de bases en ADN, operativamente unida a secuencias de ADN que codifican para una proteína que controla en última instancia la expresión de la proteína. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras de ARN, secuencias de unión a factor de transcripción, secuencias de terminación de la transcripción, moduladores de la transcripción (tales como elementos potenciadores), secuencias de nucleótidos que afectan a la estabilidad del ARN y secuencias reguladoras de la traducción (tales como sitios de unión al ribosoma (por ejemplo, secuencias de Shine-Dalgarno en procariotas o secuencias de Kozak en eucariotas), codones de iniciación, codones de terminación).

Los términos “nivel alterado de expresión” y “nivel modificado de expresión” se usan de manera intercambiable y significan que está presente un polinucleótido, polipéptido, metabolito o producto (por ejemplo, un derivado de ácido graso) en una concentración diferente en una célula huésped modificada por ingeniería genética en comparación con su concentración en una célula silvestre correspondiente en las mismas condiciones. Los ejemplos de derivados de ácidos grasos son ácidos grasos, 3-hidroxiácidos grasos, aldehídos grasos, 3-hidroxialdehídos grasos, alcoholes grasos, 1,3-dioles grasos y similares.

Tal como se usa en el presente documento, el término “título” se refiere a la cantidad de un derivado de ácido graso tal como, por ejemplo, un diol graso (por ejemplo, 1,3-diol) producido por volumen unitario de cultivo de células huésped, y generalmente se notifica en unidades de masa/volumen, por ejemplo, 10 g/l. El título puede referirse a un 1,3-diol particular o a una combinación de 1,3-dioles producidos por un cultivo de células huésped recombinante dado. El título también puede referirse a una composición de diol graso (por ejemplo, composición de 1,3-diol) producida por un cultivo de células huésped recombinante dado.

Tal como se usa en el presente documento, el “rendimiento de dioles grasos (por ejemplo, 1,3-dioles) producido por una célula huésped” se refiere a la eficacia mediante la cual una fuente de carbono de entrada se convierte en un producto (por ejemplo, en un diol graso) en una célula huésped, y en el caso de un “rendimiento en masa” se notifica en porcentaje de masa (producto)/unidades de masa (fuente de carbono), por ejemplo, un rendimiento en masa del 30% se referiría a 30 g de producto que se producen a partir de 100 g de fuente de carbono; un rendimiento en masa del 20% se referiría a 20 g de producto que se producen a partir de 100 g de fuente de carbono; un rendimiento en masa del 10% se referiría a 10 g de producto que se producen a partir de 100 g de fuente de carbono, etc. El rendimiento puede referirse a un 1,3-diol particular o a una combinación de 1,3-dioles producidos por un cultivo de células huésped recombinantes dado.

Tal como se usa en el presente documento, el término “productividad” se refiere a la cantidad de un diol graso (por ejemplo, 1,3-diol) o derivados producidos por volumen unitario de cultivo de células huésped por tiempo unitario (por ejemplo, notificado como g/l/h). La productividad puede referirse a un 1,3-diol particular o a una combinación de 1,3-dioles producidos por un cultivo de células huésped recombinante dado.

Tal como se usa en el presente documento, el término “tasa de utilización de glucosa” significa la cantidad de glucosa usada por el cultivo por tiempo unitario, notificada como gramos/litro/hora (g/l/h).

Una “materia prima” es el material de partida que se usa en la fabricación de un producto o para un procedimiento industrial. Una “materia prima renovable” es un material de partida que se deriva de materiales renovables tales como un material biológico, por ejemplo, materia vegetal y que puede reemplazarse a través de medios naturales (por ejemplo, maíz, caña de azúcar, biomasa lignocelulósica) o productos residuales tales como residuos sólidos municipales, glicerol, free ácidos grasos, gas de combustión, o gas de síntesis; dióxido de carbono, o similares. En comparación, una “materia prima no renovable” es un material de partida que se agota por el uso (por ejemplo, petróleo crudo, carbón, combustible nuclear, etc.) y no puede regenerarse.

Tal como se usa en el presente documento, el término “fuente de carbono simple” se refiere a un sustrato o compuesto adecuado para usarse como fuente de combustible para el crecimiento de células procariotas o eucariotas simples. Las fuentes que están calificadas como fuente de carbono simple pueden estar en diversas formas, incluyendo, pero sin limitarse a polímeros, hidratos de carbono, ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas,

aminoácidos, péptidos y gases (por ejemplo, CO y CO₂). Las fuentes de carbono a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, monosacáridos, tales como glucosa, fructosa, manosa, galactosa, xilosa y arabinosa; oligosacáridos, tales como fructo-oligosacárido y galacto-oligosacárido; polisacáridos tales como almidón, celulosa, pectina y xilano; disacáridos, tales como sacarosa, maltosa, celobiosa y turanosa; material celulósico y variantes tales como hemicelulosas, metilcelulosa y carboximetilcelulosa de sodio; ácidos grasos saturados o insaturados, succinato, lactato y acetato; alcoholes, tales como etanol, metanol y propanol; glicerol, o mezclas de los mismos. En una realización, la fuente de carbono simple se deriva de maíz, caña de azúcar, sorgo, remolacha, pasto varilla, ensilaje, paja, madera, pulpa, aguas residuales, basura, residuos urbanos celulósicos, gas de combustión, gas de síntesis, o dióxido de carbono. La fuente de carbono simple también puede ser un producto de fotosíntesis, tal como glucosa.

En una realización, la fuente de carbono simple se deriva de una materia prima renovable. En una realización particular, la fuente de carbono simple se deriva de una materia prima renovable tal como un hidrato de carbono de maíz, caña de azúcar o biomasa lignocelulósica; o de un producto residual tal como glicerol, ácidos grasos, gas de combustión o gas de síntesis; o de la nueva formación de materiales orgánicos tales como biomasa; o de dióxido de carbono que se fija fotosintéticamente. En otra realización, la fuente de carbono simple se selecciona de glucosa, fructosa, manosa, galactosa, xilosa, arabinosa, fructo-oligosacárido, galacto-oligosacárido, almidón, celulosa, pectina, xilano, sacarosa, maltosa, celobiosa, turanosa, hemicelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, succinato, lactato, acetato, etanol, metanol, glicerol, y mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, la fuente de carbono simple se deriva de biomasa. Una fuente de biomasa a modo de ejemplo es materia vegetal o vegetación, tal como maíz, caña de azúcar o pasto varilla. Otra fuente de biomasa a modo de ejemplo son productos residuales metabólicos, tales como materia animal (por ejemplo, estiércol de vaca). Las fuentes de biomasa a modo de ejemplo adicionales incluyen algas y otras plantas marinas. La biomasa también incluye productos residuales de la industria, agricultura, explotación forestal y domésticos, incluyendo, pero sin limitarse a, residuos de fermentación, ensilaje, paja, madera, aguas residuales, basura, residuos urbanos celulósicos y restos de alimentos. El término "biomasa" también puede referirse a fuentes de carbono, tales como hidratos de carbono (por ejemplo, monosacáridos, disacáridos o polisacáridos)

Tal como se usa en el presente documento, el término "aislado", con respecto a productos (tales como 1,3-dioles o derivados) se refiere a productos que están separados de componentes celulares, medios de cultivo celular, o precursores químicos o sintéticos. Los 1,3-dioles y composiciones relacionadas producidas mediante los métodos descritos en el presente documento pueden ser relativamente inmiscibles en el caldo de fermentación, así como en el citoplasma. Por tanto, las composiciones de dioles grasos pueden recogerse en una fase orgánica o bien de manera intracelular o bien de manera extracelular. En una realización, las composiciones de 1,3-diol se recogen de manera extracelular.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "purificar", "purificado", o "purificación" significan la retirada o el aislamiento de una molécula de su entorno, por ejemplo, mediante aislamiento o separación. Las moléculas "sustancialmente purificadas" están libres en al menos aproximadamente el 60% (por ejemplo, libres en al menos aproximadamente el 70%, libres en al menos aproximadamente el 75%, libres en al menos aproximadamente el 85%, libres en al menos aproximadamente el 90%, libres en al menos aproximadamente el 95%, libres en al menos aproximadamente el 97%, libres en al menos aproximadamente el 99%) de otros componentes con los que se asocian. Tal como se usa en el presente documento, estos términos también se refieren a la retirada de contaminantes de una muestra. Por ejemplo, la retirada de contaminantes puede dar como resultado un aumento en el porcentaje de dioles grasos en una muestra. Por ejemplo, cuando se produce un 1,3-diol en una célula huésped recombinante, el 1,3-diol puede purificarse mediante la retirada de proteínas de la célula huésped. Después de la purificación, el porcentaje de 1,3-diol en la muestra aumenta. Los términos "purificar", "purificado" y "purificación" son términos relativos que no requieren pureza absoluta. Por tanto, por ejemplo, cuando se produce un 1,3-diol en células huésped recombinantes, un 1,3-diol purificado es un 1,3-diol que está sustancialmente separado de otros componentes celulares (por ejemplo, ácidos nucleicos, polipéptidos, lípidos, hidratos de carbono u otros hidrocarburos).

El término "producir un diol graso (es decir 1,3-diol) *in vivo*", tal como se usa para el fin de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, significa producir un diol graso en células huésped viable y/o recombinantes y/o modificadas genéticamente a partir de una fuente de carbono simple, en el que la fuente de carbono simple se añade a un caldo de fermentación de modo que las células huésped pueden captar y metabolizar la fuente de carbono simple durante la fermentación. En una realización, una fuente de carbono simple se deriva de una materia prima renovable.

Cepas de células huésped modificadas por ingeniería genética para selección

La biosíntesis de ácidos grasos es uno de los sistemas más conservados de la maquinaria biosintética bacteriana. El complejo multienzimático ácido graso sintasa (FAS) está presente en todas las bacterias y eucariotas. La mayoría de los genes relacionados con FAS se requieren para el crecimiento y la supervivencia celulares. Las FAS eucariotas y bacterianas dirigen esencialmente el mismo tipo de transformación bioquímica. En eucariotas, FAS se denomina FAS I y la mayoría de sus dominios catalíticos están codificados por una cadena polipeptídica (no disociable). En procariontes, tales como bacterias, FAS se denomina FASII y sus enzimas y proteínas portadoras individuales se codifican por genes independientes que codifican para proteínas diferenciadas (disociables).

La proteína transportadora de acilo (ACP) junto con la enzima en un control de una ruta de FAS controlan la

longitud, el grado de saturación y la ramificación de los ácidos grasos producidos en un organismo nativo. Las etapas en esta ruta están catalizadas por enzimas de la biosíntesis de ácidos grasos (FAB) y las familias de genes de acetil-CoA carboxilasa (ACC). Por ejemplo, las enzimas que pueden incluirse en una ruta de FAS modificada por ingeniería genética incluyen acetil-CoA carboxilasa (por ejemplo, AccABCD, malonil-CoA:ACP transacilasa (por ejemplo, FabD), 3-cetoacil-ACP sintasa III (por ejemplo, FabH), 3-cetoacil-ACP reductasa (por ejemplo, FabG), 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa/isomerasa (por ejemplo, FabA), 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa (por ejemplo, FabZ), trans-2-enoil-ACP reductasa (por ejemplo, FabI o fabL o fabK), trans-2-enoil-ACP isomerasa (por ejemplo, FabM), 3-cetoacil-ACP sintasa I (por ejemplo, FabB) y 3-cetoacil-ACP sintasa II (por ejemplo, FabF). Dependiendo del producto deseado, uno o más de estos genes pueden atenuarse o sobreexpresarse. Como tal, las células huésped se han modificado por ingeniería genética para aumentar la producción de derivados de ácidos grasos (por ejemplo, dioles grasos, alcoholes grasos) así como productos intermedios derivados de ácidos grasos (por ejemplo, aldehídos grasos) mediante la alimentación de una fuente de carbono simple que puede derivarse de materia prima renovable. En el presente documento, el principal objetivo es aumentar la actividad de enzimas de control clave que regulan la producción de derivados de ácidos grasos tales como dioles grasos con el fin de convertir la cepa bacteriana en una fábrica microbiana para la producción de dioles grasos. Las cepas bacterianas de la invención producen 1,3-dioles que tienen una longitud de cadena de al menos 5 átomos de carbono. En otra realización, las cepas bacterianas produce los 1,3-dioles en combinación con alcoholes grasos. En otra realización, las cepas bacterianas se modifican adicionalmente de manera que en particular la actividad cetoacil-ACP reductasa está aumentada y/o la actividad 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa está disminuida, lo que conduce a una producción aumentada de 1,3-diol graso.

Las células huésped se han modificado previamente por ingeniería genética para aumentar otros derivados de ácidos grasos, incluyendo ésteres de metilo de ácidos grasos (FAME), ésteres de etilo de ácidos grasos (FAEE), y alcoholes grasos (FALC) (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 8.283.143). Tal como apreciará un experto en la técnica, también puede producirse síntesis de ácidos grasos a través de la elongación de acil-CoA usando biosíntesis de ácidos grasos independiente de acil-ACP. Las enzimas de FAS responsables de las reacciones de biosíntesis, condensación, reducción, deshidratación, reducción y similares de ácidos grasos correspondientes, también pueden usarse para la síntesis de tioésteres de acilo que pueden usarse como sustratos para la producción de derivados de ácidos grasos, incluyendo pero sin limitarse a ácidos grasos, aldehídos grasos, alcoholes grasos y 3-hidroxi-derivados de los mismos, incluyendo 1,3-dioles grasos. Tal como conocen los expertos en la técnica, las reacciones bioquímicas responsables de la oxidación de ácidos grasos (el ciclo de β -oxidación) pueden funcionar a la inversa para soportar la síntesis de tioésteres de ácidos grasos. Estos tioésteres de acilo pueden usarse como sustratos para la producción de derivados de ácidos grasos, incluyendo pero sin limitarse a ácidos grasos, aldehídos grasos, alcoholes grasos y 3-hidroxi-derivados de los mismos, incluyendo 1,3-dioles grasos. Además, en algunos organismos, la biosíntesis de ácidos grasos puede producirse sin ACP, por ejemplo a través de la síntesis de acil CoA (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2014/0051136A1; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US 2014/0273114A1; y Dellomonaco *et al.* (2011) *Nature* 476(7360):355-9). En un aspecto, los componentes de estos diversos y diferentes sistemas de FAS pueden coexpresarse en la misma célula para funcionar de manera cooperativa para producir tioésteres de acil graso y derivados, incluyendo pero sin limitarse a ácidos grasos, aldehídos grasos, alcoholes grasos y 3-hidroxi-derivados de los mismos, incluyendo 1,3-dioles grasos.

40 Moléculas quirales

Se dice que una molécula es quiral si puede existir como estereoisómeros (es decir, enantiómeros) que son imágenes especulares no superponibles entre sí. Esto es relevante porque la respuesta de un organismo a una molécula particular a menudo depende de cómo encaje esa molécula en un sitio particular en una molécula receptora en el organismo. Las moléculas quirales que incluyen dioles y alcoholes quirales son elementos estructurales para la síntesis de determinados compuestos tales como, por ejemplo, productos farmacéuticos, productos nutracéuticos y otros compuestos activos. En aplicaciones farmacéuticas y nutracéuticas, es necesario conocer qué enantiómero es el activo y encaja en el receptor deseado.

Un modo para obtener el compuesto como un isómero activo puro es producir el compuesto químico empleando organismos tales como microbios, porque la producción de biomoléculas en organismos es estereoespecífica (es decir, produce un estereoisómero específico). Por ejemplo, las levaduras producen de manera natural aminoácidos, vitaminas y hormonas durante la fermentación del azúcar y pueden recogerse de las mismas. Los expertos en la técnica aprecian las propiedades de las enzimas como catalizadores quirales y el aumento en la demanda de fármacos enantioméricamente puros ha aumentado el interés en las enzimas a efectos de realizar una buena síntesis química. A diferencia de la producción de moléculas quirales por medio de organismos, cuando las moléculas quirales se producen mediante procedimientos químicos, se obtiene una mezcla de los enantiómeros (es decir, una mezcla racémica).

Los métodos actuales de análisis enantiomérico incluyen técnicas no cromatográficas tales como polarimetría, resonancia magnética nuclear, dilución isotópica, calorimetría y técnicas enzimáticas. Estas técnicas requieren muestras puras y no está implicada la separación de enantiómeros. La cuantificación (que no requiere muestras puras) y la separación de enantiómeros puede realizarse simultáneamente mediante cromatografía quiral, tal como cromatografía de gases (CG) o cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) usando columnas quirales (véase *Stereochemistry of Organic Compounds*, Ernest L. Elii/Samuel H. Wilen, 1994, John Wiley & Sons, Inc.).

Pueden usarse biocatalizadores para obtener los compuestos quirales y la pureza quiral de los productos puede identificarse usando métodos cromatográficos quirales, tales como HPLC o CL/EM quiral (véanse las publicaciones de solicitud de patente estadounidense n^{os}. US2008/0248539A1 y US2013/0052699A1).

Quiralidad de derivados de 3-hidroxiácidos grasos

5 Un aspecto único de los derivados de 3-hidroxiácidos grasos (por ejemplo, 3-hidroxiácidos grasos, 3-hidroxiésteres grasos, 3-hidroxialdehídos grasos, 3-hidroxi Alcoholes grasos, etc.), es que cada molécula es quiral. La funcionalidad 3-hidroxi es un estereocentro, que proporciona un punto de quiralidad para cada compuesto. La quiralidad puede ser un atributo molecular útil en la definición de aplicaciones moleculares incluyendo, pero sin limitarse a, rendimiento de polímeros, bioactividad, potencia farmacéutica, y similares. El estereoisómero de derivados de 3-hidroxiácidos grasos depende de la selectividad de la biosíntesis de ácidos grasos (FAS) a partir de la cual se producen. Manipulando qué enzimas de FAS son responsables de la síntesis de derivados de 3-hidroxiácidos grasos, puede controlarse la quiralidad del derivado de 3-hidroxiácido graso resultante. Por ejemplo, aprovecharse de la FAS de *E. coli* nativa para la biosíntesis de 1,3-dioles grasos producirá el (R)-1,3-diol graso, cuyo centro quiral está creado por la actividad de la 3-cetoacil-ACP reductasa de formación de (R)-3-hidroxi-acil-ACP, catalizado por FabG en *E. coli* (y homólogos en otros microorganismos). La (R)-3-hidroxiacil-ACP es un sustrato para polipéptidos de biosíntesis de alcohol incluyendo, pero sin limitarse a, los mostrados en las rutas 1-5 en la figura 10, que los convierten en (R)-1,3-diol graso. Además, (S)-3-hidroxi-acil CoA es un producto intermedio en la degradación de ácidos grasos a través de la ruta de beta-oxidación. Los ácidos grasos libres se convierten en acil-CoA mediante la acil-CoA sintasa, catalizado por FadD en *E. coli* y homólogos en otros microorganismos; esto se oxida para dar trans-2-enoil-CoA mediante la acil graso-CoA deshidrogenasa, catalizado por FadE en *E. coli* y homólogos en otros microorganismos; esto se hidrata entonces para dar (S)-3-hidroxi-acil-CoA mediante la 2-trans-enoil-CoA hidratasa/(S)-3-hidroxi-acil-CoA deshidratasa, catalizado por FadB en *E. coli* y homólogos en otros microorganismos; esto se oxida entonces adicionalmente para dar 3-ceto-acil-CoA mediante la 3-ceto-acil-CoA deshidrogenasa, también catalizado por FadB en *E. coli* y homólogos en otros microorganismos; finalmente esto se tioliza para dar acil-CoA y acetil-CoA mediante la 3-cetoacil-CoA tiolasa, catalizado por FadA en *E. coli* y homólogos en otros microorganismos. Una cepa que se altera selectivamente en la actividad (S)-3-hidroxi-acil-CoA deshidrogenasa de beta oxidación, por ejemplo, mediante una mutación de histidina 450 en la FadB de *E. coli* (o un homólogo funcional en o procedente de un microorganismo diferente), acumularía (S)-3-hidroxi-acil CoA cuando se proporcionara un ácido graso libre (rutas 6 y 7 en la figura 11). La histidina 450 es el residuo catalítico de la L-3-hidroxiacil Coenzima A deshidrogenasa asociada con la subunidad α grande del complejo multienzimático de la oxidación de ácidos grasos a partir de *E. coli* (véase He *et al.* (1996) *Biochemistry* 35(29):9625-9630). La (S)-3-hidroxi-acil CoA podría convertirse entonces en (S)-1,3-diol graso a través de la acción de polipéptidos de formación de alcoholes grasos, tales como los descritos en las rutas 1-5 en la figura 11. El ácido graso libre podría proporcionarse a la célula de manera externa (ruta 7 en la figura 11) o podría generarse dentro de la célula, por ejemplo mediante la hidrólisis de una acil-ACP mediante una tioesterasa (ruta 6 en la figura 11). En una realización, el producto intermedio de acil CoA en las reacciones anteriores se elonga para dar 3-cetoacil-CoA mediante la 3-cetoacil-CoA tiolasa (véase la ruta 8 en la figura 11), catalizado por FadA en *E. coli* y homólogos en otros microorganismos; esto se reduce entonces mediante mutantes de FadB que se alteran selectivamente en su actividad hidratasa/deshidratasa (por ejemplo, mediante una mutación de Glu 119 en *E. coli* FadB (o su homólogo en enzimas relacionadas). Esto podría dar como resultado la acumulación de (S)-3-hidroxiacil-CoA, que entonces podría convertirse en (S)-1,3-dioles grasos mediante polipéptidos de formación de dioles grasos tales como los mostrados en las rutas 1-5 en la figura 11. El glutamato-119 de la subunidad alfa grande es la base catalítica en la hidratación de 2-trans-enoil-coenzima A catalizado por el complejo multienzimático de la oxidación de ácidos grasos de *E. coli* (véase He *et al.* (1997) *Biochemistry* 36(36): 11044-11049). El glutamato 139 de la subunidad alfa grande es la base catalítica en la deshidratación tanto de D- como de L-3-hidroxiacil-coenzima A, pero no en la isomerización de delta 3, delta 2-enoil-coenzima A catalizado por el complejo multienzimático de la oxidación de ácidos grasos de *E. coli* (véase Yang *et al.* (1995) *Biochemistry* 34(19):6441-6447). En otra realización, el producto intermedio de acil-CoA en las reacciones anteriores se elonga para dar 3-cetoacil CoA mediante la 3-cetoacil CoA tiolasa, catalizado por FadA en *E. coli* y homólogos en otros microorganismos, esto se reduce entonces mediante (S)-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasas (por ejemplo, a partir de la EC 1.1.1.35) (ruta 8, figura 11). Esto daría como resultado la acumulación de (S)-3 hidroxiacil CoA, que entonces se convertiría en (S)-1,3-dioles grasos mediante polipéptidos de formación de dioles grasos tales como los mostrados en las rutas 1-5 en la figura 11.

Con el fin de modificar por ingeniería genética células huésped para expresar determinadas funcionalidades enzimáticas (véase la tabla 1, a continuación) puede realizarse modificación genética en las células huésped. En algunas realizaciones, se proporciona una secuencia de polinucleótido (o gen) a la célula huésped a modo de un vector recombinante, que incluye un promotor asociado operativamente a la secuencia de polinucleótido. En determinadas realizaciones, el promotor es un promotor regulado por el desarrollo, uno específico de orgánulo, uno específico de tejido, uno inducible, uno constitutivo o uno específico de célula. En algunas realizaciones, el vector recombinante incluye al menos una secuencia seleccionada de una secuencia de control de la expresión acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótido; un marcador de selección acoplado operativamente a la secuencia de polinucleótido; una secuencia de marcador acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótido; un resto de purificación acoplado operativamente a la secuencia de polinucleótido; una secuencia de secreción acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótido; y una secuencia de selección como diana acoplada operativamente

a la secuencia de polinucleótido. Los vectores de expresión descritos en el presente documento incluyen una secuencia de polinucleótido en una forma adecuada para la expresión de la secuencia de polinucleótido en una célula huésped. Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que va transformarse, el nivel de expresión del polipéptido deseado, etc. Los vectores de expresión descritos en el presente documento pueden introducirse en células huésped para producir polipéptidos, incluyendo polipéptidos de fusión, codificados por las secuencias de polinucleótido tal como se describió anteriormente. La expresión de genes que codifican para polipéptidos en procariontes, por ejemplo, *E. coli*, se lleva a cabo con la mayor frecuencia con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de polipéptidos o bien de fusión o bien de no fusión. Los vectores de fusión añaden varios aminoácidos a un polipéptido codificado en los mismos, habitualmente al extremo amino terminal o carboxilo terminal del polipéptido recombinante. Tales vectores de fusión sirven normalmente para uno o más de los tres propósitos siguientes incluyendo aumentar la expresión del polipéptido recombinante; aumentar la solubilidad del polipéptido recombinante; y ayudar en la purificación del polipéptido recombinante actuando como ligando en purificación por afinidad. A menudo, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y el polipéptido recombinante. Esto permite la separación del polipéptido recombinante del resto de fusión después de la purificación del polipéptido de fusión. Los ejemplos de tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento relacionadas, incluyen Factor Xa, trombina y enterocinasa. Los vectores de expresión de fusión a modo de ejemplo incluyen el vector pGEX (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ; Smith *et al.* (1988) Gene 67:31-40), pMAL vector (New England Biolabs, Beverly, MA), y el vector pRITS (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, N.J.), que fusionan la glutatión S-transferasa (GST), la proteína de unión a maltosa E, o la proteína A, respectivamente, al polipéptido recombinante diana.

Los ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* de no fusión, inducibles incluyen el vector pTrc (Amann *et al.* (1988) Gene 69:301-315) y el vector pET 11d (Studier *et al.*, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89). La expresión del gen diana a partir del vector pTrc se basa en la transcripción por la ARN polimerasa del huésped a partir de un promotor de fusión trp-lac híbrido. La expresión del gen diana a partir del vector pET 11d se basa en la transcripción a partir de un promotor de fusión T7 gn10-lac mediada por una ARN polimerasa viral coexpresada (T7 gn1). Esta polimerasa viral la suministran cepas huésped BL21(DE3) o HMS174(DE3) a partir de un profago λ residente que alberga un gen de T7 gn1 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5. Se conocen bien en la técnica sistemas de expresión adecuados para células tanto procariontes como eucariotes; (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory). Los ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* de no fusión, inducibles incluyen el vector pTrc (Amann *et al.* (1988) Gene 69:301-315)) y el vector PET 11d (Studier *et al.* (1990), Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA, págs. 60-89). En determinadas realizaciones, una secuencia de polinucleótido de la divulgación está operativamente unida a un promotor derivado del bacteriófago T5. En una realización, la célula huésped es una célula de levadura. En esta realización, el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Pueden introducirse vectores en células procariontes o eucariotes por medio de una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico foráneo (por ejemplo, ADN) en una célula huésped. Pueden encontrarse métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped en, por ejemplo, Sambrook *et al.* (citado anteriormente). Para la transformación estable de células bacterianas, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transformación usados, sólo una pequeña fracción de células captará y replicará el vector de expresión. Con el fin de identificar y seleccionar estos transformantes, puede introducirse un gen que codifica para un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a un antibiótico) en las células huésped junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables incluyen los que confieren resistencia a fármacos tales como, pero sin limitarse a, ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Pueden introducirse ácidos nucleicos que codifican para un marcador seleccionable en una célula huésped en el mismo vector que el que codifica para un polipéptido descrito en el presente documento o pueden introducirse en un vector independiente. Las células transformadas de manera estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse mediante crecimiento en presencia de un fármaco de selección apropiado. La célula huésped modificada por ingeniería genética o recombinante tal como se describe en el presente documento es una célula usada para producir una composición de derivado de ácido graso tal como una composición de diol graso. La célula huésped puede seleccionarse de una planta eucariota, bacterias, algas, cianobacteria, bacteria verde del azufre, bacteria verde no del azufre, bacteria púrpura del azufre, bacteria púrpura no del azufre, extremófilo, levadura, hongo, organismo modificado por ingeniería genética de los mismos, o un organismo sintético. En algunas realizaciones, la célula huésped depende de la luz o fija carbono. En algunas realizaciones, la célula huésped tiene actividad autótrofa. Pueden usarse diversas células huésped para producir dioles grasos, tal como se describe en el presente documento.

Las células huésped o microorganismos de la divulgación incluyen cepas huésped o células huésped que pueden modificarse genéticamente por ingeniería genética o modificarse para contener alteraciones con el fin de someter a prueba la eficacia de actividades enzimáticas específicas. Pueden usarse diversas manipulaciones y alteraciones genéticas opcionales de manera intercambiable de una célula huésped a otra, dependiendo de qué rutas enzimáticas nativas estén presentes en la célula huésped original. Una cepa huésped puede englobar varias alteraciones genéticas con el fin de someter a prueba variables específicas, incluyendo pero sin limitarse a, condiciones de cultivo incluyendo componentes de fermentación, fuente de carbono (por ejemplo, materia prima), temperatura, presión, condiciones de contaminación de cultivo reducidas, y niveles de oxígeno.

En una realización, una cepa huésped engloba una atenuación o delección opcional de una o más enzimas implicadas en la beta-oxidación de ácidos grasos y/o sitios de unión a fagos. Estas modificaciones genéticas están diseñadas para disminuir la degradación intracelular de los ácidos grasos y para aumentar la resistencia a bacteriófagos. En una realización, la cepa huésped es *E. coli* y la modificación genética es una atenuación o delección de *fadE* y/o *fhuA*. La acil-CoA deshidrogenasa (FadE en *E. coli*) es una enzima que es importante para metabolizar ácidos grasos. Cataliza la segunda etapa en la degradación de ácidos grasos (beta-oxidación), que es el procedimiento de metabolización de tioésteres de ácidos grasos (acil-CoA) para dar moléculas de acetyl-CoA y NAD(P)H. Más específicamente, la segunda etapa del ciclo de β -oxidación de la degradación de ácidos grasos en bacterias es la oxidación de la acil-CoA para dar 2-enoil-CoA, que está catalizada por FadE. Cuando *E. coli* u otra bacteria carece o presenta atenuación en FadE o acil graso CoA deshidrogenasa, crecen escasamente o no crecen en absoluto en ácidos grasos como fuente de carbono. La incapacidad para utilizar ácidos grasos de cualquier longitud de cadena concuerda con el fenotipo notificado de las cepas *fadE*, es decir, cepas mutantes *fadE* donde la función de FadE está alterada. El gen *fadE* puede estar opcionalmente desactivado o atenuado para garantizar que los acil-CoA, que pueden ser productos intermedios en una ruta de derivado de ácido graso, puedan acumularse en la célula, de manera que todos los acil-CoA puedan convertirse eficazmente en derivados de ácidos grasos. Sin embargo, la atenuación de *fadE* puede ser opcional cuando se usa azúcar como fuente de carbono en condiciones no limitativas, puesto que en tal condición, la expresión de FadE puede estar reprimida y por tanto FadE sólo puede estar presente en pequeñas cantidades y no puede competir eficazmente con la éster sintasa u otras enzimas por sustratos de acil-CoA. En estas circunstancias, podría considerarse que FadE está reprimida debido a la represión del catabolito. *E. coli* y muchos otros microbios prefieren consumir azúcar con respecto a ácidos grasos, por lo que cuando ambas fuentes están disponibles, se esperará que el azúcar se consuma primero, como resultado de la represión del regulón *fad* (véase D. Clark, J Bacteriol. (1981) 148(2):521-6). Además, la ausencia de azúcares y la presencia de ácidos grasos induce la expresión de FadE. Los productos intermedios de acil-CoA podrían perderse para la ruta de beta-oxidación, puesto que las proteínas expresadas por el regulón *fad* (incluyendo *FadE*) estarían reguladas por incremento y competirían eficazmente por las acil-CoA. Por tanto, puede ser beneficioso tener el gen *fadE* desactivado o atenuado. Puesto que las fuentes de carbono pueden basarse en azúcar, es opcional para atenuar *FadE*.

Por ejemplo, en *E. coli*, puede deleccionarse cualquiera del gen *fadE* (que codifica para acil-CoA deshidrogenasa) o el gen *fadD* (que codifica para acil-CoA sintetasa). Tales cepas no pueden degradar ácidos grasos o solo muy escasamente, por tanto, por lo que se aumenta la disponibilidad de ácidos grasos dentro de la célula. Tales ácidos grasos se hacen disponibles entonces para una conversión aumentada a producto, tal como derivados de ácidos grasos. Los ácidos grasos también pueden estar disponibles deleccionando otras enzimas de degradación de ácidos grasos, tales como *fadA* o *fadB*. La delección de cualquiera de estos genes es opcional y puede implementarse cuando los ácidos grasos libres se suministran de manera exógena o son productos intermedios de una ruta de producto. La tabla 1 (a continuación) proporciona una lista completa de actividad enzimática dentro de las rutas metabólicas, incluyendo diversas enzimas de degradación de ácidos grasos que pueden atenuarse para aumentar la disponibilidad de los ácidos grasos en una cepa huésped.

En *E. coli*, el gen *fhuA* codifica para la proteína TonA, que es un transportador y receptor con acoplamiento de energía en la membrana externa de *E. coli* (V. Braun (2009) J Bacteriol. 191(11):3431-3436). Su delección es opcional. La delección de *fhuA* permite que la célula se vuelva más resistente al ataque de fagos, lo que puede ser perjudicial en fermentaciones comerciales. Por tanto, puede ser deseable deleccionar *fhuA* en una célula huésped que se somete probablemente a contaminación potencial durante series de fermentación. De manera similar, las proteínas homólogas en otros organismos así como otros sitios de unión a fago son posibles candidatos para delección para mejorar la resistencia a fagos.

En otra realización, la cepa huésped (anteriormente) también engloba 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), *fabD* de *Salmonella typhimurium* (NP_460164), *fabG* de *Salmonella typhimurium* (NP_460165), *fabH* de *Salmonella typhimurium* (NP_460163), *fabV* de *Vibrio cholerae* (YP_001217283) y *fabF* de *Clostridium acetobutyllicum* (NP_350156). La sobreexpresión de uno o más de estos genes, que codifican para enzimas y reguladores de la biosíntesis de ácidos grasos, puede servir para aumentar el título de productos intermedios derivados de ácidos grasos incluyendo aldehídos grasos, así como productos finales tales como dioles grasos en diversas condiciones de cultivo.

En una realización, se usan cepas de *E. coli* como células huésped para la producción de dioles grasos (es decir 1,3-dioles grasos que tienen una longitud de cadena de al menos 5 átomos de carbono). Estas células huésped pueden incluir sobreexpresión opcional de uno o más genes de biosíntesis (es decir, genes que codifican para enzimas y reguladores de la biosíntesis de ácidos grasos) que pueden aumentar o potenciar adicionalmente el título de compuestos derivados de ácidos grasos, tales como productos intermedios (por ejemplo, aldehídos grasos) y productos finales (por ejemplo, dioles grasos, alcoholes grasos) derivados de ácidos grasos en diversas condiciones de cultivo incluyendo, pero sin limitarse a, *fadR*, *fabA*, *fabD*, *fabG*, *fabH*, *fabV* y/o *fabF*. Los 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 cholerae* (YP_001217283) y *fabF* de *Clostridium acetobutyllicum* (NP_350156). En

algunas realizaciones, pueden modificarse por ingeniería genética operones sintéticos que portan estos genes biosintéticos y expresarse en células con el fin de someter a prueba la sobreexpresión de productos intermedios derivados de ácidos grasos en diversas condiciones de cultivo y/o potenciar adicionalmente la producción de dioles grasos. Tales operones sintéticos contienen uno o más genes biosintéticos. El operón ifab138, por ejemplo, es un operón modificado por ingeniería genética que contiene genes biosintéticos de ácidos grasos opcionales, incluyendo fabV de *Vibrio cholerae*, fabH de *Salmonella typhimurium*, fabD de *S. typhimurium*, fabG de *S. typhimurium*, fabA de *S. typhimurium* y/o fabF de *Clostridium acetobutylicum* que pueden usarse para facilitar la sobreexpresión de derivados y productos intermedios de ácidos grasos con el fin de someter a prueba condiciones de cultivo específicas. Una ventaja de tales operones sintéticos es que la tasa de producción de derivados de ácidos grasos (por ejemplo, ácidos grasos, aldehídos grasos, alcoholes grasos, dioles grasos, etc.) puede aumentarse o potenciarse adicionalmente en células que los contienen.

Las células huésped o microorganismos que se usan para producir tioésteres de acilo (tales como acil-CoA o acil-ACP) y enzimas biosintéticas (por ejemplo, TE, CAR, AR, ADH, ACC, AAR, FAR, ACR; véanse también las figuras 1 y 3 así como las figuras 8-11) expresarán además genes que engloban determinadas actividades enzimáticas que pueden aumentar la producción para uno o más derivados de ácidos grasos particulares tales como ácidos grasos, 3-hidroxiácidos grasos, alcoholes grasos, 1,3-dioles grasos, aldehídos grasos, 3-hidroxialdehídos grasos, y similares. La célula huésped tiene actividad tioesterasa (TE) (EC 3.1.2.- o EC 3.1.2.14 o EC 3.1.1.5) para la producción de ácidos grasos y 3-hidroxiácidos grasos que puede aumentarse mediante la sobreexpresión del gen. En otro aspecto, la célula huésped tiene una actividad tioesterasa (TE) (EC 3.1.2.- o EC 3.1.2.14 o EC 3.1.1.5) y ácido carboxílico reductasa (CAR) (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42 o EC 1.2.99.6) para la producción de aldehídos grasos y/o 3-hidroxialdehídos grasos. En un aspecto, la célula huésped tiene una actividad tioesterasa (TE) (EC 3.1.2.- o EC 3.1.2.14 o EC 3.1.1.5) y actividad ácido carboxílico reductasa (CAR) (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42 o EC 1.2.99.6) y actividad alcohol deshidrogenasa (ADH)/aldehído reductasa (AR) (EC 1.1.1.-) para la producción de alcoholes grasos y/o dioles grasos. En un aspecto, la célula huésped tiene actividad acil-ACP reductasa (AAR) (EC 1.2.1.80 o EC 1.2.1.42) para la producción de aldehídos grasos y/o 3-hidroxialdehídos grasos. En otro aspecto, la célula huésped tiene actividad acil-ACP reductasa (AAR) (EC 1.2.1.80 o EC 1.2.1.42) y actividad alcohol deshidrogenasa (ADH)/aldehído reductasa (AR) (EC 1.1.1.-) para la producción de alcoholes grasos y/o dioles grasos. La combinación de genes puede sobreexpresarse o subexpresarse modificando por ingeniería genética microbios en consecuencia. En una realización, uno o más de los genes sobreexpresados son endógenos. En otra realización, uno o más de los genes sobreexpresados son exógenos.

En aspectos alternativos, la célula huésped tiene actividad acil-ACP reductasa (AAR) (EC 1.2.1.80 o EC 1.2.1.42) y/o actividad acil-ACP/acil CoA reductasa (AAR/ACR) (EC 1.2.1.80 o EC 1.2.1.42 o EC 1.2.1.50) y/o actividad alcohol deshidrogenasa (E.C. 1.1.-.-) y/o actividad acil-CoA/Acil-ACP reductasa de formación de alcohol graso (FAR) (EC 1.1.1.-) y/o actividad ácido carboxílico reductasa (CAR) (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42 o EC 1.2.99.6) y/o actividad tioesterasa (TE) (EC 3.1.2.- o EC 3.1.2.14 o EC 3.1.1.5) para la producción de alcoholes grasos. En otros aspectos alternativos, la célula huésped tiene actividad acil-CoA reductasa (EC 1.2.1.50) y actividad acil-CoA sintasa (FadD) (EC 2.3.1.86) y actividad tioesterasa (TE) (EC 3.1.2.- o EC 3.1.2.14 o EC 3.1.1.5) para la producción de alcoholes grasos. La expresión de estas actividades enzimáticas alternativas en microorganismos y células microbianas se enseña en las patentes estadounidenses números 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. En otros aspectos, las células huésped o microorganismos que se usan para producir acil-ACP y/o acil-CoA y otras enzimas biosintéticas incluirán determinadas actividades enzimáticas nativas que están reguladas por incremento o sobreexpresadas con el fin de producir uno o más derivados de ácidos grasos particulares, tales como un aldehído graso y/o alcohol graso y/o diol graso. En un aspecto, la célula huésped tiene una actividad tioesterasa (TE) nativa para la producción de ácidos grasos que puede aumentarse mediante la sobreexpresión del gen de tioesterasa.

La presente divulgación da a conocer cepas huésped o microorganismos que expresan genes que codifican para enzimas biosintéticas (anteriormente). Las células huésped recombinantes producen productos intermedios derivados de ácidos grasos tales como aldehídos grasos y productos finales derivados de ácidos grasos tales como alcoholes grasos y/o dioles grasos y composiciones y combinaciones de los mismos. Los productos finales derivados de ácidos grasos normalmente se recubren del medio de cultivo y/o se aíslan de las células huésped. En una realización de la invención, los 1,3-dioles grasos se recubren del medio de cultivo (extracelular). En otra realización, los 1,3-dioles grasos se recuperan del medio de cultivo y se aíslan de las células huésped. En otra realización, los dioles grasos y/o alcoholes grasos son extracelulares y se asocian con las células huésped y se aíslan de las células huésped. La composición de diol graso producida por una célula huésped puede analizarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, CG-FID, con el fin de determinar la distribución de dioles grasos particulares, así como las longitudes de cadena y el grado de saturación de los componentes de las composiciones de diol graso.

Los ejemplos de células huésped que funcionan como microorganismos (por ejemplo, células microbianas), incluyen pero no se limitan a, células del género *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Zymomonas*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Lactococcus*, *Chrysosporium*, *Saccharomyces*, *Stenotrophomonas*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia* o *Streptomyces*. En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula bacteriana Gram positiva. En otras

realizaciones, la célula huésped es una célula bacteriana Gram negativa. En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula de *E. coli*. En alguna realización, la célula huésped es una célula de *E. coli* B, una célula de *E. coli* C, una célula de *E. coli* K o una célula de *E. coli* W. En otras realizaciones, la célula huésped es 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 *Bacillus thuringiensis*, una célula de *Bacillus clausii*, una célula de *Bacillus megaterium*, una célula de *Bacillus subtilis* o una célula de *Bacillus amyloliquefaciens*. Todavía en otras realizaciones, la célula huésped es una célula de *Trichoderma koningii*, una célula de *Trichoderma viride*, una célula de *Trichoderma reesei*, una célula de *Trichoderma longibrachiatum*, una célula de *Aspergillus awamori*, una célula de *Aspergillus fumigatus*, una célula de *Aspergillus foetidus*, una célula de *Aspergillus nidulans*, una célula de *Aspergillus niger*, una célula de *Aspergillus oryzae*, una célula de *Humicola insolens*, una célula de *Humicola lanuginosa*, una célula de *Rhodococcus opacus*, una célula de *Rhizomucor miehei* o una célula de *Mucor michei*. Aún en otras realizaciones, la célula huésped es una célula de *Streptomyces lividans* o una célula de *Streptomyces murinus*. Aún en otras realizaciones, la célula huésped es una célula de *Actinomycetes*. En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula de *Saccharomyces cerevisiae*. En otras realizaciones, la célula huésped es una célula de una planta eucariota, algas, cianobacteria, bacteria verde del azufre, bacteria verde no del azufre, bacteria púrpura del azufre, bacteria púrpura no del azufre, extremófilo, levadura, hongo, un organismo modificado por ingeniería genética de los mismos, o un organismo sintético. En algunas realizaciones, la célula huésped depende de la luz o fija carbono. En algunas realizaciones, la célula huésped tiene actividad autótrofa. En algunas realizaciones, la célula huésped tiene actividad fotoautótrofa, tal como en presencia de luz. En algunas realizaciones, la célula huésped es heterótrofa o mixótrofa en ausencia de luz. En determinadas realizaciones, la célula huésped 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 elongates BP-1*, *Clorobium tepidum*, *Clorojlexus auranticus*, *Chromatium vinosum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium thermocellum*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* o *Zymomonas mobilis*. En una realización particular, la célula microbiana es de una cianobacteria incluyendo, pero sin limitarse a, *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Cianothece* y *Nostoc punctiforme*. En otra realización, la célula microbiana es de una especie cianobacteriana específica incluyendo, pero sin limitarse a, *Synechococcus elongatus* PCC7942, *Synechocystis sp. PCC6803* y *Synechococcus sp. PCC7001*.

Células huésped recombinantes modificadas por ingeniería genética para producir 1,3-dioles

La presente divulgación identifica polinucleótidos que codifican para polipéptidos de función enzimática con el fin de modificar rutas enzimáticas para la producción de compuestos deseables tales como dioles grasos (por ejemplo, 1,3-dioles). Estos polipéptidos, que se identifican en el presente documento mediante números de registro de enzimas (números de EC, véase la tabla 1, a continuación), son útiles para modificar por ingeniería genética rutas de ácidos grasos que conducen a la producción de dioles grasos. Más específicamente, las figuras 1-3 y 8-11 representan rutas que se modifican por ingeniería genética para producir 1,3-dioles. Tal como se muestra, una proteína transportadora de 3'-hidroxi-acilo (ACP) que transporta un producto intermedio de acilo (acil-ACP o 3-hidroxi-acil-ACP) puede convertirse en un 1,3-diol, empleando un 3'-hidroxi-ácido graso (3' OH FA) y un 3'-hidroxi-aldehído graso (3' OH aldehído graso) como productos intermedios. En una realización, en la figuras 1-3 y 8-11 se representan rutas modificadas por ingeniería genética que producen 1,3-dioles. En el presente documento, una fuente de carbono simple tal como glucosa se convierte en primer lugar en una 3'-hidroxi-acil-ACP mediante el organismo microbiano (por ejemplo, *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Rhodococcus*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Chrysosporium*, *Saccharomyces*, *Stenotrophomonas*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia* o *Streptomyces*). En algunas realizaciones, la acil-ACP o 3'-hidroxi-acil-ACP universal y altamente conservada se produce mediante la ruta nativa del organismo microbiano. En una realización, la 3'-hidroxi-acil-ACP puede usarse para iniciar la ruta modificada por ingeniería genética. Por ejemplo, la 3'-hidroxi-acil-ACP pueden convertirse en un producto intermedio tal como 3' OH FA mediante una enzima que tiene actividad tioesterasa (TE) (véase la tabla 2, a continuación). El producto intermedio 3' OH FA puede convertirse entonces en otro producto intermedio tal como 3' OH aldehído mediante una enzima que tiene actividad ácido carboxílico reductasa (CAR) (véase la tabla 3, a continuación). Una enzima que tiene actividad alcohol deshidrogenasa (ADH) o aldehído reductasa (AR) (véase la tabla 4, a continuación) puede convertir el 3' OH aldehído en un 1,3-diol. Con el fin de ilustrar adicionalmente una ruta de este tipo, la figura 2 proporciona ejemplos de enzimas específicas que tienen la actividad tioesterasa (por ejemplo, *fatB1*, *tesA*, *phaG*); la actividad CAR (por ejemplo, *carB*); y la actividad ADH/AR (por ejemplo, *alrA*). En la tabla 2 se muestran ejemplos adicionales de enzimas tioesterasa (TE) que pueden llevar a cabo la reacción de convertir una 3'OH acil-ACP en un 3' OH FA. En una realización, los genes que codifican para estas tioesterasas son *tesA*, *tesB*, *fatB*, *fatB1*, *fatB2*, *fatB3*, *TE_EEI82564*, *TE_CAD63310* y *phaG*. En otra realización, los genes que codifican para estas tioesterasas son *TE_EEI82564* y/o *TE_CAD63310*, que no se han asociado previamente con la capacidad para convertir 3' OH acil-ACP en 3' OH FA (por ejemplo, véase Jing *et al.* (2011) BMC Biochemistry 12(44):1471-2091). En la tabla 3 se muestran ejemplos adicionales de enzimas CAR que pueden llevar a cabo la reacción de convertir un 3' OH FA en un 3' OH aldehído. En una realización, el gen que codifica para la enzima CAR es *carB*. En la tabla 4 se muestran

ejemplos adicionales de enzimas ADH/AR que pueden llevar a cabo la reacción de convertir un 3' OH aldehído en un 1,3-diol. En una realización, los genes que codifican para estas enzimas ADH/AR son *alrA* y/o *yqhD*.

En otra realización, en la figura 3 se representa una ruta modificada por ingeniería genética que también produce 1,3-dioles. De manera similar, una fuente de carbono simple tal como glucosa se convierte en primer lugar en una 3' hidroxil-acil-ACP mediante el organismo microbiano (por ejemplo, *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Rhodococcus*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Chrysosporium*, *Saccharomyces*, *Stenotrophomonas*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia* o *Streptomyces*). En algunas realizaciones, la 3' hidroxil-acil-ACP universal y altamente conservada se produce mediante la ruta nativa del organismo microbiano. Tal como se indicó anteriormente, la 3' hidroxil-acil-ACP puede usarse para iniciar la ruta modificada por ingeniería genética. Por ejemplo, la 3' hidroxil-acil-ACP se convierte en un producto intermedio tal como 3' OH aldehído graso mediante una enzima que tiene actividad acil-ACP reductasa (AAR) (véase la tabla 1). La producción de alcoholes grasos y/o aldehídos grasos mediante AAR puede potenciarse a través de la expresión heteróloga de un gen denominado *accABCD* que codifica para una acetil-CoA carboxilasa. Los ejemplos de enzimas AAR que pueden llevar a cabo la reacción de convertir una 3'OH acil-ACP en un 3' OH aldehído incluyen, pero no se limitan a, una enzima de *Synechococcus elongatus*, *Cianotheca* sp., *Synechosystis* sp. y *Prochlorococcus marinus*. Una enzima que tiene actividad alcohol deshidrogenasa (ADH) o aldehído reductasa (AR) (véase la tabla 4) puede convertir entonces el 3' OH aldehído en un diol graso tal como 1,3-diol. Por tanto, la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, proporciona microorganismos recombinantes que pueden producir de manera eficaz y selectiva 1,3-dioles *in vivo*. Debe indicarse que la mayoría de las células producen de manera nativa enzimas que pueden reducir aldehídos, ya que pueden ser citotóxicos. Por consiguiente, puede no requerirse la expresión heteróloga de AR y ADH para la producción de dioles y alcoholes grasos, pero pueden mejorar la eficacia con la que se producen alcoholes grasos y dioles.

Además, pueden atenuarse opcionalmente en las células huésped polinucleótidos que codifican para polipéptidos con actividad enzimática de degradación de ácidos grasos. Ejemplos no limitativos de tales polipéptidos son acil-CoA sintetasa (tal como *E. coli* FadD) y acil-CoA deshidrogenasa (tal como *E. coli* FadE). La tabla 1 proporciona una lista completa de actividades enzimáticas en rutas metabólicas a modo de ejemplo, incluyendo diversas enzimas de degradación de ácidos grasos que pueden atenuarse opcionalmente según métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 8.283.143, anteriormente). Por ejemplo, FadR (véase la tabla 1) es un factor regulador clave implicado en la degradación de ácidos grasos y las rutas biosintéticas de ácidos grasos en *E. coli* (Cronan *et al.*, Mol. Microbiol., 29(4): 937-943 (1998)). La enzima FadD de *E. coli* (véase la tabla 1) y la proteína transportadora de ácidos grasos FadL son componentes de un sistema de captación de ácidos grasos. FadL y sus homólogos median el transporte de ácidos grasos al interior de la célula bacteriana, y FadD y sus homólogos median la formación de ésteres de acil-CoA. Como alternativa, el sistema de captación heterólogo para ácidos grasos y derivados de ácidos grasos es la proteína AlkL de membrana externa de *Pseudomonas* (Julsing *et al.* (2012) Appl. Environ. Microbiol. 78:5724-5733). Cuando no está disponible otra fuente de carbono, las bacterias captan ácidos grasos exógenos y los convierten en ésteres de acil-CoA, que pueden unirse al factor de transcripción FadR y reducir la expresión de los genes *fad* que codifican para proteínas responsables del transporte de (FadL), la activación (FadD) y la β -oxidación (FadA, FadB y FadE) de ácidos grasos. Cuando se dispone de fuentes de carbono alternativas, las bacterias sintetizan ácidos grasos como acil-ACP, que se usan para la síntesis de fosfolípidos, pero no son sustratos para la β -oxidación. Por tanto, acil-CoA y acil-ACP son ambas fuentes independientes de ácidos grasos que pueden dar como resultado diferentes productos finales (Caviglia *et al.*, J. Biol. Chem., 279(12): 1163-1169 (2004)). FadR y/o FabB y sus homólogos funcionales pueden potenciar la producción de derivados de ácidos grasos en células huésped (por ejemplo, *E. coli*) pero su sobreexpresión es opcional. En el presente documento, se contempla que la sobreexpresión de FabB puede aumentar la tasa de elongación (síntesis de cadenas de ácidos grasos), y la sobreexpresión de FadR puede aumentar la expresión de FabA y FabB. Esto último es posible porque se contempla que FadR sea un regulador positivo de FabA y FabB.

Tabla 1: Actividades enzimáticas

Designación de gen	Organismo fuente	Nombre de enzima	N.º de registro	Número de EC	Uso a modo de ejemplo
Aumento de producción de ácidos grasos					
<i>accA</i>	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>), <i>Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad A (carboxiltransferasa alfa)	AAC73296, NP_414727	6.4.1.2	Aumentar la producción de malonil-CoA
<i>accB</i>	<i>E. coli</i> , <i>Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad B (BCCP: proteína	NP_417721	6.4.1.2	Aumentar la producción de malonil-CoA

ES 2 700 578 T3

		transportadora de biotina y carboxilo)			
accC	<i>E. coli, Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad C (biotina carboxilasa)	NP_417722	6.4.1.2, 6.3.4.14	aumentar la producción de malonil-CoA
accD	<i>E. coli, Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad D (carboxiltransferasa beta)	NP_416819	6.4.1.2	aumentar la producción de malonil-CoA
fadD	<i>E. coli W3110</i>	acil-CoA sintasa	AP_002424	2.3.1.86, 6.2.1.3	aumentar la producción de ácidos grasos
fabA	<i>E. coli K12</i>	β -hidroxidecanoil tioéster deshidratasa/iso-merasa	NP_415474	4.2.1.60	aumentar la producción de acil graso-ACP/CoA
fabB	<i>E. coli</i>	3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] sintasa I	BAA16180	2.3.1.41	aumentar la producción de acil graso-ACP/CoA
fabD	<i>E. coli K12</i>	[proteína transportadora de acilo]S-maloniltransferasa	AAC74176	2.3.1.39	aumentar la producción de acil graso-ACP/CoA
fabF	<i>E. coli K12</i>	3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] sintasa II	AAC74179	2.3.1.179	aumentar la producción de acil graso-ACP/CoA
fabG	<i>E. coli K12</i>	3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] reductasa	AAC74177	1.1.1.100	aumentar la producción de acil graso-ACP/CoA
fabH	<i>E. coli K12</i>	3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] sintasa III	AAC74175	2.3.1.180	aumentar la producción de acil graso-ACP/CoA
fabI	<i>E. coli K12</i>	enoil-[proteína transportadora de acilo]reductasa	NP_415804	1.3.1.9	aumentar la producción de acil graso-ACP/CoA
fabR	<i>E. coli K12</i>	Represora de la transcripción	NP_418398	ninguno	modular la producción de ácidos grasos insaturados
fabV	<i>Vibrio cholerae</i>	enoil-[proteína transportadora de acilo]reductasa	YP_001217283	1.3.1.9	aumentar la producción de acil graso-ACP/CoA
fabZ	<i>E. coli K12</i>	(3R)-hidroximiristol-proteína transportadora de acilo-deshidratasa	NP_414722	4.2.1.-	aumentar la producción de acil graso-ACP/CoA

ES 2 700 578 T3

fadE	<i>E. coli</i> K13	acil-CoA deshidrogenasa	AAC73325	1.3.99.3, 1.3.99.-	reducir la degradación de ácidos grasos
fadD	<i>E. coli</i> K12	acil-CoA sintetasa	NP_416319	6.2.1.3	reducir la degradación de ácidos grasos
fadA	<i>E. coli</i> K12	3-cetoacil-CoA tiolasa	YP_02627	2.3.1.16	reducir la degradación de ácidos grasos
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 ácidos grasos
fadR	<i>E. coli</i>	proteína reguladora de la transcripción	NP_415705	ninguno	degradación en bloque o inversa de ácidos grasos
Control de longitud de cadena					
tesA (con o sin secuencia líder)	<i>E. coli</i>	tioesterasa la secuencia líder incluye los aminoácidos 1-26	P0ADA1	3.1.2.2.-, 3.1.1.5, 3.1.2.14	C18 de longitud de cadena
tesA (sin secuencia líder)	<i>E. coli</i>	tioesterasa	AAC73596, NP_415027	3.1.2.2.-, 3.1.1.5, 3.1.2.14	C18:1 de longitud de cadena
tesA (mutante de tioesterasa I de <i>E. coli</i> complejada con ácido octanoico)	<i>E. coli</i>	tioesterasa	L109P	3.1.2.2.-, 3.1.1.5, 3.1.2.14	<C18 de longitud de cadena
fatB1	<i>Umbellularia californica</i>	tioesterasa	Q41635	3.1.2.14	C12:0 de longitud de cadena
fatB2	<i>Cuphea hookeriana</i>	tioesterasa	AAC49269	3.1.2.14	C8:0 - C10:0 de longitud de cadena
fatB3	<i>Cuphea hookeriana</i>	tioesterasa	AAC72881	3.1.2.14	C14:0 - C16:0 de longitud de cadena
fatB	<i>Cinnamomum camphora</i>	tioesterasa	Q39473	3.1.2.14	C14:0 de longitud de cadena
fatB	<i>Arabidopsis thaliana</i>	tioesterasa	CAA85388	3.1.2.14	C16:1 de longitud de cadena
fatA1	<i>Helianthus annuus</i>	tioesterasa	AAL79361	3.1.2.14	C18:1 de longitud de cadena
fatA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	tioesterasa	NP_189147, NP_193041	3.1.2.14	C18:1 de longitud de cadena
fatA	<i>Brassica juncea</i>	tioesterasa	CAC39106	3.1.2.14	C18:1 de longitud de cadena
fatA	<i>Cuphea hookeriana</i>	tioesterasa	AAC72883	3.1.2.14	C18:1 de longitud de cadena

ES 2 700 578 T3

tes	<i>Photobacterium profundum</i>	tioesterasa	YP_130990	3.1.2.2., 3.1.2.14	Longitud de cadena
tesB	<i>E. coli</i>	tioesterasa	NP_414986	3.1.2.2.	Longitud de cadena
fadM	<i>E. coli</i>	tioesterasa	NP_414977	3.1.2.2.	Longitud de cadena
yciA	<i>E. coli</i>	tioesterasa	NP_415769	3.1.2.2.	Longitud de cadena
ybgC	<i>E. coli</i>	tioesterasa	NP_415264	3.1.2.2.	Longitud de cadena
phaG	<i>Pseudomonas putida</i>	Tioesterasa, 3-hidroxiacil-CoA-proteína transportadora de acilo-transferasa	AAN67031	3.1.2.14,	C6 a C12 de longitud de cadena
Control de nivel de saturación					
Sfa	<i>E. coli</i>	Supresor de fabA	AAN79592, AAC44390	ninguno	aumentar ácidos grasos monoinsaturados
fabA	<i>E. coli K12</i>	β -hidroxidecanoil tioéster deshidratasa/isomerasa	NP_415474	4.2.1.60	producir ácidos grasos insaturados
GnsA	<i>E. coli</i>	supresores de la mutación nula de secG	ABD18647.1	ninguno	aumentar ésteres de ácidos grasos insaturados
GnsB	<i>E. coli</i>	supresores de la mutación nula de secG	AAC74076.1	ninguno	aumentar ésteres de ácidos grasos insaturados
fabB	<i>E. coli</i>	3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] sintasa I	BAA16180	2.3.1.41	modular la producción de ácidos grasos insaturados
des	<i>Bacillus subtilis</i>	D5 acil graso desaturasa	O34653	1.14.19	modular la producción de ácidos grasos insaturados
Producción de éster					
AT3G51970	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Alcohol de cadena larga-O-acil graso transferasa	NP_190765	2.3.1.26	producción de éster
ELO1	<i>Pichia angusta</i>	ácido graso elongasa	BAD98251	2.3.1.-	producir ácidos grasos de cadena muy larga
plsC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	aciltransferasa	AAA16514	2.3.1.51	producción de éster
DAGAT/DG AT	<i>Arabidopsis thaliana</i>	diacilglicerol aciltransferasa	AAF19262	2.3.1.20	producción de éster
hWS	<i>Homo sapiens</i>	acil-CoA alcohol de cera aciltransferasa	AAX48018	2.3.1.20	producción de éster
aft1	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	éster de cera bifuncional sintasa/acil-CoA:	AAO17391	2.3.1.20	producción de éster

ES 2 700 578 T3

		diacilglicerol aciltransferasa			
ES9	<i>Marinobacter hidrocarbono-clasticus</i>	éster de cera sintasa	ABO21021	2.3.1.20	producción de éster
mWS	<i>Simmondsia chinensis</i>	éster de cera sintasa	AAD38041	2,3.1.-	producción de éster
Rendimiento de alcohol graso					
		tioesterasas (véase anteriormente)			aumentar la producción de ácidos grasos/alcoholes grasos
BmFAR	<i>Bombyx mori</i>	FAR (acil-CoA reductasa de formación de alcohol graso)	BAC79425	1.2.1.50, 1.2.1.84	convertir acil-CoA en alcohol graso
acr1	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	acil-CoA reductasa	YP_047869	1.2.1.42, 1.2.1.50	reducir acil graso-CoA para dar aldehídos grasos
yqhD	<i>E. coli W3110</i>	alcohol deshidrogenasa	AP_003562	1.1.1.-	reducir aldehídos grasos para dar alcoholes grasos; aumentar la producción de alcoholes grasos
alrA	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	alcohol deshidrogenasa	CAG70252	1.1.1.-	reducir aldehídos grasos para dar alcoholes grasos
GTNG_1865	<i>Geobacillus thermode nitrificans NG80-2</i>	Aldehído de cadena larga deshidrogenasa	YP_001125970	1.2.1.3	reducir aldehídos grasos para dar alcoholes grasos
AAR	<i>Synechococcus elongatus</i>	Acil-ACP reductasa	YP_400611	1.2.1.42	reducir acil graso-ACP/CoA para dar aldehídos grasos
carB	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Proteína ácido carboxílico reductasa	YP_889972	6.2.1.3, 1.2.1.42	reducir ácidos grasos para dar aldehídos grasos
FadD	<i>E. coli K12</i>	acil-CoA sintetasa	NP_416319	6.2.1.3	activa ácidos grasos para dar acil graso-CoA
atoB	<i>Erwinia carotovora</i>	acetil-Co A acetiltransferasa	YP_049388	2.3.1.9	producción de butanol
hbd	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Beta-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa	BAD51424	1.1.1.157	producción de butanol
CPE0095	<i>Clostridium perfringens</i>	crotonasa-butiril-CoA deshidrogenasa	BAB79801	4.2.1.55	producción de butanol
bcd	<i>Clostridium beijerinckii</i>	butiril-CoA deshidrogenasa	AAM14583	1.3.99.2	producción de butanol

ES 2 700 578 T3

ALDH	<i>Clostridium beijerinckii</i>	coenzima A-aldehído acilante deshidrogenasa	AAT66436	1.2.1.3	producción de butanol
AdhE	<i>E. coli CFT073</i>	aldehído-alcohol deshidrogenasa	AAN80172	1.1.1.1, 1.2.1.10	producción de butanol
Rendimiento de éster de acetilo de alcohol graso					
		tioesterasas (véase anteriormente)			modificar el rendimiento
acr1	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	acil-CoA reductasa	YP_047869	1.2.1.42, 1.2.1.50	modificar el rendimiento
yqhD	<i>E. coli K12</i>	alcohol deshidrogenasa	AP_003562	1.1.-.-	modificar el rendimiento
AAT	<i>Fragaria xananassa</i>	alcohol O-acetiltransferasa	AAG13130	2.3.1.84	modificar el rendimiento
Rendimiento de olefina terminal					
OleT	<i>Jeotgalicoccus sp</i>	Ácido graso descarboxilasa	HQ709266	1.11.2.4	descarboxilar ácidos grasos
Exportación de producto					
AtMRP5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Asociada con resistencia a múltiples fármacos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_171908	ninguno	modificar cantidad de exportación de producto
AmiS2	<i>Rhodococcus sp.</i>	Transportador ABC AmiS2	JC5491	ninguno	modificar cantidad de exportación de producto
AtPGP1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	p-glicoproteína 1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_181228	ninguno	modificar cantidad de exportación de producto
AcrA	<i>Candidatus Protochlamydia amoebophila UWE25</i>	posible proteína de transporte de eflujo de múltiples fármacos, acrA	CAF23274	ninguno	modificar cantidad de exportación de producto
AcrB	<i>Candidatus Protochlamydia amoebophila UWE25</i>	probable proteína de transporte de eflujo de múltiples fármacos, acrB	CAF23275	ninguno	modificar cantidad de exportación de producto
TolC	<i>Francisella tularensis subsp. novicida</i>	proteína de la membrana externa [envuelta celular, biogénesis]	ABD59001	ninguno	modificar cantidad de exportación de producto
AcrE	<i>Shigella sonnei Ss046</i>	proteína transmembrana que afecta a la formación de septo y a la permeabilidad de la membrana celular	YP_312213	ninguno	modificar cantidad de exportación de producto
AcrF	<i>E. coli</i>	proteína F de resistencia a acriflavina	F P24181	ninguno	modificar cantidad de exportación de producto

ES 2 700 578 T3

tl1619	<i>Thermosynechococcus elongatus [BP-1]</i>	transportador de eflujo de múltiples fármacos	NP_682409.1	ninguno	modificar cantidad de exportación de producto
tl10139	<i>Thermosynechococcus elongatus [BP-1]</i>	transportador de eflujo de múltiples fármacos	NP_680930.1	ninguno	modificar cantidad de exportación de producto
AlkL	<i>Pseudomonas putida</i>	proteína de la membrana externa	YP_009076010	ninguno	modificar cantidad de exportación de producto
Fermentación					
genes de control de la replicación					aumentar la eficacia de rendimiento
umuD	<i>Shigella sonnei Ss046</i>	ADN polimerasa V, subunidad	YP_310132	3.4.21.-	aumentar la eficacia de rendimiento
umuC	<i>E. coli</i>	ADN polimerasa V, subunidad	ABC42261	2.7.7.7	aumentar la eficacia de rendimiento
pntA, pntB	<i>Shigella flexneri</i>	NADH:NADPH transhidrogenasa (subunidades alfa y beta)	P07001, P0AB70	1.6.1.2	aumentar la eficacia de rendimiento
Otra					
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</i>	13 enoil-(proteína transportadora 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	4.2.1.7	Contribuye a la biosíntesis de ácidos grasos

Tabla 2: Actividad tioesterasa

Designación/nombre	Organismo	Número de EC
tesA (con o sin secuencia líder)	<i>Escherichia coli</i>	3.1.2.2- o 3.1.2.14 o 3.1.1.5
tesA (sin secuencia líder)	<i>Escherichia coli</i>	3.1.2.2- o 3.1.2.14 o 3.1.1.5
tes	<i>Photobacterium profundum</i>	3.1.2.2 o 3.1.2.14
tesB	<i>Escherichia coli</i>	3.1.2.2
TE_CAD63310	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3.1.2.2 o 3.1.2.14
TE_EEI82564	<i>Anaerococcus tetradium</i>	3.1.2.2 o 3.1.2.14
fatB1	<i>Umbellularia californica</i>	3.1.2.14
fatB2	<i>Cuphea hookeriana</i>	3.1.2.14
fatB 3	<i>Cuphea hookeriana</i>	3.1.2.14
fatB	<i>Cinnamomum camphora</i>	3.1.2.14
fatB	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3.1.2.14
fatA1	<i>Helianthus annuus</i>	3.1.2.14
fatA	<i>Brassica juncea</i>	3.1.2.14
fatA	<i>Cuphea hookeriana</i>	3.1.2.14
fadM	<i>Escherichia coli</i>	3.1.2.2
yciA	<i>Escherichia coli</i>	3.1.2.2
ybgC	<i>Escherichia coli</i>	3.1.2.2
phaG	<i>Pseudomonas putida</i>	3.1.2.2 o 3.1.2.14

Tabla 3: Actividad ácido carboxílico reductasa (CAR)

Designación/nombre	Organismo	Registro Genpetp	Número de EC
carB	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	YP_889972	1.2.99.6
carA	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ABK75684	1.2.99.6
FadD9	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	WP_003897160	1.2.99.6
car	<i>Mycobacterium genavense</i>	WP_025734970	1.2.99.6
car	<i>Nocardia iowensis</i>	Q6RKB1	1.2.99.6
car	<i>Nocardia brasiliensis</i>	WP_029899937	1.2.99.6

Tabla 4: Actividad alcohol deshidrogenasa (ADH) o aldehído reductasa (AR)

Designación/nombre	Organismo	Número de EC
yqhD	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.1 o 1.1.1.2
alrA	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	1.1.1.1 o 1.1.1.2
yigB	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.1 o 1.1.1.2
yahK	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.1 o 1.1.1.2
adhP	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.1 o 1.1.1.2
ydjL	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.1 o 1.1.1.2
yhdH	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.1 o 1.1.1.2
yafB (dkgB)	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.1 o 1.1.1.2
yqhE (dkgA)	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.1 o 1.1.1.2
ybbo	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.1 o 1.1.1.2
gldA	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.1 o 1.1.1.2

La divulgación identifica polinucleótidos que codifican para polipéptidos con actividad enzimática que son útiles en las células huésped recombinantes y los métodos de producción. Los polipéptidos con actividad enzimática contribuyen a la producción de composiciones que incluyen los compuestos de diol graso. Generalmente se reconocerá que no es necesaria la identidad de secuencia absoluta con tales polinucleótidos. Por ejemplo, pueden realizarse cambios en una secuencia de polinucleótido particular (por ejemplo, un polinucleótido que codifica para un polipéptido con función enzimática) y puede seleccionarse el polipéptido codificado por su actividad. Tales cambios normalmente comprenden mutaciones conservativas y mutaciones silenciosas (por ejemplo, optimización de codones). Los polinucleótidos modificados o modificados genéticamente por ingeniería genética y los polipéptidos variantes codificados pueden seleccionarse para una función deseada, incluyendo pero sin limitarse a, actividad catalítica aumentada, estabilidad aumentada o inhibición disminuida (por ejemplo, inhibición de realimentación disminuida), usando métodos conocidos en la técnica.

Además, la divulgación identifica actividades enzimáticas implicadas en diversas etapas (es decir, reacciones) de rutas modificadas por ingeniería genética implicadas en la producción de dioles grasos, tal como se describe en el presente documento (anteriormente) según el número de clasificación de enzimas (EC), y proporciona polipéptidos a modo de ejemplo (por ejemplo, enzimas) clasificadas por tales números de EC, y polinucleótidos a modo de ejemplo que codifican para tales polipéptidos. Tales polipéptidos y polinucleótidos a modo de ejemplo, que se identifican en el presente documento por los números de registro y/o números de identificación de secuencia (SEQ ID NO), son útiles para rutas de ácidos grasos modificadas por ingeniería genética que conducen a la producción de dioles grasos incluyendo 1,3-dioles grasos en células huésped parentales para obtener las células huésped recombinantes o modificadas genéticamente descritas en el presente documento. Los polipéptidos y polinucleótidos descritos en el presente documento son a modo de ejemplo y no limitativos. Las secuencias de homólogos de polipéptidos a modo de ejemplo descritos en el presente documento están disponibles para los expertos en la técnica a través de diversas bases de datos (por ejemplo, la bases de datos Entrez proporcionadas por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (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 KEGG proporcionada por el Centro de Bioinformática de la Universidad de Kioto y la Universidad de Tokio, estando todas ellas disponibles en la red informática mundial).

Fermentación y producción de dioles grasos

Tal como se usa en el presente documento, fermentación se refiere de manera amplia a la conversión de materiales orgánicos en sustancias objetivo mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, esto incluye la conversión de una fuente de carbono mediante células huésped recombinantes en derivados de ácidos grasos tales como dioles grasos mediante propagación de un cultivo de las células huésped recombinantes en unos medios que comprenden la fuente de carbono. Las condiciones que permiten la producción de las sustancias objetivo tales como dioles grasos y/o alcoholes grasos son cualquier condición que permite que una célula huésped produzca un producto deseado, tal como una composición de dioles grasos. De manera similar, esto incluye cualquier condición en la que la secuencia de polinucleótido de un vector que se expresa en las células huésped permite que las células huésped sinteticen el polipéptido objetivo. Las condiciones adecuadas incluyen, por ejemplo, condiciones de fermentación típicas. Las condiciones de fermentación pueden incluir muchos parámetros, incluyendo, pero sin limitarse a, intervalos de temperatura, niveles de pH, niveles de aireación, tasas de alimentación y composición de medios. Cada una de estas condiciones, de manera individual y en combinación, permite que la célula huésped crezca. La fermentación puede ser aeróbica, anaeróbica o variaciones de las mismas (tales como microaeróbica). Los medios de cultivo a modo de ejemplo incluyen caldos (líquido) o geles (sólido). Generalmente, el medio incluye una fuente de carbono (por ejemplo, una fuente de carbono simple derivada de una materia prima renovable) que puede metabolizarse directamente por una célula huésped. Además, pueden usarse enzimas en el medio para facilitar la movilización (por ejemplo, la despolimerización de almidón o celulosa para dar azúcares fermentables) y el posterior metabolismo de la fuente de carbono.

Para la producción a pequeña escala, las células huésped modificadas por ingeniería genética pueden hacerse crecer en lotes, por ejemplo, de aproximadamente 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl, 500 µl, 1 ml, 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; fermentarse; e inducirse para expresar secuencias de

polinucleótido deseadas, tales como unos polinucleótidos que codifican para polipéptidos que tienen actividad enzimática específica (por ejemplo, actividad enzimática TE, CAR, ADH, FAR, ACR, ACC y/o AAR). Para la producción a gran escala, las células huésped modificadas por ingeniería genética pueden hacerse crecer en cultivos que tienen un volumen de lotes de aproximadamente 10 l, 100 l, 1000 l, 10.000 l, 100.000 l, 1.000.000 l o más; fermentarse; e inducirse para expresar cualquier secuencia de polinucleótido deseada. Las composiciones de dioles grasos descritas en el presente documento pueden encontrarse en el entorno extracelular del cultivo de células huésped recombinantes y pueden aislarse fácilmente del medio de cultivo. Un derivado de ácido graso tal como un diol graso y/o un alcohol graso puede secretarse por la célula huésped recombinante, transportarse al entorno extracelular o transferirse pasivamente al entorno extracelular del cultivo de células huésped recombinantes. La composición de dioles grasos puede aislarse de un cultivo de células huésped recombinantes usando métodos rutinarios conocidos en la técnica.

Con el fin de producir dioles grasos, se realizaron varias modificaciones a células huésped de producción (anteriormente). Por tanto, la divulgación proporciona células huésped recombinantes que se han modificado por ingeniería genética para proporcionar una ruta de biosíntesis con respecto a células huésped nativas o no modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, células huésped silvestres que funcionan como células de control), lo cual se logra, por ejemplo, mediante mejoras de cepa específicas. Pueden usarse microorganismos tales como bacterias, cianobacterias, levadura, algas u hongos filamentosos como huéspedes de producción. Los ejemplos no limitativos de microorganismos que pueden usarse como huéspedes de producción incluyen *E. coli*, *S. cerevisiae* y otros. Las cepas microbianas convierten eficazmente glucosa u otras materias primas renovables en derivados de ácidos grasos, incluyendo alcoholes grasos y dioles grasos. Con el fin de lograr eso, se han modificado cuidadosamente las cepas por ingeniería genética para expresar enzimas clave con funcionalidades específicas. Se han establecido protocolos y procedimientos para fermentaciones de alta densidad para la producción de diversos compuestos (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 8.372.610; 8.323.924; 8.313.934; 8.283.143; 8.268.599; 8.183.028; 8.110.670; 8.110.093; y 8.097.439).

De manera notable, hasta ahora no existían métodos para producir de manera directa y eficaz dioles grasos, incluyendo 1,3-dioles a partir de glucosa u otras materias primas renovables. Sin embargo, estos dioles grasos encuentran uso como componentes para detergentes, tensioactivos, emulsionantes, emolientes, disolventes, plásticos y aditivos alimenticios. El método basado en fermentación para la producción de dioles grasos y composiciones de los mismos tal como se presenta en el presente documento proporciona una alternativa respetuosa con el medio ambiente a los métodos químicos empleados en la técnica. En algunas realizaciones, la célula huésped se cultiva en un medio de cultivo (por ejemplo, medio de fermentación) que comprende una concentración inicial de una fuente de carbono (por ejemplo, una fuente de carbono simple) de aproximadamente 20 g/l a aproximadamente 900 g/l. En otras realizaciones, el medio de cultivo comprende una concentración inicial de una fuente de carbono de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 10 g/l; de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 20 g/l; de aproximadamente 20 g/l a aproximadamente 30 g/l; de aproximadamente 30 g/l a aproximadamente 40 g/l; o de aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 50 g/l. En algunas realizaciones, el nivel de fuente de carbono disponible en el medio de cultivo puede monitorizarse durante el avance de la fermentación. En algunas realizaciones, el método incluye además añadir una fuente de carbono complementaria al medio de cultivo cuando el nivel de la fuente de carbono inicial en el medio es de menos de aproximadamente 0,5 g/l. En algunas realizaciones, se añade una fuente de carbono complementaria al medio de cultivo cuando el nivel de la fuente de carbono en el medio es de menos de aproximadamente 0,4 g/l, menos de aproximadamente 0,3 g/l, menos de aproximadamente 0,2 g/l, o menos de aproximadamente 0,1 g/l. En algunas realizaciones, la fuente de carbono complementaria se añade para mantener un nivel de fuente de carbono de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 25 g/l. En algunas realizaciones, la fuente de carbono complementaria se añade para mantener un nivel de fuente de carbono de aproximadamente 2 g/l o más (por ejemplo, aproximadamente 2 g/l o más, aproximadamente 3 g/l o más, aproximadamente 4 g/l o más). En determinadas realizaciones, la fuente de carbono complementaria se añade para mantener un nivel de fuente de carbono de aproximadamente 5 g/l o menos (por ejemplo, aproximadamente 5 g/l o menos, aproximadamente 4 g/l o menos, aproximadamente 3 g/l o menos). En algunas realizaciones, la fuente de carbono complementaria se añade para mantener un nivel de fuente de carbono de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 5 g/l, de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 10 g/l, o de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 25 g/l.

En una realización la fuente de carbono para la fermentación se deriva de una materia prima renovable. En algunas realizaciones, la fuente de carbono es glucosa. En otras realizaciones, la fuente de carbono es glicerol. Otras fuentes de carbono posibles incluyen, pero no se limitan a, fructosa, manosa, galactosa, xilosa, arabinosa, almidón, celulosa, pectina, xilano, sacarosa, maltosa, celobiosa y turanosa; material celulósico y variantes tales como hemicelulosas, metilcelulosa y carboximetilcelulosa de sodio; ácidos grasos saturados o insaturados, succinato, lactato y acetato; alcoholes, tales como etanol, metanol, y glicerol, o mezclas de los mismos. En una realización, la fuente de carbono se deriva de maíz, caña de azúcar, sorgo, remolacha, pasto varilla, ensilaje, paja, madera, pulpa, aguas residuales, basura, residuos urbanos celulósicos, gas de combustión, gas de síntesis o dióxido de carbono. La fuente de carbono simple también puede ser un producto de fotosíntesis, tal como glucosa o sacarosa. En una realización, la fuente de carbono se deriva de un producto residual tal como glicerol, gas de combustión o gas sintético; o de la reformación de materiales orgánicos tales como biomasa; o de gas natural o de metano, o de la reformación de estos materiales para dar gas de síntesis; o de dióxido de carbono que se fija por fotosíntesis, por

ejemplo pueden producirse 1,3-dioles mediante cianobacterias recombinantes que crecen por fotosíntesis y usan CO₂ como fuente de carbono. En determinadas realizaciones, la fuente de carbono se deriva de biomasa. Una fuente de biomasa a modo de ejemplo es materia vegetal o vegetación, tal como maíz, caña de azúcar o pasto varilla. Otra fuente de biomasa a modo de ejemplo son productos residuales metabólicos, tales como materia animal (por ejemplo, estiércol de vacas). Las fuentes de biomasa a modo de ejemplo adicionales incluyen algas y otras plantas marinas. La biomasa también incluye productos residuales de la industria, agricultura, explotación forestal y domésticos, incluyendo, pero sin limitarse a, residuos de fermentación, ensilaje, paja, madera, aguas residuales, basura, residuos urbanos celulósicos, residuos sólidos municipales, y restos de alimentos.

En algunas realizaciones, el diol graso (es decir 1,3-diol) se produce a una concentración de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 40 g/l. En algunas realizaciones, el diol graso se produce a una concentración de aproximadamente 1 g/l o más (por ejemplo, aproximadamente 1 g/l o más, aproximadamente 10 g/l o más, aproximadamente 20 g/l o más, aproximadamente 50 g/l o más, aproximadamente 100 g/l o más). En algunas realizaciones, el diol graso se produce a una concentración de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 170 g/l, de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 10 g/l, de aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 170 g/l, de aproximadamente 100 g/l a aproximadamente 170 g/l, de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 100 g/l, de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 40 g/l, de aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 100 g/l, o de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 100 g/l.

En algunas realizaciones, el 1,3-diol graso se produce a 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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 (2 g/l), 3 g/l, 5 g/l, 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l o un intervalo limitado por dos cualesquiera de los valores anteriores. En otras realizaciones, un diol graso (por ejemplo, 1,3-diol) se produce a un título de más de 100 g/l, más de 200 g/l, más de 300 g/l, o superior, tal como 500 g/l, 700 g/l, 1000 g/l, 1200 g/l, 1500 g/l o 2000 g/l. Un título preferido de un diol graso tal como un 1,3-diol producido por una célula huésped recombinante según los métodos de la divulgación es de desde 5 g/l hasta 200 g/l, de 10 g/l a 150 g/l, de 20 g/l a 120 g/l y de 30 g/l a 100 g/l, de 100 g/l a 150 g/l, y de 120 g/l a 180 g/l. En una realización, el título de un 1,3-diol producido por una célula huésped recombinante según los métodos de la invención es de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 250 g/l y más particularmente de 90 g/l a aproximadamente 120 g/l. El título puede referirse a un 1,3-diol particular o a una combinación de 1,3-dioles de diferente longitud de cadena o diferentes funcionalidades producidos por un cultivo de células huésped recombinantes dado.

En otras realizaciones, las células huésped modificadas por ingeniería genética para producir un 1,3-diol según los métodos de la invención tienen un rendimiento de al menos el 1%, al menos el 2%, al menos el 3%, al menos el 4%, al menos el 5%, al menos el 6%, al menos el 7%, al menos el 8%, al menos el 9%, al menos el 10%, al menos el 11%, al menos el 12%, al menos el 13%, al menos el 14%, al menos el 15%, al menos el 16%, al menos el 17%, al menos el 18%, al menos el 19%, al menos el 20%, al menos el 21%, al menos el 22%, al menos el 23%, al menos el 24%, al menos el 25%, al menos el 26%, al menos el 27%, al menos el 28%, al menos el 29% o al menos el 30% o al menos el 40% o un intervalo limitado por dos cualesquiera de los valores anteriores. En otras realizaciones, un 1,3-diol se produce a un rendimiento de más del 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o más. Alternativamente, o de manera adicional, el rendimiento es de aproximadamente el 30% o menos, aproximadamente el 27% o menos, aproximadamente el 25% o menos, o aproximadamente el 22% o menos. Por tanto, el rendimiento puede estar limitado por dos cualesquiera de los puntos finales anteriores. Por ejemplo, el rendimiento de un 1,3-diol producido por la célula huésped recombinante según los métodos de la invención pueden ser del 5% al 15%, del 10% al 25%, del 10% al 22%, del 15% al 27%, del 18% al 22%, del 20% al 28% o del 20% al 30%. En una realización particular, el rendimiento de un 1,3-diol producido por la célula huésped recombinante es de

aproximadamente el 10% a aproximadamente el 40%. En otra realización particular, el rendimiento de un 1,3-diol producido por la célula huésped recombinante es de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 30%. El rendimiento puede referirse a un 1,3-diol particular o a una combinación de 1,3-dioles producidos por un cultivo de células huésped recombinantes dado. Además, el rendimiento también dependerá de la materia prima usada.

5 En algunas realizaciones, la productividad de un 1,3-diol producido por una célula huésped recombinante es de 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 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, 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. Por ejemplo, la productividad de un 1,3-diol producido por una célula huésped recombinante según los métodos de la invención puede ser de desde 500 mg/l/hora hasta 2500 mg/l/hora o desde 700 mg/l/hora hasta 2000 mg/l/hora. En una realización particular, la productividad es de aproximadamente 0,7 mg/l/h a aproximadamente 3 g/l/h. La productividad puede referirse a un 1,3-diol particular producido por un cultivo de células huésped recombinantes dado.

En algunas realizaciones, la célula huésped usada en los procedimientos de fermentación de la invención es una célula de mamífero, célula vegetal, célula de insecto, célula de levadura, célula de hongo, célula de hongo filamentoso, una célula de alga, una célula de cianobacteria, y célula bacteriana. En realizaciones particulares, la célula huésped se selecciona de los géneros *Escherichia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Rhodococcus*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Chrysosporium*, *Saccharomyces*, *Stenotrophomonas*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia* o *Streptomyces*. En otras realizaciones, la célula huésped es 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 *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 realizaciones, la célula huésped es una célula de *Pseudomonas putida*. En determinadas realizaciones, la célula huésped es *Synechococcus sp. PCC7002*, *Synechococcus elongatus PCC 7942*, *Synechocystis sp. PCC 6803*, *Synechococcus elongatus PCC6301*, *Prochlorococcus marinus CCMP1986 (MED4)*, *Anabaena variabilis ATCC29413*, *Nostoc punctiforme ATCC29133 (PCC73102)*, *Gloeobacter violaceus ATCC29082 (PCC7421)*, *Nostoc sp. ATCC27893 (PCC7120)*, *Cianothece sp. PCC7425 (29141)*, *Cianothece sp. ATCC51442 o Synechococcus sp. ATCC27264 (PCC7002)*. En otras realizaciones, la célula huésped es una célula de *Trichoderma koningii*, una célula de *Trichoderma viride*, una célula de *Trichoderma reesei*, una célula de *Trichoderma longibrachiatum*, una célula de *Aspergillus awamori*, una célula de *Aspergillus fumigates*, una célula de *Aspergillus foetidus*, una célula de *Aspergillus nidulans*, una célula de *Aspergillus niger*, una célula de *Aspergillus oryzae*, una célula de *Humicola insolens*, una célula de *Humicola lanuginosa*, una célula de *Rhodococcus opacus*, una célula de *Rhizomucor miehei* o una célula de *Mucor miehei*. En otras realizaciones, la célula huésped es una célula de *Actinomyces*. En aún otras realizaciones, la célula huésped es una célula de *Streptomyces lividans* o una célula de *Streptomyces murinus*. En otras realizaciones, la célula huésped es una célula de *Saccharomyces cerevisiae*.

En aún otras realizaciones, la célula huésped es una célula de una planta eucariota, alga, cianobacteria, bacteria verde del azufre, bacteria verde no del azufre, bacteria púrpura del azufre, bacteria púrpura no del azufre, extremófilo, levadura, hongo, organismos modificados por ingeniería genética de los mismos o un organismo sintético. En determinadas realizaciones, la célula huésped es una célula de *Arabidopsis thaliana*, *Panicum virgatum*, *Miscanthus giganteus*, *Zea mays*, *Botryococcuse braunii*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Thermosynechococcus elongatus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus sp.*, *Synechocystis sp.*, *Clorobium tepidum*, *Cloroflexus auranticus*, *Chromatium vinosum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridiumthermocellum* o *Penicillium chrysogenum*. En determinadas otras realizaciones, la célula huésped es de *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* o *Zymomonas mobilis*. En realizaciones aún adicionales, la célula huésped es una célula de *Synechococcus sp. PCC 7002*, *Synechococcus sp. PCC 7942* o *Synechocystis sp. PCC6803*. En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula CHO, una célula COS, una célula VERO, una célula BHK, una célula HeLa, una célula Cv1, una célula MDCK, una célula 293, una célula 3T3 o una célula PC12. En realizaciones particulares, la célula huésped es una célula de *E. coli*. En algunas realizaciones, la célula de *E. coli* es una célula de *E. coli* de cepa B, cepa C, cepa K o cepa W.

Composiciones y formulaciones de dioles grasos

Los bioproductos (por ejemplo, las composiciones de dioles grasos producidas según la presente invención) que incluyen compuestos orgánicos biológicamente producidos, y en particular, las composiciones de dioles grasos producidas usando la ruta de biosíntesis de ácidos grasos dada a conocer en el presente documento, se producen a partir de fuentes renovables (por ejemplo, a partir de una fuente de carbono simple derivada de materias primas renovables) y, como tales, son composiciones de materia nuevas. Los nuevos bioproductos pueden distinguirse de compuestos orgánicos derivados de carbono petroquímico basándose en determinación de huella de isótopos de

carbono dobles o datación por ^{14}C . Adicionalmente, la fuente específica de carbono obtenido de fuente biológica (por ejemplo, glucosa frente a glicerol) puede determinarse mediante determinación de huella de isótopos de carbono dobles (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7.169.588). La capacidad para distinguir los bioproductos tales como los dioles grasos actualmente dados a conocer de compuestos orgánicos basados en petróleo resulta beneficiosa para realizar un rastreo de estos materiales en el comercio. Por ejemplo, los compuestos orgánicos o productos químicos que comprenden perfiles de isótopos de carbono tanto de base biológica como basados en petróleo pueden distinguirse de compuestos orgánicos y productos químicos compuestos únicamente por materiales basados en petróleo. Por tanto, puede realizarse un seguimiento o rastreo de los bioproductos producidos en el presente documento en el comercio basándose en su perfil de isótopos de carbono único. Pueden distinguirse bioproductos de compuestos orgánicos basados en petróleo comparando la razón de isótopos de carbono estables ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) en cada muestra. La razón de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en un bioproducto dado es una consecuencia de la razón de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en el dióxido de carbono atmosférico en el momento en el que se fija el dióxido de carbono. También refleja la ruta metabólica precisa. También se producen variaciones regionales. El petróleo, plantas C3 (hoja ancha), plantas C4 (las hierbas) y carbonatos marinos muestran todos ellos diferencias significativas en $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y los valores de $\delta^{13}\text{C}$ correspondientes. Las plantas tanto C4 como C3 muestran un intervalo de razones de isótopos $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, pero los valores típicos son de aproximadamente -7 a aproximadamente -13 por mil para las plantas C4 y de aproximadamente -19 a aproximadamente -27 por mil para las plantas C3 (véase, por ejemplo, Stuiver *et al.*, Radiocarbon 19:355 (1977)). Los materiales no renovables tales como carbón y petróleo se encuentran generalmente en este último intervalo.

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

Se ha desarrollado una serie de RM alternativos en colaboración con IAEA, USGS, NIST, y otros laboratorios de isótopos internacionales seleccionados. Las notaciones para las desviaciones por mil de PDB son $\delta^{13}\text{C}$. Se realizan mediciones con CO_2 mediante espectrometría de masas de razón estable de alta precisión (IRMS) con iones moleculares con masas de 44, 45 y 46. Las composiciones descritas en el presente documento incluyen composiciones y productos de dioles grasos producidos mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Específicamente, la composición o producto de dioles grasos puede tener una $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente -28 o más, aproximadamente -27 o más, -20 o más, -18 o más, -15 o más, -13 o más, -10 o más o -8 o más. Por ejemplo, la composición o producto de dioles grasos puede tener una $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente -30 a aproximadamente -15, de aproximadamente -27 a aproximadamente -19, de aproximadamente -25 a aproximadamente -21, de aproximadamente -15 a aproximadamente -5, de aproximadamente -13 a aproximadamente -7 o de aproximadamente -13 a aproximadamente -10. En otros casos, la composición o producto de dioles grasos t puede tener una $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente -10, -11, -12 ó -12,3. Las composiciones y productos de dioles grasos producidos según la divulgación en el presente documento también pueden distinguirse de compuestos orgánicos basados en petróleo comparando la cantidad de ^{14}C en cada compuesto. Dado que ^{14}C tiene una semivida nuclear de 5730 años, los combustibles basados en petróleo que contienen carbono "más antiguo" pueden distinguirse de composiciones y bioproductos de dioles grasos que contienen carbono "más nuevo" (véase, por ejemplo, Currie, "Source Apportionment of Atmospheric Particles", Characterization of Environmental Particles, J. Buffle and H. P. van Leeuwen, eds., 1 de vol. I de IUPAC Environmental Analytical Chemistry Series (Lewis Publishers, Inc.) 3-74, (1992)).

La suposición básica en la datación por 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 las pruebas nucleares atmosféricas desde 1950 y a la quema de combustible fósil desde 1850, ^{14}C ha adquirido una segunda característica temporal geoquímica. Su concentración en el CO_2 atmosférico, y por tanto en la biosfera viva, aproximadamente se duplicó en el momento máximo de las pruebas nucleares, a mediados de la década de 1960. Desde entonces ha ido volviendo gradualmente hasta la tasa de isótopos ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$) de nivel inicial cosmogénica (atmosférica) de estado estacionario de aproximadamente $1,2 \times 10^{-12}$, con una "semivida" de relajación aproximada de 7-10 años. Esta última semivida no debe interpretarse de manera literal; en vez de eso debe usarse la función de entrada/degradación nuclear atmosférica detallada para trazar la variación del ^{14}C atmosférico y biosférico desde el inicio de la era nuclear. Esta última característica temporal de ^{14}C biosférico es la que ofrece la promesa de datación anual de carbono biosférico reciente. El ^{14}C puede medirse mediante espectrometría de masas con acelerador (AMS), con resultados facilitados en unidades de fracción de carbono moderno (fM). Con respecto a eso, la fM tiene el mismo significado que el definido por el Instituto nacional de estándares y tecnología (NIST), materiales de referencia de patrones (SRM 4990B y 4990C), conocidos como patrones de ácidos oxálicos HOxI y HOxII. La definición fundamental se refiere a 0,95 veces la razón de isótopos $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ de HOxI (con referencia al año 1950). Esto es aproximadamente equivalente a la madera previa a la revolución industrial corregida para la degradación. Para la biosfera viva actual (material vegetal), la fM es de aproximadamente 1,1. Las composiciones y productos de dioles grasos descritos en el presente documento incluyen bioproductos que pueden tener una fM de ^{14}C de al menos aproximadamente 1. Por ejemplo, el bioproducto de la divulgación puede tener una fM de ^{14}C de al menos aproximadamente 1,01, una fM de ^{14}C de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5, una fM de ^{14}C de aproximadamente 1,04 a aproximadamente 1,18, o una fM de ^{14}C de aproximadamente 1,111 a aproximadamente 1,124.

Otra medición de ^{14}C se conoce como el porcentaje de carbono moderno (pMC). Para un arqueólogo o geólogo que

usa fechas de ^{14}C , el año 1950 equivale a cero años de antigüedad. Esto también representa 100 pMC. El carbono de bomba en la atmósfera alcanzó casi el doble del nivel normal en 1963 en el momento máximo de armas termonucleares. Su distribución dentro de la atmósfera se ha estimado desde su aparición, mostrando valores que son mayores que 100 pMC para plantas y animales que viven desde el año 1950. Ha disminuido gradualmente a lo largo del tiempo, siendo el valor actual de casi 107,5 pMC. Esto significa que un material de biomasa reciente, tal como maíz, dará una firma de ^{14}C de casi 107,5 pMC. Los compuestos basados en petróleo tendrán un valor de pMC de cero. Combinar carbono fósil con carbono actual dará como resultado una dilución del contenido en pMC actual. Suponiendo que 107,5 pMC representa el contenido en ^{14}C de los materiales de biomasa actuales y 0 pMC representa el contenido en ^{14}C de productos basados en petróleo, el valor de pMC medido para ese material reflejará las proporciones de los dos tipos de componente. Por ejemplo, un material derivado al 100% de semillas de soja actuales dará una firma de radiocarbono de casi 107,5 pMC. Si se diluye ese material al 50% con productos basados en petróleo, dará una firma de radiocarbono de aproximadamente 54 pMC. Un contenido en carbono de base biológica se deriva asignando el 100% como igual a 107,5 pMC y el 0% igual a 0 pMC. Por ejemplo, una muestra que mide 99 pMC dará un contenido en carbono de base biológica equivalente del 93%. Este valor se denomina resultado de carbono de base biológica medio y supone que todos los componentes dentro del material analizado se originaron o bien de material biológico actual o bien de material a base de petróleo. Un bioproducto que comprende uno o más dioles grasos tal como se describe en el presente documento puede tener un pMC de al menos aproximadamente 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100. En otros casos, una composición de dioles grasos descrita en el presente documento 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 aproximadamente 98; o aproximadamente 90 y aproximadamente 95. En aún otros casos, una composición de dioles grasos descrita en el presente documento puede tener un pMC de aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94 ó 94,2.

Los dioles grasos tales como 1,3-dioles son moléculas que son valiosas y deseables en muchas aplicaciones industriales. La presente invención produce 1,3-dioles grasos que tienen una longitud de cadena de al menos 5 átomos de carbono mediante microorganismos recombinantes, incluyendo *in vivo*, y de ese modo genera una gama de productos útiles. Estos productos no son en sí mismos parte de la invención, pero a continuación se facilitan algunos ejemplos. Los 1,3-dioles incluyen, pero no se limitan a, 1,3-dioles C_5 (1,3-pentanodiol); 1,3-dioles C_6 (1,3-hexanodiol); 1,3-dioles C_7 (1,3-heptanodiol); 1,3-dioles C_8 (1,3-octanodiol); 1,3-dioles C_9 (1,3-nonanodiol); 1,3-dioles C_{10} (1,3-decanodiol); 1,3-dioles C_{11} (1,3-undecanodiol); 1,3-dioles C_{12} (1,3-dodecanodiol); 1,3-dioles C_{13} (1,3-tridecanodiol); 1,3-dioles C_{14} (1,3-tetradecanodiol); 1,3-dioles C_{15} (1,3-pentadecanodiol); 1,3-dioles C_{16} (1,3-hexadecanodiol); 1,3-dioles C_{17} (1,3-heptadecanodiol); 1,3-dioles C_{18} (1,3-octadecanodiol); 1,3-dioles C_{19} (1,3-nonadecanodiol); y similares. Aunque principalmente se describen 1,3-dioles de cadena par en el presente documento, también se incluyen 1,3-dioles de cadena impar, tales como los que tienen 7-21 carbonos, y más preferiblemente 5-19 carbonos.

Los 1,3-dioles producidos mediante el método de la invención tienen diversas longitudes de cadena y/o características de saturación y/o ramificación. Una composición de 1,3-dioles incluye principalmente un tipo de 1,3-diol tal como, por ejemplo, un 1,3-diol C_5 (1,3-pentanodiol); un 1,3-diol C_6 (1,3-hexanodiol); un 1,3-diol C_7 (1,3-heptanodiol); un 1,3-diol C_8 (1,3-octanodiol); un 1,3-diol C_9 (1,3-nonanodiol); un 1,3-diol C_{10} (1,3-decanodiol); un 1,3-diol C_{11} (1,3-undecanodiol); un 1,3-diol C_{12} (1,3-dodecanodiol); un 1,3-diol C_{13} (1,3-tridecanodiol); un 1,3-diol C_{14} (1,3-tetradecanodiol); un 1,3-diol C_{15} (1,3-pentadecanodiol); un 1,3-diol C_{16} (1,3-hexadecanodiol); un 1,3-diol C_{17} (1,3-heptadecanodiol); un 1,3-diol C_{18} (1,3-octadecanodiol); un 1,3-diol C_{19} (1,3-nonadecanodiol); o similares. En otro ejemplo, la composición de 1,3-dioles incluye principalmente mezclas de 1,3-dioles específicos de una longitud de cadena específica en razones particulares. En aún otro ejemplo, la composición de 1,3-dioles incluye combinaciones de uno o más 1,3-dioles de una longitud de cadena específica en combinación con otros ingredientes o componentes con el fin de producir detergentes, tensioactivos, emulsionantes, emolientes, disolventes, plásticos y aditivos alimenticios.

En un ejemplo, la composición de dioles grasos incluye 1,3-dioles C_{12} en una mezcla de alcoholes grasos de cadena recta. En otro ejemplo, la composición de dioles grasos incluye 1,3-dioles C_{12} en una mezcla de alcoholes grasos de cadena ramificada. En otro ejemplo, la composición de dioles grasos incluye 1,3-dioles C_{12} en una mezcla de alcoholes grasos de cadena recta y ramificada. En otro ejemplo, la composición de dioles grasos incluye 1,3-dioles C_{12} en combinación con componentes adicionales tales como, por ejemplo, componentes detergentes o tensioactivos. En aún otro ejemplo, la composición de dioles grasos incluye 1,3-dioles C_{12} en combinación con componentes adicionales tales como, por ejemplo, componentes emulsionantes o disolventes. En todavía otro ejemplo, la composición de dioles grasos incluye 1,3-dioles C_{12} en combinación con polímeros. En el presente documento, la composición de dioles grasos puede usarse como componente para plásticos. En otro ejemplo, la composición de dioles grasos incluye 1,3-dioles C_{12} en una mezcla de ingredientes alimenticios. En otro ejemplo, la composición de dioles grasos incluye un 1,3-diol como producto intermedio en la síntesis de un tensioactivo o detergente, tal como un glucósido o etóxido, o en combinación con una fragancia, o un elemento estructural químico a partir del cual pueden sintetizarse otros compuestos químicos.

En otro ejemplo, la composición de dioles grasos incluye 1,3-dioles C_8 , C_{10} y C_{12} en determinadas razones en una mezcla de alcoholes grasos de cadena recta. En otro ejemplo, la composición de dioles grasos incluye 1,3-dioles C_8 ,

C₁₀ y C₁₂ en determinadas razones en una mezcla de alcoholes grasos de cadena ramificada. En otro ejemplo, la composición de dioles grasos incluye 1,3-dioles C₈, C₁₀ y C₁₂ en determinadas razones en una mezcla de alcoholes grasos de cadena recta y ramificada. En otro ejemplo, la composición de dioles grasos incluye 1,3-dioles C₈, C₁₀ y C₁₂ en determinadas razones en combinación con componentes adicionales tales como, por ejemplo, componentes detergentes o tensioactivos. En aún otro ejemplo, la composición de dioles grasos incluye 1,3-dioles C₈, C₁₀ y C₁₂ en determinadas razones en combinación con componentes adicionales tales como, por ejemplo, componentes emulsionantes o disolventes. En todavía otro ejemplo, la composición de dioles grasos incluye 1,3-dioles C₈, C₁₀ y C₁₂ en determinadas razones en combinación con polímeros. En el presente documento, la composición de dioles grasos puede usarse como componente para plásticos. En otro ejemplo, la composición de dioles grasos incluye 1,3-dioles C₈, C₁₀ y C₁₂ en determinadas razones en una mezcla de ingredientes alimenticios.

La divulgación da a conocer además una composición de dioles grasos que incluye 1,3-dioles C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀ y/o C₁₁ solos o en determinadas razones en una mezcla de ingredientes relacionados con alimentos. Tales dioles grasos serán útiles como estabilizadores alimenticios, potenciadores alimenticios, aditivos alimenticios o sustitutos alimenticios. Los compuestos y composiciones de los dioles grasos pueden formularse de manera que pueden realizarse productos deseables incluyendo detergentes, tensioactivos, emulsionantes, emolientes, disolventes, plásticos, aditivos alimenticios, y más. En un aspecto, se contemplan 1,3-dioles C₁₀-C₁₈ para su uso como tensioactivos. En otro aspecto, se usan 1,3-dioles directamente o como productos intermedios en la síntesis de productos nutracéuticos, productos farmacéuticos, productos químicos para la agricultura y otras moléculas bioactivas.

20 Ejemplos

EJEMPLO 1: Cultivo de cepas de *E. coli* recombinante para la producción de 1,3-dioles

Todos los experimentos comenzaron a partir de colonias individuales o cultivos madre congelados de una cepa microbiana particular. Se llevaron a cabo protocolos de alto rendimiento (HTP) en placas de 96 pocillos de la siguiente manera por cuadruplicado para cada cepa: se usaron 40 µl de cultivo de Luria-Bertani (LB) (a partir de un cultivo de LB que crecía en una placa de 96 pocillos) para inocular 360 µl de medios LB, que después se incubaron durante 3-4 horas a 32°C con agitación. Se usaron 40 µl de la siembra de LB para inocular 360 µl de medios Nlim (véase a continuación). Tras crecer a 32°C durante 2 horas a 30-35°C, se indujeron los cultivos con IPTG (concentración final de 1 mM). Después se incubaron los cultivos a 30-35°C con agitación durante 20 horas si no se indica lo contrario, tras lo cual se extrajeron siguiendo el protocolo de extracción convencional detallado a continuación. Se llevaron a cabo protocolos en frascos de agitación de manera similar excepto porque se aumentaron a escala los volúmenes de cultivo de manera que el volumen de medios de producción final fue de 15 ml en lugar de 400 µl. Los medios de frascos de agitación también contenían Triton X100 al 0,25% (v/v). Dependiendo de las cepas microbianas, se añadieron los antibióticos apropiados a los medios en todas las fases.

Formulación de medios Nlim		
1	x	5x Sol. sal. con NH ₄ Cl
1	x	1000x vitaminas traza
1	mg/l	Tiamina 10 mg/ml
1	mM	MgSO ₄ 1 M
0,1	mM	CaCl ₂ 1 M
40	g/l	Glucosa 500 g/l
1	x	1000x minerales traza
10	mg/l	Citrato de Fe 10 g/l
100	µg/ml	Espectinomicina 100 mg/ml
100	mM	BisTris 2 M (pH7,0)

El procedimiento inicial en los biorreactores fue el siguiente: se cultivó un vial de banco de células de la cepa en un frasco de agitación de LB que contenía antibiótico(s) a 32°C hasta que la lectura de DO del cultivo fue >1. Se realizó una transferencia del 5% v/v de este cultivo en medios de siembra mínimos (que contenían cloruro de amonio, cloruro de sodio, fosfato de potasio monobásico, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, glucosa, una disolución de oligoelementos, citrato férrico tribásico monohidratado, tampón y antibiótico(s)), y se cultivó durante la noche a 32°C. Después se usó este cultivo de siembra para inocular un biorreactor preparado para la producción.

Los medios de biorreactor iniciales para este procedimiento contenían diversas concentraciones de los mismos componentes que los medios de siembra, así como una disolución de vitaminas traza, y opcionalmente pequeñas cantidades de un componente de medios complejos, tales como casaminoácidos, maíz fermentado en polvo o extracto de levadura. Las adiciones tras la esterilización al biorreactor incluyeron opcionalmente vitaminas termolábiles o aminoácidos, glucosa y antibiótico(s).

Antes de la inoculación, se estabilizaron los parámetros del biorreactor y se activaron los controladores: punto de consigna de oxígeno disuelto: 10 - 50%; punto de consigna de temperatura: 27 - 37°C; punto de consigna de aireación: 0,25 - 1 vvm; punto de consigna de pH: 6,5 - 7,5. Se inoculó el biorreactor con el 5% v/v de un cultivo de

siembra y se indujo con IPTG 1 mM cuando la densidad del cultivo alcanzó un punto de consigna deseado.

5 Una disolución de alimentación compuesta por glucosa, sacarosa, fructosa, xilosa o glicerol con otros componentes de medios posibles incorporados en los medios basales de biorreactor se alimentó al cultivo a una tasa máxima de 1 - 50 g/l/h de glucosa (basándose en el volumen de cultivo nominal), usando un desencadenante de DO o pH para indicar al controlador cuándo se había agotado la fuente de carbono de los medios y debía añadirse la siguiente inyección de disolución de alimentación. Se cosechó el biorreactor tras entre 48 y 96 horas de cultivo.

EJEMPLO 2: Análisis de 1,3-dioles

Se extrajeron muestras de caldo de fermentación producidas por cepas de *E. coli* recombinante con el siguiente procedimiento:

- 10 1. Agitar con vórtex el caldo a 3000 rpm durante 30 segundos antes de pesarlo.
2. Tomar muestra de 500 µl de caldo inmediatamente después de la agitación con vórtex con un dispositivo Vortex Genie.
3. Añadir 5 ml de acetato de butilo con 1-undecanol 500 mg/l como patrón interno.
- 15 4. Extraer caldo en un agitador en vórtex (agitador en vórtex de múltiples tubos DVX-2500, VWR) a 2500 rpm durante 20 minutos.
5. Centrifugar el extracto (a 4750 rpm) durante 10 min a temperatura ambiente.
6. Extraer con pipeta 100 µl del sobrenadante de fase superior en viales de CG con insertos.
7. Derivatizar añadiendo 100 µl de (BSTFA +TMCS al 1%) al vial de CG a temperatura ambiente.
- 20 8. Mezclar el extracto y reactivo BSTFA durante 30 segundos antes de inyectar en CG/EM tal como se describe a continuación:

Condición del instrumento para la identificación

- Temperatura inicial: 60°C
- Tiempo inicial: 5 minutos
- Tiempo de equilibración: 1 minuto
- 25 Tasa de programa: 25°C/minuto
- Temperatura final: 300°C
- Tiempo final: 1,6 minutos
- Detector: MSD
- Temperatura de entrada: 300°C
- 30 Temperatura de línea de transferencia: 300°C
- Fuente de EM: 230°C
- Cuad. de EM: 150°C
- Razón de división: 20:1
- Flujo de columna: 1 ml/minuto
- 35 Tamaño de muestra: 1 µl

EJEMPLO 3: Producción de 1,3-dioles usando una ruta con TE de *Anaerococcus tetradius* o *Lactobacillus plantarum* y carB

40 Este ejemplo muestra la producción inesperada de 1,3-dioles en *E. coli* recombinante usando una ruta metabólica que incluye una tioesterasa microbiana de *Anaerococcus tetradius* (TE_EEI82564, número de registro de Genbank WP_004837416) o *Lactobacillus plantarum* (TE_CAD63310, número de registro de Genbank WP_003640969) y variantes de ácido carboxílico reductasa, CarB, de *Mycobacterium smegmatis* (número de registro de Genbank YP_889972).

Se clonaron los genes que codifican para *carB2* (SEQ ID NO: 6) y *TE_EEI82564* en un vector derivado de pCL1920 (replicón de SC101, marcador de resistencia a espectinomicina), de manera que su transcripción se controló por el promotor *P_{trc}* inducible por IPTG y formaron un operón con genes que codifican para una alcohol deshidrogenasa, *alrA*, que no se requiere para la producción de alcoholes grasos o dioles grasos, pero que sí mejora la tasa de su producción, y variantes de 3-ceto-acil-ACP sintasa (*fabB*) y un regulador de la transcripción (*fadR*). El plásmido se denominó pVA369 (véase la tabla 5). Se clonó el gen para *TE_CAD63310* de *L. plantarum* de una manera idéntica junto con el gen para *carB12* (SEQ ID NO: 4), el plásmido resultante se denominó pJP2 (véase la tabla 5, a continuación).

Las cepas de base usadas para la transformación de plásmido fueron V668 y DJ81. En resumen, el genoma de las cepas de base se manipuló de la siguiente manera: en V668, se deletionó el gen de *fadE* (acil-CoA deshidrogenasa), y se sobreexpresaron un operón sintético de biosíntesis de ácidos grasos y una fosfopanteteinil transferasa (*entD*). En resumen, el genoma de la cepa de base DJ81 se manipuló de la siguiente manera: se deletionó el gen de acil-CoA deshidrogenasa (*fadE*), y se sobreexpresaron un operón sintético de biosíntesis de ácidos grasos, una fosfopanteteinil transferasa (*entD*) y una tioesterasa variante (*tesA*).

Se transformaron los plásmidos pVA369 y pJP2 en las cepas de base D848 y V668, respectivamente, dando como resultado las cepas VA370 y JP-11 (véase la tabla 6, a continuación). Después se cultivaron las cepas y se analizaron para determinar su capacidad para producir alcoholes grasos tal como se describió en los ejemplos 1 y 2. Sorprendentemente, ambas cepas produjeron varios picos desconocidos.

La figura 4 muestra un cromatograma de CG-EM de un extracto de la cepa VA370 que sobreexpresaba *TE_EEI82564*. Dos picos a $TR=8,199$ min y $TR=9,094$ min en el cromatograma de CG-EM no coincidían con el tiempo de retención de los alcoholes grasos y ácidos grasos previstos, tales como dodecanol y tetradecanol, o ácido dodecanoico y ácido tetradecanoico. El pico 1 eluyó antes que dodecanol y el pico 2 eluyó después que tetradecanol y antes que ácido tetradecanoico. Los patrones de fragmentación iónica de los picos 1 y 2 (véase la figura 5) sugirieron que estos dos picos eran 1,3-trimetilsiloxiooctano y 1,3-trimetilsiloxidecano, que son los productos de derivatización de BSTFA (véase el ejemplo 2) con 1,3-octanodiol y 1,3-decanodiol, respectivamente. Para ilustración, la figura 6 muestra un esquema de los fragmentos iónicos de 1,3-trimetilsiloxidecano tal como se observan en el pico 1 en la figura 5. También se observó cantidad traza 1,3-dodecanodiol y 1,3-tetradecanodiol de derivatizados.

De manera similar, extractos de la cepa JP-11 que expresaba *TE_CAD63310* contenían nuevos picos que se identificaron como 1,3-octanodiol, 1,3-decanodiol, 1,3-tetradecanol y 1,3-tetradecenol basándose en su patrón de fragmentación iónica y tiempo de retención tal como se describió anteriormente. JP-11 produjo un total de $1,9 \pm 0,05$ g/l de 1,3-dioles en un protocolo de fermentación de HTP así como alcoholes grasos tales como octanol, decanol, dodecanol, dodecenol, tetradecanol y tetradecenol. En la figura 7 se muestra la distribución de productos de la cepa JP-11.

La producción de 1,3-dioles fue sorprendente por dos motivos: (i) requiere 3-OH ácidos grasos como productos intermedios, que a su vez se derivan lo más probablemente de 3-OH acil-ACP mediante la acción de una tioesterasa (véase la figura 2). Ambas tioesterasas usadas en este ejemplo se habían expresado anteriormente en *E. coli* y sólo se notificó que dieran lugar a ácidos grasos (Jing *et al.* BMC Biochemistry 2011, 12:44) sugiriendo que no son adecuadas para la producción de 3-OH ácidos grasos y por tanto 1,3-dioles, (ii) requiere que se reduzcan productos intermedios de 3-OH ácidos grasos para dar 3-OH aldehídos grasos mediante ácido carboxílico reductasa CarB, que después se reducen para dar 1,3-dioles mediante alcohol deshidrogenasa (ADH). Mientras que se sabe que las ADH son más bien promiscuas, anteriormente no se había mostrado que CarB convirtiera 3-OH ácidos grasos en 3-OH aldehídos grasos. Por tanto, los solicitantes han descubierto que determinadas tioesterasas microbianas, por ejemplo, *TE_EEI82564* y *TE_CAD63310*, cuando se expresan conjuntamente con CarB en células huésped de *E. coli*, sobreproducen 1,3-dioles. El análisis de los 1,3-dioles puede mostrar que están altamente enriquecidos en enantiómero (R), demostrando la enantioselectividad de la 3-cetoacil ACP reductasa (FabG) de la maquinaria de biosíntesis de ácidos grasos de *E. coli* nativa.

Tabla 5: Plásmidos usados para la producción de 1,3-dioles

Nombre de plásmido	Genes de ruta
pVA369	<i>pCL-carB2-TE_EEI82564alrA-fabB-fadR</i>
pJP2	<i>pCL-carB12-TE_CAD63310-alrA-fabB-fadR</i>
pNH328	<i>pCL-trc-carB8-phaG-alrA</i>
pHN330	<i>pCL-trc-carB8-fatB1-alrA</i>
pNT16	<i>pCL-trc-AAR-alrA</i>

Tabla 6: Cepas usadas para la producción de 1,3-dioles

Nombre de cepa	Descripción
VA370	V668 con plásmido pVA369
JP-11	DJ81 con plásmido pJP2

stNH1371	D178 con plásmido pNH330
stNH1369	D178 con plásmido pNH328
Becos247	DV2 con plásmido pNT16

EJEMPLO 4A: Producción de 1,3-dioles usando una ruta con fatB1 de *Umbellularia californica* y carB

Este ejemplo muestra la producción de 1,3-dioles en *E. coli* recombinante usando una ruta metabólica que incluye una tioesterasa vegetal, fatB1, de *Umbellularia californica*, (número de registro de Genbank Q41635) y una ácido carboxílico reductasa variante, CarB, de *Mycobacterium smegmatis*.

- 5 Se clonaron los genes que codifican para carB8 (SEQ ID NO: 8) y fatB1 en un vector derivado de pCL1920 (replicón de SC101, marcador de resistencia a espectinomocina), de manera que su transcripción se controló por el promotor *P_{trc}* inducible por IPTG y formaron un operón con un gen que codifica para una alcohol deshidrogenasa, alrA. El plásmido se denominó pNH330 (véase la tabla 5).

- 10 La cepa de base usada para la transformación de plásmido fue la cepa D178. En resumen, el genoma de la cepa D178 se modificó de la siguiente manera: se delecionó el gen de *fadE* (acil-CoA deshidrogenasa) y se sobreexpresó una fosfopanteteinil transferasa (entD). Se transformó el plásmido pNH330 en D178 dando como resultado la cepa stNH1371 (véase la tabla 6). Después se cultivó la cepa y se analizó para determinar su capacidad para producir alcoholes grasos y 1,3-dioles tal como se describió en los ejemplos 1 y 2. Se identificaron los picos de 1,3-dioles tal como se describió en el ejemplo 2.

- 15 La cepa stNH1371 produjo $39,5 \pm 3,2$ mg/l de 1,3-dioles en un protocolo de fermentación de HTP. El 1,3-dodecanodiol fue uno de los 1,3-dioles producidos. Además de 1,3-dioles, también se detectaron alcoholes grasos tales como dodecanol. El análisis de los 1,3-dioles puede mostrar que están altamente enriquecidos en enantiómero (R) demostrando la enantioselectividad de la 3-cetoacil ACP reductasa (FabG) de la maquinaria de biosíntesis de ácidos grasos de *E. coli* nativa.

20 EJEMPLO 4B: Producción de 1,3-dioles usando una ruta con phaG de *Pseudomonas putida* y carB

Este ejemplo muestra la producción de 1,3-dioles en *E. coli* recombinante usando una ruta metabólica que incluía una tioesterasa/transacilasa, phaG, de *Pseudomonas putida* (número de registro de Genbank AAN67031), y una ácido carboxílico reductasa variante, CarB, de *Mycobacterium smegmatis*.

- 25 Se clonaron el gen que codifica para carB8 (véase la lista de secuencias adjunta con el presente documento, a continuación) y phaG en un vector derivado de pCL1920 (replicón de SC101, marcador de resistencia a espectinomocina), de manera que su transcripción se controló por el promotor *P_{trc}* inducible por IPTG y formaron un operón con un gen que codifica para una alcohol deshidrogenasa, alrA. El plásmido se denominó pNH328 (véase la tabla 5).

- 30 La cepa de base usada para la transformación de plásmido fue la cepa D178. En resumen, el genoma de la cepa D178 se modificó de la siguiente manera: se delecionó el gen de *fadE* (acil-CoA deshidrogenasa) y se sobreexpresó una fosfopanteteinil transferasa (entD). Se transformó el plásmido pNH328 en D178 dando como resultado la cepa stNH1369 (véase la tabla 6, anteriormente). Después se cultivó la cepa y se analizó para determinar su capacidad para producir alcoholes grasos y 1,3-dioles tal como se describió en los ejemplos 1 y 2. Se identificaron los picos de 1,3-dioles tal como se describió en el ejemplo 2.

- 35 La cepa stNH1369 produjo 600 ± 27 mg/l de 1,3-dioles en un protocolo de fermentación de HTP. Los 1,3-dioles producidos fueron 1,3-octanodiol, 1,3-decanodiol, 1,3-dodecanodiol y 1,3-tetradecanodiol. Además de 1,3-dioles, sólo se detectaron cantidades minoritarias de ácidos grasos. El análisis de los 1,3-dioles puede mostrar que están altamente enriquecidos en enantiómero (R) demostrando la enantioselectividad de la 3-cetoacil ACP reductasa (FabG) de la maquinaria de biosíntesis de ácidos grasos de *E. coli* nativa.

40 EJEMPLO 5: Producción de 1,3-dioles usando una ruta con AAR de *Synechococcus elongatus*

Este ejemplo muestra la producción de 1,3-dioles en *E. coli* recombinante usando una ruta metabólica que incluye una acil-ACP reductasa variante, AAR, de *Synechococcus elongatus* (número de registro de Genbank YP_400611; silvestre). Para la secuencia de AAR variante, véase la lista de secuencias adjunta con el presente documento (a continuación).

- 45 Se clonó el gen que codifica para una variante de AAR (SEQ ID NO: 2) en un vector derivado de pCL1920 (replicón de SC101, marcador de resistencia a espectinomocina), de manera que su transcripción se controló por el promotor *P_{trc}* inducible por IPTG y formó un operón con un gen que codifica para una alcohol deshidrogenasa, alrA. El plásmido se denominó pNT16 (véase la tabla 5).

- 50 La cepa de base usada para la transformación de plásmido fue DV2. En resumen, el genoma de cepa DV2 se manipuló delecionando el gen de *fadE* (acil-CoA deshidrogenasa). Se transformó el plásmido pNT16 en cepas de base DV2 dando como resultado la cepa Becos247 (véase la tabla 6). Después se cultivó Becos247 y se analizó

para determinar su capacidad para producir alcoholes grasos tal como se describió en los ejemplos 1 y 2. Sorprendentemente, la cepa produjo 1,3-dioles. Se identificaron los picos de 1,3-dioles tal como se describió en el ejemplo 2.

5 La cepa Becos247 produjo 0,57 g/l de 1,3-dioles en una fermentación de 5 l, lo cual constituyó el 9,1% de las especies de ácidos grasos totales producidas. Los 1,3-dioles producidos fueron 1,3-dodecanodiol, 1,3-tetradecanodiol y 1,3-tetradecanodiol, además de los alcoholes grasos decanol, dodecanol, dodecanol, tetradecanol, tetradecanol, hexadecanol, hexadecanol y octadecanol, así como se produjeron cantidades minoritarias de ácidos grasos.

10 La producción de 1,3-dioles en este experimento a través de 3-OH aldehídos grasos como productos intermedios es sorprendente (véase la figura 3), porque la acil-ACP reductasa usada en este ejemplo, AAR silvestre de *Synechococcus elongatus*, se había expresado anteriormente en *E. coli* y se notificó que sólo daba lugar a alcoholes grasos a partir de acil-ACP, pero no 1,3-dioles a partir de 3-OH acil-ACP (Schirmer *et al.* (2010) Science 329, 559). El análisis de los 1,3-dioles puede mostrar que están altamente enriquecidos en enantiómero (R) demostrando la enantioselectividad de la 3-cetoacil ACP reductasa (FabG) de la maquinaria de biosíntesis de ácidos grasos de *E. coli* nativa.

EJEMPLO 6A: Producción de 1,3-dioles usando una ruta con fatB1 de *Umbellularia californica* y carB

Este ejemplo describe cómo demostrar la producción de 1,3-dioles en *E. coli* recombinante usando una ruta metabólica que incluye una tioesterasa vegetal, fatB1, de *Umbellularia californica*, y ácido carboxílico reductasa, carB, de *Mycobacterium smegmatis*.

20 Se clonan los genes que codifican para carB y fatB1 silvestres en un vector derivado de pCL1920 (replicón de SC101, marcador de resistencia a espectinomicina), de manera que su transcripción se controla por el promotor *P_{trc}* inducible por IPTG y forman un operón con un gen que codifica para una alcohol deshidrogenasa, alrA. Se transforma el plásmido en una cepa de base tal como cepa DV2 (véase el ejemplo 5).

25 Después se cultiva la cepa resultante y se analiza para determinar su capacidad para producir alcoholes grasos y dioles tal como se describió en los ejemplos 1 y 2. Se espera que la cepa produzca 1,3-dioles. El análisis de los 1,3-dioles mostrará que están altamente enriquecidos en enantiómero (R) demostrando la enantioselectividad de la 3-cetoacil ACP reductasa (FabG) de la maquinaria de biosíntesis de ácidos grasos de *E. coli* nativa.

EJEMPLO 6B: Producción de 1,3-dioles usando una ruta simplificada con fatB1 de *Umbellularia californica* y carB

30 Este ejemplo describe cómo demostrar la producción de 1,3-dioles en *E. coli* recombinante usando una ruta metabólica simplificada que incluye una tioesterasa vegetal, fatB1, de *Umbellularia californica*, y ácido carboxílico reductasa, carB, de *Mycobacterium smegmatis*.

35 Se clonan los genes que codifican para carB y fatB1 silvestres en un vector derivado de pCL1920 (replicón de SC101, marcador de resistencia a espectinomicina), de manera que su transcripción se controla por el promotor *P_{trc}* inducible por IPTG. Se transforma el plásmido en una cepa de base tal como cepa DV2 (véase el ejemplo 5).

40 Después se cultiva la cepa resultante y se analiza para determinar su capacidad para producir alcoholes grasos y dioles tal como se describió en los ejemplos 1 y 2. Se espera que la cepa produzca 1,3-dioles, lo cual demuestra que una tioesterasa y ácido carboxílico reductasa son suficientes para permitir que la célula microbiana produzca 1,3-dioles. El análisis de los 1,3-dioles mostrará que están altamente enriquecidos en enantiómero (R) demostrando la enantioselectividad de la 3-cetoacil ACP reductasa (FabG) de la maquinaria de biosíntesis de ácidos grasos de *E. coli* nativa.

EJEMPLO 7: Producción de 1,3-dioles usando una ruta con tesA de *E. coli* y carB

Este ejemplo describe cómo demostrar la producción de 1,3-dioles en *E. coli* recombinante usando una ruta metabólica que incluye tioesterasa, tesA, y ácido carboxílico reductasa, CarB, de *Mycobacterium smegmatis*.

45 Se clonan los genes que codifican para carB silvestre y tesA silvestre en un vector derivado de pCL1920 (replicón de SC101, marcador de resistencia a espectinomicina), de manera que su transcripción se controla por el promotor *P_{trc}* inducible por IPTG y forman un operón con un gen que codifica para una alcohol deshidrogenasa, alrA. Se transforma el plásmido en una cepa de base tal como cepa DV2 (véase el ejemplo 5).

50 Después se cultiva la cepa resultante y se analiza para determinar su capacidad para producir alcoholes grasos y dioles tal como se describió en los ejemplos 1 y 2. Se espera que la cepa produzca 1,3-dioles, lo cual demuestra que una tioesterasa y ácido carboxílico reductasa son suficientes para permitir que la célula microbiana produzca 1,3-dioles. El análisis de los 1,3-dioles mostrará que están altamente enriquecidos en enantiómero (R) demostrando la enantioselectividad de la 3-cetoacil ACP reductasa (FabG) de la maquinaria de biosíntesis de ácidos grasos de *E. coli* nativa.

EJEMPLO 8: Producción de 1,3-dioles usando una ruta simplificada con AAR silvestre de *Synechococcus elongatus*

Este ejemplo describe cómo demostrar la producción de 1,3-dioles en *E. coli* recombinante usando una ruta metabólica que incluye acil-ACP reductasa, AAR, de *Synechococcus elongatus*.

- 5 Se clona el gen que codifica para AAR silvestre en un vector derivado de pCL1920 (replicón de SC101, marcador de resistencia a espectinomicina), de manera que su transcripción se controla por el promotor *P_{trc}* inducible por IPTG. Se transforma el plásmido en una cepa de base tal como cepa DV2 (véase el ejemplo 5).

Después se cultiva la cepa resultante y se analiza para determinar su capacidad para producir alcoholes grasos y dioles tal como se describió en los ejemplos 1 y 2. Se espera que la cepa produzca 1,3-dioles lo cual demuestra que la producción heteróloga de AAR es suficiente para permitir que la célula microbiana produzca 1,3-dioles. El análisis de los 1,3-dioles mostrará que están altamente enriquecidos en enantiómero (R) demostrando la enantioselectividad de la 3-cetoacil ACP reductasa (FabG) de la maquinaria de biosíntesis de ácidos grasos de *E. coli* nativa.

EJEMPLO 9: Producción de 1,3-dioles usando una ruta con fatB de *Cinnamomum camphora* y carB

15 Este ejemplo describe cómo demostrar la producción de 1,3-dioles en *E. coli* recombinante usando una ruta metabólica que incluye una tioesterasa vegetal, fatB, de *Cinnamomum camphora* y ácido carboxílico reductasa, carB, de *Mycobacterium smegmatis*.

Se clonan los genes que codifican para carB y fatB silvestres de *Cinnamomum camphora* en un vector derivado de pCL1920 (replicón de SC101, marcador de resistencia a espectinomicina), de manera que su transcripción se controla por el promotor *P_{trc}* inducible por IPTG y forman un operón con un gen que codifica para una alcohol deshidrogenasa, alrA. Se transforma el plásmido en una cepa de base tal como cepa DV2 (véase el ejemplo 5).

Después se cultiva la cepa resultante y se analiza para determinar su capacidad para producir alcoholes grasos y dioles tal como se describió en los ejemplos 1 y 2. Se espera que la cepa produzca 1,3-dioles, lo cual demuestra que una tioesterasa y ácido carboxílico reductasa son suficientes para permitir que la célula microbiana produzca 1,3-dioles. El análisis de los 1,3-dioles mostrará que están altamente enriquecidos en enantiómero (R) demostrando la enantioselectividad de la 3-cetoacil ACP reductasa (FabG) de la maquinaria de biosíntesis de ácidos grasos de *E. coli* nativa.

EJEMPLO 10: Producción de 1,3-dioles usando una ruta con acr1 de *Acinetobacter baylyi*

Este ejemplo describe cómo demostrar la producción de 1,3-dioles en *E. coli* recombinante usando una ruta metabólica que incluye acil graso-CoA reductasa, acr1, de *Acinetobacter baylyi* (número de registro de Genbank AAC45217).

Se clona el gen que codifica para acr1 en un vector derivado de pCL1920 (replicón de SC101, marcador de resistencia a espectinomicina), de manera que su transcripción se controla por el promotor *P_{trc}* inducible por IPTG y forma un operón con genes que codifican para una acil-CoA sintetasa (fadD) y una tioesterasa. Se transforma el plásmido en una cepa de base tal como cepa DV2 (véase el ejemplo 5).

35 Después se cultiva la cepa resultante y se analiza para determinar su capacidad para producir alcoholes grasos y dioles tal como se describió en los ejemplos 1 y 2. Se espera que la cepa produzca 1,3-dioles.

EJEMPLO 11: Producción de 1,3-dioles usando una ruta con FAR de *Marinobacter aquaeolei*

Este ejemplo describe cómo demostrar la producción de 1,3-dioles en *E. coli* recombinante usando una ruta metabólica que incluye acil graso-ACP reductasa, FAR, de *Marinobacter aquaeolei* (número de registro de Genbank YP_959486).

Se clonan los genes que codifican para FAR silvestre en un vector derivado de pCL1920 (replicón de SC101, marcador de resistencia a espectinomicina), de manera que su transcripción se controla por el promotor *P_{trc}* inducible por IPTG. Se transforma el plásmido en una cepa de base tal como cepa DV2 (véase el ejemplo 5).

Después se cultiva la cepa resultante y se analiza para determinar su capacidad para producir alcoholes grasos y dioles tal como se describió en los ejemplos 1 y 2. Se espera que la cepa produzca 1,3-dioles, lo cual demuestra que FAR producida de manera heteróloga es suficiente para permitir que la célula produzca 1,3-dioles

EJEMPLO 12: Producción de 1,3-dioles usando una ruta con un complejo de FAR de *Photobacterium luminescens*

Este ejemplo describe cómo demostrar la producción de 1,3-dioles en *E. coli* recombinante usando una ruta metabólica que incluye un complejo de acil graso-ACP reductasa, FAR, que incluye LuxC, LuxD y LuxE de *Photobacterium luminescens* (números de registro de Genbank AHH25015-17).

Se clonan los genes que codifican para LuxC, LuxD y LuxE en un vector derivado de pCL1920 (replicón de SC101, marcador de resistencia a espectinomicina), de manera que su transcripción se controla por el promotor *P_{trc}* inducible por IPTG y forman un operón con un gen que codifica para una alcohol deshidrogenasa, *alrA*. Se transforma el plásmido en una cepa de base tal como cepa DV2 (véase el ejemplo 5).

- 5 Después se cultiva la cepa resultante y se analiza para determinar su capacidad para producir alcoholes grasos y dioles tal como se describió en los ejemplos 1 y 2. Se espera que la cepa produzca 1,3-dioles.

EJEMPLO 13: Producción de 3-(S)-dioles grasos usando *fadB(His450Gln)*

10 Este ejemplo describe cómo demostrar la producción de 3-(S)-dioles grasos en *E. coli* recombinante usando una ruta metabólica que incluye una 3-hidroxi-acil-ACP acil-CoA transacilasa o tioesterasa *fadB(His450Gln)* que conserva actividad enoil-CoA hidratasa pero es deficiente en cuanto a actividad deshidrogenasa, y expresa una acil graso-CoA reductasa, *acr1*, de *Acinetobacter bailyi* (número de registro de Genbank AAC45217).

15 Se clonan los genes que codifican para 'Tesa, FadD, FadB(His450Gln) y Acr1 en un vector derivado de pCL1920 (replicón de SC101, marcador de resistencia a espectinomicina), de manera que su transcripción se controla por el promotor *P_{trc}* inducible por IPTG y completan un operón suficiente para la síntesis de un alcohol graso. Se transforma el plásmido en una cepa de base tal como la cepa MG1655 (véase el ejemplo 5) en la que se ha introducido un gen adicional que codifica para FadE en el genoma bajo el control del promotor *P_{trc}* inducible por IPTG.

Después se cultiva la cepa resultante y se analiza para determinar su capacidad para producir alcoholes grasos y dioles grasos tal como se describió en los ejemplos 1 y 2. Se espera que la cepa produzca 3-(S)-dioles grasos.

20 **EJEMPLO 14. Producción de 3-(S)-dioles grasos usando *fadB(Glu119Gln)***

Este ejemplo describe cómo demostrar la producción de 3-(S)-dioles grasos en *E. coli* recombinante usando una ruta metabólica que incluye una 3-hidroxi-acil-ACP acil-CoA transacilasa o tioesterasa, *fadB(Glu119Gln)* que conserva actividad deshidrogenasa pero es deficiente en cuanto a actividad deshidratasa, y expresa una acil graso-CoA reductasa, *acr1*, de *Acinetobacter bailyi* (número de registro de Genbank AAC45217).

25 Se clonan los genes que codifican para 'Tesa, FadD, FadB(Glu119Gln) y Acr1 en un vector derivado de pCL1920 (replicón de SC101, marcador de resistencia a espectinomicina), de manera que su transcripción se controla por el promotor *P_{trc}* inducible por IPTG y completan un operón suficiente para la síntesis de un alcohol graso. Se transforma el plásmido en una cepa de base tal como la cepa MG1655 (véase el ejemplo 5) en la que se ha introducido un gen adicional que codifica para FadA en el genoma bajo el control del promotor *P_{trc}* inducible por IPTG.

30 Después se cultiva la cepa resultante y se analiza para determinar su capacidad para producir alcoholes grasos y dioles tal como se describió en los ejemplos 1 y 2. Se espera que la cepa produzca 3-(S)-dioles grasos.

Lista de secuencias

<110> LS9, INC.

35

<120> PRODUCCIÓN MICROBIANA DE DIOLES GRASOS

<130> LS00052PCT

40 <140>

<141>

<150> 62/026.573

<151> 18-07-2014

45

<160> 8

ES 2 700 578 T3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

5 <211> 342

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido variante de AAR sintético"

<400> 1

Met Ala Phe Gly Leu Ile Gly His Ala Thr Ser Leu Glu Gln Ala Arg
1 5 10 15

Asp Val Trp Arg Arg Leu Gly Tyr Asp Glu Tyr Ala Asp Gln Gly Leu
20 25 30

Glu Phe Trp Ser Ser Ala Pro Pro Gln Ile Val Asp Glu Ile Thr Val
35 40 45

Thr Ser Ala Thr Gly Lys Val Ile His Gly Arg Tyr Ile Glu Ser Gly
50 55 60

Phe Leu Pro Glu Met Leu Ala Ala Arg Arg Phe Lys Thr Ala Thr Arg
65 70 75 80

Lys Val Leu Asn Ala Met Ser His Ala Gln Lys His Gly Ile Asp Ile
85 90 95

Ser Ala Leu Gly Gly Phe Thr Ser Ile Ile Phe Glu Asn Phe Asp Leu
100 105 110

Ala Lys Leu Arg Gln Val Arg Asp Thr Thr Leu Glu Phe Glu Arg Phe
115 120 125

Thr Thr Gly Asn Thr His Thr Ala Tyr Val Ile Cys Arg Gln Val Glu
130 135 140

ES 2 700 578 T3

Ala Ala Ala Lys Thr Leu Gly Ile Asp Ile Ala Gln Ala Thr Val Ala
145 150 155 160

Val Val Gly Ala Thr Gly Asp Ile Gly Ser Ala Val Cys Arg Trp Leu
165 170 175

Asp Leu Lys Leu Gly Val Gly Asp Leu Ile Leu Thr Ala Arg Asn Gln
180 185 190

Glu Arg Leu Asp Asn Leu Gln Ala Glu Leu Gly Arg Gly Lys Ile Leu
195 200 205

Pro Leu Glu Ala Ala Leu Pro Glu Ala Asp Phe Ile Val Trp Val Ala
210 215 220

Ser Met Pro Gln Gly Val Val Ile Asp Pro Ala Thr Leu Lys Gln Pro
225 230 235 240

Cys Val Leu Ile Asp Gly Gly Tyr Pro Lys Asn Leu Gly Ser Lys Val
245 250 255

Gln Gly Glu Gly Ile Tyr Val Leu Asn Gly Gly Val Val Glu His Cys
260 265 270

Phe Asp Ile Asp Trp Gln Ile Met Ser Leu Ala Glu Met Ala Arg Pro
275 280 285

Glu Arg Gln Met Phe Ala Cys Phe Ala Glu Ala Met Leu Leu Glu Phe
290 295 300

Glu Gly Trp His Thr Asn Phe Ser Trp Gly Arg Asn Gln Ile Thr Ile
305 310 315 320

Glu Lys Met Glu Ala Ile Gly Glu Ala Ser Val Arg His Gly Phe Gln
325 330 335

Pro Leu Ala Leu Ala Ile
340

<210> 2

<211> 1029

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

ES 2 700 578 T3

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido variante de AAR sintético"

<400> 2

atggcattcg gtcttatcgg tcatgcaacc agtttggagc aggcccgcga cgtttggcgc	60
aggctgggct acgacgaata cgccgatcaa ggattggagt tttggagtag cgctcctcct	120
caaatcgttg atgaaatcac agtcaccagt gccacaggca aggtgattca cggtcgctac	180
atcgaatcgg ggttcttgcc ggaaatgctg gcggcgcgcc gcttcaaac agcaacgcgc	240
aaagttctca atgccatgtc ccatgcccaa aacacggca tcgacatctc ggccttgggg	300
ggctttacct cgattatfff cgagaatttc gatttggcca agttgcggca agtgcgcgac	360
actaccttgg agtttgaacg gttcaccacc ggcaatactc acacggccta cgtaatctgt	420
agacagggtg aagccgctgc taaaacgctg ggcatcgaca ttgcgcaagc gacagtagcg	480
gttgtcggcg cgactggcga tatcggtagc gctgtctgcc gctggctcga cctcaaactg	540
ggtgtcggtg atttgatcct gacggcgcgc aatcaggagc gtttggataa cctgcaggct	600
gaactcggcc ggggcaagat tctgcccttg gaagccgctc tgccggaagc tgactttatc	660
gtgtgggtcg ccagtatgcc tcagggcgta gtgatcgacc cagcaaccct gaagcaacc	720
tgcgtcctaa tcgacggggg ctaccccaa aacttgggca gcaaagtcca aggtgagggc	780
atctatgtcc tcaatggcgg ggtagttgaa cattgcttcg acatcgactg gcagatcatg	840
tccttggcag agatggcgcg gcccgagcgc cagatgtttg cctgctttgc cgaggogatg	900
ctcttggaat ttgaaggctg gcatactaac ttctcctggg gccgcaacca aatcacgatc	960
gagaagatgg aagcgatcgg tgaggcatcg gtgcgccacg gcttccaacc cttggcattg	1020
gcaatttga	1029

<210> 3

5 <211> 1174

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido variante de CAR sintético"

<400> 3

ES 2 700 578 T3

Met Gly Thr Ser Asp Val His Asp Ala Thr Asp Gly Val Thr Glu Thr
1 5 10 15

Ala Leu Arg Asp Arg Gln Arg Thr Arg Arg Ile Ala Glu Leu Tyr Ala
20 25 30

Thr Asp Pro Glu Phe Ala Ala Ala Ala Pro Leu Pro Ala Val Val Asp
35 40 45

Ala Ala His Lys Pro Gly Leu Arg Leu Ala Glu Ile Leu Gln Thr Leu

ES 2 700 578 T3

Leu Asn His Leu Gly Gly Arg Ile Pro Ile Ser Thr Ala Val Gln Asn
 305 310 315 320

Gly Gly Thr Ser Tyr Phe Val Pro Glu Ser Asp Met Ser Thr Leu Phe
 325 330 335

Glu Asp Leu Ala Leu Val Arg Pro Thr Glu Leu Gly Leu Val Pro Arg
 340 345 350

Val Ala Asp Met Leu Tyr Gln His His Leu Ala Thr Val Asp Arg Leu
 355 360 365

Val Thr Gln Gly Ala Asp Glu Leu Thr Ala Glu Lys Gln Ala Gly Ala
 370 375 380

Glu Leu Arg Glu Gln Val Leu Gly Gly Arg Val Ile Thr Gly Phe Val
 385 390 395 400

Ser Thr Ala Pro Leu Ala Ala Glu Met Arg Ala Phe Leu Asp Ile Thr
 405 410 415

Leu Gly Ala His Ile Val Asp Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Gly Ala
 420 425 430

Val Thr Arg Asp Gly Val Ile Val Arg Pro Pro Val Ile Asp Tyr Lys
 435 440 445

Leu Ile Asp Val Pro Glu Leu Gly Tyr Phe Ser Thr Asp Lys Pro Tyr
 450 455 460

Pro Arg Gly Glu Leu Leu Val Arg Ser Ile Thr Leu Thr Pro Gly Tyr
 465 470 475 480

Tyr Lys Arg Pro Glu Val Thr Ala Ser Val Phe Asp Arg Asp Gly Tyr
 485 490 495

Tyr His Thr Gly Asp Val Met Ala Glu Thr Ala Pro Asp His Leu Val
 500 505 510

Tyr Val Asp Arg Arg Asn Asn Val Leu Lys Leu Ala Gln Gly Glu Phe
 515 520 525

Val Ala Val Ala Asn Leu Glu Ser Val Phe Ser Gly Ala Ala Leu Val
 530 535 540

Arg Gln Ile Phe Val Tyr Gly Asn Ser Glu Arg Ser Phe Leu Leu Ala
 545 550 555 560

ES 2 700 578 T3

Val Val Val Pro Thr Pro Glu Ala Leu Glu Gln Tyr Asp Pro Ala Ala
565 570 575

Leu Lys Ala Ala Leu Ala Asp Ser Leu Gln Arg Thr Ala Arg Asp Ala
580 585 590

Glu Leu Gln Ser Tyr Glu Val Pro Ala Asp Phe Ile Val Glu Thr Glu
595 600 605

Pro Phe Ser Ala Ala Asn Gly Leu Leu Ser Gly Val Gly Lys Leu Leu
610 615 620

Arg Pro Asn Leu Lys Asp Arg Tyr Gly Gln Arg Leu Glu Gln Met Tyr
625 630 635 640

Ala Asp Ile Ala Ala Thr Gln Ala Asn Gln Leu Arg Glu Leu Arg Arg
645 650 655

Ala Ala Ala Thr Gln Pro Val Ile Asp Thr Leu Thr Gln Ala Ala Ala
660 665 670

Thr Ile Leu Gly Thr Gly Ser Glu Val Ala Ser Asp Ala His Phe Thr
675 680 685

Asp Leu Gly Gly Asp Ser Leu Ser Ala Leu Thr Leu Ser Asn Leu Leu
690 695 700

Ser Asp Phe Phe Gly Phe Glu Val Pro Val Gly Thr Ile Val Asn Pro
705 710 715 720

Ala Thr Asn Leu Ala Gln Leu Ala Gln His Ile Glu Ala Gln Arg Thr
725 730 735

Ala Gly Asp Arg Arg Pro Ser Phe Thr Thr Val His Gly Ala Asp Ala
740 745 750

Thr Glu Ile Arg Ala Ser Glu Leu Thr Leu Asp Lys Phe Ile Asp Ala
755 760 765

Glu Thr Leu Arg Ala Ala Pro Gly Leu Pro Lys Val Thr Thr Glu Pro
770 775 780

Arg Thr Val Leu Leu Ser Gly Ala Asn Gly Trp Leu Gly Arg Phe Leu
785 790 795 800

Thr Leu Gln Trp Leu Glu Arg Leu Ala Pro Val Gly Gly Thr Leu Ile
805 810 815

ES 2 700 578 T3

Thr Ile Val Arg Gly Arg Asp Asp Ala Ala Ala Cys Ala Arg Leu Thr
 820 825 830

Gln Ala Tyr Asp Thr Asp Pro Glu Leu Ser Arg Arg Phe Ala Glu Leu
 835 840 845

Ala Asp Arg His Leu Arg Val Val Ala Gly Asp Ile Gly Asp Gln Asn
 850 855 860

Leu Gly Leu Thr Pro Glu Leu Trp His Arg Leu Ala Ala Glu Val Asp
 865 870 875 880

Leu Val Val His Pro Ala Ala Leu Val Asn His Val Leu Pro Tyr Arg
 885 890 895

Gln Leu Phe Gly Pro Asn Val Val Gly Thr Ala Glu Val Ile Lys Leu
 900 905 910

Ala Leu Thr Glu Arg Ile Lys Pro Val Thr Tyr Leu Ser Thr Ala Lys
 915 920 925

Val Ala Met Gly Ile Pro Asp Phe Glu Glu Asp Gly Asp Ile Arg Thr
 930 935 940

Val Ser Pro Val Arg Pro Leu Asp Gly Gly Tyr Ala Asn Gly Tyr Gly
 945 950 955 960

Asn Ser Lys Trp Ala Gly Glu Val Leu Leu Arg Glu Ala His Asp Leu
 965 970 975

Cys Gly Leu Pro Val Ala Thr Phe Arg Ser Asp Met Ile Leu Ala His
 980 985 990

Pro Arg Tyr Arg Gly Gln Val Asn Val Pro Asp Met Phe Thr Arg Leu
 995 1000 1005

Leu Leu Ser Leu Leu Ile Thr Gly Val Ala Pro Arg Ser Phe Tyr
 1010 1015 1020

Ile Gly Asp Gly Glu Arg Pro Arg Ala His Tyr Pro Gly Leu Thr
 1025 1030 1035

Val Asp Phe Val Ala Glu Ala Val Thr Thr Leu Gly Ala Gln Gln
 1040 1045 1050

Arg Glu Gly Tyr Val Ser Tyr Asp Val Met Asn Pro His Asp Asp

ES 2 700 578 T3

1055						1060									1065
Gly	Ile	Ser	Leu	Asp	Val	Phe	Val	Asp	Trp	Leu	Ile	Arg	Ala	Gly	
1070						1075					1080				
His	Pro	Ile	Asp	Arg	Val	Asp	Asp	Tyr	Asp	Asp	Trp	Val	Arg	Arg	
1085						1090					1095				
Phe	Glu	Thr	Ala	Leu	Thr	Ala	Leu	Pro	Glu	Lys	Arg	Arg	Ala	Gln	
1100						1105					1110				
Thr	Val	Leu	Pro	Leu	Leu	His	Ala	Phe	Arg	Ala	Pro	Gln	Ala	Pro	
1115						1120					1125				
Leu	Arg	Gly	Ala	Pro	Glu	Pro	Thr	Glu	Val	Phe	His	Ala	Ala	Val	
1130						1135					1140				
Arg	Thr	Ala	Lys	Val	Gly	Pro	Gly	Asp	Ile	Pro	His	Leu	Asp	Glu	
1145						1150					1155				
Ala	Leu	Ile	Asp	Lys	Tyr	Ile	Arg	Asp	Leu	Arg	Glu	Phe	Gly	Leu	
1160						1165					1170				

Ile

<210> 4

<211> 3525

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido variante de CAR sintético (carB12)"

10

<400> 4

ES 2 700 578 T3

atgggcacga gcgatgttca cgacgcgacc gacggcgta cggagactgc actgcgtgat	60
cgccagcgca ctcgtcgtat tgcagaactg tacgcaacgg acccagagtt cgcagcagca	120
gctcctctgc cggccgttgt cgatgcggcg cacaaaccgg gcctgcgtct ggcggaaatc	180
ctgcagaccc tgttcaccgg ctacggcgat cgtccggcgc tgggctatcg tgcacgtgag	240
ctggcgacgg acgaaggcgg tcgtacggtc acgcgtctgc tgccgcgctt cgataacctg	300
acctatgcac aggtgtggag cctgttcaa gcagtggctg cagcgttgcg tcacaatttc	360
gcacaaccga ttaccggg cgacgcggtc gcgactatcg gctttgcgag cccggactat	420
ttgacgctgg atctggtgtg cgcgtatctg ggcctggcga gcgttccttt gcagcataac	480
gctccggtgt ctgcctggc cccgattctg gccgaggtgg aaccgcgtat tctgacggtg	540

ES 2 700 578 T3

agcgcagaat acctggacct ggcggttgaa tccgtccgtg atgtgaactc cgtcagccag 600
 ctggttgttt tcgaccatca tccggaagtg gacgatcacc gtgacgcact ggctcgcgca 660
 cgcgagcagc tggccggcaa aggtatcgca gttacgaccc tggatgcatg cgcagacgaa 720
 ggcgcagggt tgccggctga gccgatttac acggcggatc acgatcagcg tctggccatg 780
 attctgtata ccagcggctc tacgggtgct ccgaaaggcg cgatgtacac cgaagcgatg 840
 gtggctcgcc tgtggactat gagcgggatc acgggcgacc cgaccccggt tatcaacgtg 900
 aacttcatgc cgctgaacca tctgggcggg cgtatccoga ttagcaccgc cgtgcagaat 960
 ggcggtacca gctacttcgt tccggaaagc gacatgagca cgctgtttga ggatctggcc 1020
 ctggtccgcc ctaccgaact gggctctggg ccgcgtggtg cggacatgct gtaccagcat 1080
 catctggcga ccgtggatcg cctggtgacc cagggcgcgg acgaactgac tgcggaaaag 1140
 caggccggtg cggaactgcg tgaacaggtc ttgggcggtc gtgttatcac cggttttggt 1200
 tccaccgcgc cgttggcggc agagatgctg gttttctgg atatcaccctt ggggtgcacac 1260
 atcgttgacg gttacggtct gaccgaaacc ggtgcggtca cccgtgatgg tgtgattggt 1320
 cgtcctccgg tcattgatta caagctgatc gatgtgccgg agctgggtta cttctccacc 1380
 gacaaaccgt acccgcgtgg cgagctgctg gttcgtagca tcacgttgac tccgggttac 1440
 tacaagcgcc cagaagtac cgcgtccggt ttcgatcgcg acggctatta ccacaccggc 1500
 gacgtgatgg cagaaaccgc gccagaccac ctggtgatg tggaccgcgg caacaatggt 1560
 ctgaagctgg cgcaaggatg atttgtcgcc gtggctaacc tggagtccgt tttcagcggc 1620
 gctgctctgg tccgccagat tttcgtgat ggtaacagcg agcgcagctt tctggtggct 1680
 gttgttgtcc ctaccccgga ggcgctggag caatacgacc ctgccgcatt gaaagcagcc 1740
 ctggcggatt cgctgcagcg tacggcgcgt gatgccgagc tgcagagcta tgaagtgccg 1800
 gcggacttca ttgttgagac tgagcctttt agcgtgcga acggtctgct gagcgggtgtt 1860
 ggcaagttgc tgcgtccgaa tttgaaggat cgctacggtc agcgtttgga gcagatgtac 1920
 gcggacatcg cggctacgca ggcgaaccaa ttgcgtgagc tgcgtcgcgc tgcggctact 1980
 caaccggtga tcgacacgct gacgcaagct gcggcgacca tcctgggtac cggcagcgag 2040
 gttgcaagcg acgcacactt tactgatttg ggcggtgatt ctctgagcgc gctgacgttg 2100
 agcaacttgc tgtctgactt ctttggtttt gaagtccgg ttggcacgat tgtaaccoca 2160
 gcgactaatc tggcacagct ggcgcaacat atcgaggcgc agcgcacggc gggtgaccgc 2220
 cgtccatcct ttacgacggg ccacgggtgcg gatgctacgg aatccgtgc aagcgaactg 2280
 actctggaca aattcatcga cgctgagact ctgcgcgcag cacctggttt gccgaaggtt 2340
 acgactgagc cgcgtacggg cctggtgagc ggtgccaatg gttggttggg ccgcttcctg 2400

ES 2 700 578 T3

accctgcagt ggctggaacg tttggcaccg gttggcggta ccctgatcac cattgtgcgc 2460
 ggtcgtgacg atgcagcggc ctgtgcacgc ttgactcagg cttacgatac ggaccagag 2520
 ctgtcccgcc gcttcgctga gttggcggat cgccacttgc gtgtggtggc aggtgatatac 2580
 ggcgatcaga atctgggcct gaccccgag ctgtggcacc gtctggcagc agaggtcgat 2640
 ctggtcgttc atccagcggc cctggtcaac cacgtcctgc cgtaccgcca gctgtttggt 2700
 ccgaatgttg ttggcaccgc cgaagttatc aagttggctc tgaccgagcg catcaagcct 2760
 gttacctacc tgtccacggc gaaggtcgcg atgggtattc ctgattttga ggaggacggg 2820
 gacattcgta ccgtcagccc ggttcgtccg ctggatggtg gctatgcaaa tggctatggc 2880
 aacagcaagt gggctggcga ggtgctgctg cgcgaggcac atgacctgtg tggcctgccg 2940
 gttgcgacgt ttcgtagcga catgattctg gccaccgcc gctaccgtgg ccaagtgaat 3000
 gtgccggaca tgttcaccgg tctgctgctg tccctgctga tcacgggtgt ggcaccgcgt 3060
 tccttctaca ttggtgatgg cgagcgtccg cgtgcacact acccgggcct gaccgtcgat 3120
 tttgttgccg aagcggttac taccctgggt gctcagcaac gtgaggggta tgtctcgat 3180
 gacgttatga atccgcacga tgacggattt agcttggatg tctttgtgga ctggctgatt 3240
 cgtgcggggc acccaattga ccgtgttgac gactatgatg actgggtgcg tcgttttgaa 3300
 accgcggtga ccgccttgcc ggagaaacgt cgtgcgcaga ccgttctgcc gctgctgcat 3360
 gcctttcgcg cgccacaggc gccgttgctg ggcgcccctg aaccgaccga agtgtttcat 3420
 gcagcgggtg gtaccgctaa agtcgggtccg ggtgatattc cgcacctgga tgaagccctg 3480
 atcgacaagt acatccgtga cctgcgcgag ttcggtctga tttag 3525

<210> 5

<211> 1173

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido variante de CAR sintético (carB2)"

10

<400> 5

ES 2 700 578 T3

Met Thr Ser Asp Val His Asp Ala Thr Asp Gly Val Thr Glu Thr Ala
1 5 10 15

Leu Asp Asp Arg Gln Ser Thr Arg Arg Ile Ala Glu Leu Tyr Ala Thr
20 25 30

Asp Pro Glu Phe Ala Ala Ala Ala Pro Leu Pro Ala Val Val Asp Ala
35 40 45

Ala His Lys Pro Gly Leu Arg Leu Ala Glu Ile Leu Gln Thr Leu Phe

ES 2 700 578 T3

Asn His Leu Gly Gly Arg Ile Pro Ile Ser Thr Ala Val Gln Asn Gly
 305 310 315 320
 Gly Thr Ser Tyr Phe Val Pro Glu Ser Asp Met Ser Thr Leu Phe Glu
 325 330 335
 Asp Leu Ala Leu Val Arg Pro Thr Glu Leu Gly Leu Val Pro Arg Val
 340 345 350
 Ala Asp Met Leu Tyr Gln His His Leu Ala Thr Val Asp Arg Leu Val
 355 360 365
 Thr Gln Gly Ala Asp Glu Leu Thr Ala Glu Lys Gln Ala Gly Ala Glu
 370 375 380
 Leu Arg Glu Gln Val Leu Gly Gly Arg Val Ile Thr Gly Phe Val Ser
 385 390 395 400
 Thr Ala Pro Leu Ala Ala Glu Met Arg Ala Phe Leu Asp Ile Thr Leu
 405 410 415
 Gly Ala His Ile Val Asp Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Gly Ala Val
 420 425 430
 Thr Arg Asp Gly Val Ile Val Arg Pro Pro Val Ile Asp Tyr Lys Leu
 435 440 445
 Ile Asp Val Pro Glu Leu Gly Tyr Phe Ser Thr Asp Lys Pro Tyr Pro
 450 455 460
 Arg Gly Glu Leu Leu Val Arg Ser Ile Thr Leu Thr Pro Gly Tyr Tyr
 465 470 475 480
 Lys Arg Pro Glu Val Thr Ala Ser Val Phe Asp Arg Asp Gly Tyr Tyr
 485 490 495
 His Thr Gly Asp Val Met Ala Glu Thr Ala Pro Asp His Leu Val Tyr
 500 505 510
 Val Asp Arg Arg Asn Asn Val Leu Lys Leu Ala Gln Gly Glu Phe Val
 515 520 525
 Ala Val Ala Asn Leu Glu Ser Val Phe Ser Gly Ala Ala Leu Val Arg
 530 535 540
 Gln Ile Phe Val Tyr Gly Asn Ser Glu Arg Ser Phe Leu Leu Ala Val
 545 550 555 560

ES 2 700 578 T3

Val Val Pro Thr Pro Glu Ala Leu Glu Gln Tyr Asp Pro Ala Ala Leu
565 570 575

Lys Ala Ala Leu Ala Asp Ser Leu Gln Arg Thr Ala Arg Asp Ala Glu
580 585 590

Leu Gln Ser Tyr Glu Val Pro Ala Asp Phe Ile Val Glu Thr Glu Pro
595 600 605

Phe Ser Ala Ala Asn Gly Leu Leu Ser Gly Val Gly Lys Leu Leu Arg
610 615 620

Pro Asn Leu Lys Asp Arg Tyr Gly Gln Arg Leu Glu Gln Met Tyr Ala
625 630 635 640

Asp Ile Ala Ala Thr Gln Ala Asn Gln Leu Arg Glu Leu Arg Arg Ala
645 650 655

Ala Ala Thr Gln Pro Val Ile Asp Thr Leu Thr Gln Ala Ala Ala Thr
660 665 670

Ile Leu Gly Thr Gly Ser Glu Val Ala Ser Asp Ala His Phe Thr Asp
675 680 685

Leu Gly Gly Asp Ser Leu Ser Ala Leu Thr Leu Ser Asn Leu Leu Ser
690 695 700

Asp Phe Phe Gly Phe Glu Val Pro Val Gly Thr Ile Val Asn Pro Ala
705 710 715 720

Thr Asn Leu Ala Gln Leu Ala Gln His Ile Glu Ala Gln Arg Thr Ala
725 730 735

Gly Asp Arg Arg Pro Ser Phe Thr Thr Val His Gly Ala Asp Ala Thr
740 745 750

Glu Ile Arg Ala Ser Glu Leu Thr Leu Asp Lys Phe Ile Asp Ala Glu
755 760 765

Thr Leu Arg Ala Ala Pro Gly Leu Pro Lys Val Thr Thr Glu Pro Arg
770 775 780

Thr Val Leu Leu Ser Gly Ala Asn Gly Trp Leu Gly Arg Phe Leu Thr
785 790 795 800

Leu Gln Trp Leu Glu Arg Leu Ala Pro Val Gly Gly Thr Leu Ile Thr
805 810 815

ES 2 700 578 T3

Ile Val Arg Gly Arg Asp Asp Ala Ala Ala Arg Ala Arg Leu Thr Gln
820 825 830

Ala Tyr Asp Thr Asp Pro Glu Leu Ser Arg Arg Phe Ala Glu Leu Ala
835 840 845

Asp Arg His Leu Arg Val Val Ala Gly Asp Ile Gly Asp Pro Asn Leu
850 855 860

Gly Leu Thr Pro Glu Ile Trp His Arg Leu Ala Ala Glu Val Asp Leu
865 870 875 880

Val Val His Pro Ala Ala Leu Val Asn His Val Leu Pro Tyr Arg Gln
885 890 895

Leu Phe Gly Pro Asn Val Val Gly Thr Ala Glu Val Ile Lys Leu Ala
900 905 910

Leu Thr Glu Arg Ile Lys Pro Val Thr Tyr Leu Ser Thr Val Ser Val
915 920 925

Ala Met Gly Ile Pro Asp Phe Glu Glu Asp Gly Asp Ile Arg Thr Val
930 935 940

Ser Pro Val Arg Pro Leu Asp Gly Gly Tyr Ala Asn Gly Tyr Gly Asn
945 950 955 960

Ser Lys Trp Ala Gly Glu Val Leu Leu Arg Glu Ala His Asp Leu Cys
965 970 975

Gly Leu Pro Val Ala Thr Phe Arg Ser Asp Met Ile Leu Ala His Pro
980 985 990

Arg Tyr Arg Gly Gln Val Asn Val Pro Asp Met Phe Thr Arg Leu Leu
995 1000 1005

Leu Ser Leu Leu Ile Thr Gly Val Ala Pro Arg Ser Phe Tyr Ile
1010 1015 1020

Gly Asp Gly Glu Arg Pro Arg Ala His Tyr Pro Gly Leu Thr Val
1025 1030 1035

Asp Phe Val Ala Glu Ala Val Thr Thr Leu Gly Ala Gln Gln Arg
1040 1045 1050

Glu Gly Tyr Val Ser Tyr Asp Val Met Asn Pro His Asp Asp Gly

ES 2 700 578 T3

1055						1060									1065
Ile	Ser	Leu	Asp	Val	Phe	Val	Asp	Trp	Leu	Ile	Arg	Ala	Gly	His	
	1070					1075					1080				
Pro	Ile	Asp	Arg	Val	Asp	Asp	Tyr	Asp	Asp	Trp	Val	Arg	Arg	Phe	
	1085					1090					1095				
Glu	Thr	Ala	Leu	Thr	Ala	Leu	Pro	Glu	Lys	Arg	Arg	Ala	Gln	Thr	
	1100					1105					1110				
Val	Leu	Pro	Leu	Leu	His	Ala	Phe	Arg	Ala	Pro	Gln	Ala	Pro	Leu	
	1115					1120					1125				
Arg	Gly	Ala	Pro	Glu	Pro	Thr	Glu	Val	Phe	His	Ala	Ala	Val	Arg	
	1130					1135					1140				
Thr	Ala	Lys	Val	Gly	Pro	Gly	Asp	Ile	Pro	His	Leu	Asp	Glu	Ala	
	1145					1150					1155				
Leu	Ile	Asp	Lys	Tyr	Ile	Arg	Asp	Leu	Arg	Glu	Phe	Gly	Leu	Ile	
	1160					1165					1170				

<210> 6

<211> 3525

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido variante de CAR sintético (carB2)"

10

<400> 6

ES 2 700 578 T3

atgggcacga gcgatgttca cgacgcgacc gacggcgтта ccgagactgc actggatgat	60
cgccagagca ctcgtcgtat tgcagaactg tacgcaacgg acccagagtt cgcagcagca	120
gctcctctgc cggccgttgt cgatgcggcg cacaaaccgg gcctgcgtct ggcggaaatc	180
ctgcagaccc tgttcaccgg ctacggcgat cgtccggcgc tgggctatcg tgcacgtgag	240
ctggcgacgg acgaaggcgg tcgtacggtc acgcgtctgc tgccgcgctt cgataacctg	300
acctatgcac aggtgtggag cctgttcaa gcagtggctg cagcgttgcg tcacaatttc	360
gcacaaccga ttaccggg cgacgcggtc gcgactatcg gctttgcgag cccggactat	420
ttgacgctgg atctggtgtg cgcgtatctg ggcctggтca gcgttccttt gcagcataac	480
gctccggtgt ctcgcctggc cccgattctg gccgaggtgg aaccgcgtat tctgacggtg	540
agcgcagaat acctggacct ggcggttgaa tccgtccgtg atgtgaactc cgtcagccag	600
ctggttgttt tcgaccatca tccggaagtg gacgatcacc gtgacgcact ggctcgcgca	660

ES 2 700 578 T3

cgcgagcagc tggccggcaa aggtatcgca gttacgacce tggatgcgat cgcagacgaa 720
 ggcgaggtt tgccggctga gccgatttac acggcggatc acgatcagcg tctggccatg 780
 attctgtata ccagcggctc tacgggtgct ccgaaaggcg cgatgtacac cgaagcgatg 840
 gtggctcgcc tgtggactat gagcgggatc acgggcgacc cgaccccggt tatcaacgtg 900
 aacttcatgc cgctgaacca tctgggcggt cgtatcccga ttagcaccgc cgtgcagaat 960
 ggcggtacca gctacttcgt tccggaaagc gacatgagca cgctgtttga ggatctggcc 1020
 ctggtccgcc ctaccgaact gggctctggtg ccgctgtttg cggacatgct gtaccagcat 1080
 catctggcga ccgtggatcg cctggtgacc cagggcgcgg acgaaactgac tgcggaaaag 1140
 caggccggtg cggaaactgc tgaacaggtc ttgggcggtc gtgttatcac cggttttggt 1200
 tccaccgcgc cgttggcggc agagatgctg gcttttctgg atatcacctt ggggtgcacac 1260
 atcgttgacg gttacggtct gaccgaaacc ggtgcggtca cccgtgatgg tgtgattggt 1320
 cgtcctccgg tcattgatta caagctgac gatgtgccc agctgggta cttctccacc 1380
 gacaaaccgt acccgcgtgg cgagctgctg gttcgtagca tcacgttgac tccgggttac 1440
 tacaagcgcc cagaagtcac cgcgtccgtt ttcgatcgcg acggctatta ccacaccggc 1500
 gacgtgatgg cagaaaccgc gccagaccac ctggtgatg tggaccgcgc caacaatggt 1560
 ctgaagctgg cgcaaggaga atttgtcgcc gtggctaacc tggagtcggt tttcagcggc 1620
 gctgctctgg tccgccagat tttcgtgtat ggtaacagcg agcgcagctt tctggtggct 1680
 gttggtgtcc ctaccccgga ggcgctggag caatacagacc ctgccgcatt gaaagcagcc 1740
 ctggcggatt cgctgcagcg tacggcgcgt gatgccgagc tgcagagcta tgaagtgcgc 1800
 gcggacttca ttggtgagac tgagcctttt agcgtgcga acggtctgct gagcgggtgtt 1860
 ggcaagttgc tgcgccgaa tttgaaggat cgctacggtc agcgtttgga gcagatgtac 1920
 gcggacatcg cggctacgca ggcgaaccaa ttgcgtgagc tgcgtcgccc tgcggctact 1980
 caaccggtga tcgacacgct gacgcaagct gcggcgacca tcctgggtac cggcagcgag 2040
 gttgcaagcg acgcacactt tactgatttg ggcggtgatt ctctgagcgc gctgacgttg 2100
 agcaacttgc tgtctgactt ctttggcttt gaagtcccgg ttggcacgat tgtaaccca 2160
 gcgactaatc tggcacagct ggcgcaacat atcgaggcgc agcgcacggc gggtgaccgc 2220
 cgtccatcct ttacgacggt ccacggtgcg gatgctacgg aatccgtgc aagcgaactg 2280
 actctggaca aattcatcga cgctgagact ctgcgcgcag cacctggttt gccgaaggtt 2340
 acgactgagc cgcgtacggt cctggtgagc ggtgccaatg gttggttggg ccgcttcctg 2400
 accctgcagt ggctggaacg tttggcaccg gttggcggta ccctgatcac cattgtgcgc 2460
 ggtcgtgacg atgcagcggc ccgcgcacgc ttgactcagg cttacgatac ggacccagag 2520

ES 2 700 578 T3

ctgtcccgcc gcttcgctga gttggcggat cgccacttgc gtgtggtggc aggtgatata 2580
 ggcgatccga atctgggcct gaccccgag atttggcacc gtctggcagc agaggtcgat 2640
 ctggtcgttc atccagcggc cctggtcaac cacgtcctgc cgtaccgcca gctgtttggg 2700
 ccgaatgttg ttggcaccgc cgaagttatc aagttggctc tgaccgagcg catcaagcct 2760
 gttacctacc tgtccacggg tagcgtcgcg atgggtattc ctgattttga ggaggacggg 2820
 gacattcgta ccgtcagccc ggttcgtccg ctggatgggt gctatgcaa tggctatggc 2880
 aacagcaagt gggctggcga ggtgctgctg cgcgaggcac atgacctgtg tggcctgccg 2940
 gttgcgacgt ttcgtagcga catgattctg gccaccgcg gctaccgtgg ccaagtgaat 3000
 gtgccggaca tgttcaccgg tctgctgctg tccttctga tcacgggtgt ggcaccgcgt 3060
 tccttctaca ttggtgatgg cgagcgtccg cgtgcacact acccgggcct gaccgtcgat 3120
 tttggtgcgg aagcggttac taccctgggt gctcagcaac gtgaggggta tgtctcgat 3180
 gacgttatga atccgcacga tgacggattt agcttggatg tctttgtgga ctggctgatt 3240
 cgtgcggggc acccaattga ccgtggtgac gactatgatg actgggtgcg tcgttttgaa 3300
 accgcggtga ccgccttgcc ggagaaacgt cgtgcgcaga ccgttctgcc gctgctgcat 3360
 gcctttcgcg cgccacaggc gccgttgcgt ggcgcccctg aaccgaccga agtgtttcat 3420
 gcagcgggtg gtaccgctaa agtcgggtcc ggtgatattc cgcacctgga tgaagccctg 3480
 atcgacaagt acatccgtga cctgcgcgag ttcgggtctga tttag 3525

<210> 7

<211> 1174

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido variante de CAR sintético (carB8)"

10

<400> 7

ES 2 700 578 T3

Met Gly Thr Ser Asp Val His Asp Ala Thr Asp Gly Val Thr Glu Thr
1 5 10 15

Ala Leu Asp Asp Arg Gln Arg Thr Arg Arg Ile Ala Glu Leu Tyr Ala
20 25 30

Thr Asp Pro Glu Phe Ala Ala Ala Ala Pro Leu Pro Ala Val Val Asp
35 40 45

Ala Ala His Lys Pro Gly Leu Arg Leu Ala Glu Ile Leu Gln Thr Leu
50 55 60

Phe Thr Gly Tyr Gly Asp Arg Pro Ala Leu Gly Tyr Arg Ala Arg Glu

ES 2 700 578 T3

Gly Gly Thr Ser Tyr Phe Val Pro Glu Ser Asp Met Ser Thr Leu Phe
 325 330 335

Glu Asp Leu Ala Leu Val Arg Pro Thr Glu Leu Gly Leu Val Pro Arg
 340 345 350

Val Ala Asp Met Leu Tyr Gln His His Leu Ala Thr Val Asp Arg Leu
 355 360 365

Val Thr Gln Gly Ala Asp Glu Leu Thr Ala Glu Lys Gln Ala Gly Ala
 370 375 380

Glu Leu Arg Glu Gln Val Leu Gly Gly Arg Val Ile Thr Gly Phe Val
 385 390 395 400

Ser Thr Ala Pro Leu Ala Ala Glu Met Arg Ala Phe Leu Asp Ile Thr
 405 410 415

Leu Gly Ala His Ile Val Asp Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Gly Ala
 420 425 430

Val Thr Arg Asp Gly Val Ile Val Arg Pro Pro Val Ile Asp Tyr Lys
 435 440 445

Leu Ile Asp Val Pro Glu Leu Gly Tyr Phe Ser Thr Asp Lys Pro Tyr
 450 455 460

Pro Arg Gly Glu Leu Leu Val Arg Ser His Thr Leu Thr Pro Gly Tyr
 465 470 475 480

Tyr Lys Arg Pro Glu Val Thr Ala Ser Val Phe Asp Arg Asp Gly Tyr
 485 490 495

Tyr His Thr Gly Asp Val Met Ala Glu Thr Ala Pro Asp His Leu Val
 500 505 510

Tyr Val Asp Arg Arg Asn Asn Val Leu Lys Leu Ala Gln Gly Glu Phe
 515 520 525

Val Ala Val Ala Asn Leu Glu Ser Val Phe Ser Gly Ala Ala Leu Val
 530 535 540

Arg Gln Ile Phe Val Tyr Gly Asn Ser Glu Arg Ser Phe Leu Leu Ala
 545 550 555 560

Val Val Val Pro Thr Pro Glu Ala Leu Glu Gln Tyr Asp Pro Ala Ala
 565 570 575

ES 2 700 578 T3

Leu Lys Ala Ala Leu Ala Asp Ser Leu Gln Arg Thr Ala Arg Asp Ala
 580 585 590

Glu Leu Gln Ser Tyr Glu Val Pro Ala Asp Phe Ile Val Glu Thr Glu
 595 600 605

Pro Phe Ser Ala Ala Asn Gly Leu Leu Ser Gly Val Gly Lys Leu Leu
 610 615 620

Arg Pro Asn Leu Lys Asp Arg Tyr Gly Gln Arg Leu Glu Gln Met Tyr
 625 630 635 640

Ala Asp Ile Ala Ala Thr Gln Ala Asn Gln Leu Arg Glu Leu Arg Arg
 645 650 655

Ala Ala Ala Thr Gln Pro Val Ile Asp Thr Leu Thr Gln Ala Ala Ala
 660 665 670

Thr Ile Leu Gly Thr Gly Ser Glu Val Ala Ser Asp Ala His Phe Thr
 675 680 685

Asp Leu Gly Gly Asp Ser Leu Ser Ala Leu Thr Leu Ser Asn Leu Leu
 690 695 700

Ser Asp Phe Phe Gly Phe Glu Val Pro Val Gly Thr Ile Val Asn Pro
 705 710 715 720

Ala Thr Asn Leu Ala Gln Leu Ala Gln His Ile Glu Ala Gln Arg Thr
 725 730 735

Ala Gly Asp Arg Arg Pro Ser Phe Thr Thr Val His Gly Ala Asp Ala
 740 745 750

Thr Glu Ile Arg Ala Ser Glu Leu Thr Leu Asp Lys Phe Ile Asp Ala
 755 760 765

Glu Thr Leu Arg Ala Ala Pro Gly Leu Pro Lys Val Thr Thr Glu Pro
 770 775 780

Arg Thr Val Leu Leu Ser Gly Ala Asn Gly Trp Leu Gly Arg Phe Leu
 785 790 795 800

Thr Leu Gln Trp Leu Glu Arg Leu Ala Pro Val Gly Gly Thr Leu Ile
 805 810 815

Thr Ile Val Arg Gly Arg Asp Asp Ala Ala Ala Arg Ala Arg Leu Thr
 820 825 830

ES 2 700 578 T3

Gln Ala Tyr Asp Thr Asp Pro Glu Leu Ser Arg Arg Phe Ala Glu Leu
835 840 845

Ala Asp Arg His Leu Arg Val Val Ala Gly Asp Ile Gly Asp Pro Asn
850 855 860

Leu Gly Leu Thr Pro Glu Ile Trp His Ser Leu Ala Ala Glu Val Asp
865 870 875 880

Leu Val Val His Pro Ala Ala Leu Val Asn His Val Leu Pro Tyr Arg
885 890 895

Gln Leu Phe Gly Pro Asn Val Val Gly Thr Ala Glu Val Ile Lys Leu
900 905 910

Ala Leu Thr Glu Arg Ile Lys Pro Val Thr Tyr Leu Ser Thr Val Gly
915 920 925

Val Ala Arg Gly Ile Pro Asp Phe Glu Glu Asp Gly Asp Ile Arg Thr
930 935 940

Val Ser Pro Val Arg Pro Leu Asp Gly Gly Tyr Ala Asn Gly Tyr Gly
945 950 955 960

Asn Ser Lys Trp Ala Gly Glu Val Leu Leu Arg Glu Ala His Asp Leu
965 970 975

Cys Gly Leu Pro Val Ala Thr Phe Arg Ser Asp Met Ile Leu Ala His
980 985 990

Pro Arg Tyr Arg Gly Gln Val Asn Val Pro Asp Met Phe Thr Arg Leu
995 1000 1005

Leu Leu Ser Leu Leu Ile Thr Gly Val Ala Pro Arg Ser Phe Tyr
1010 1015 1020

Ile Gly Asp Gly Glu Arg Pro Arg Ala His Tyr Pro Gly Leu Thr
1025 1030 1035

Val Asp Phe Val Ala Glu Ala Val Thr Thr Leu Gly Ala Gln Gln
1040 1045 1050

Arg Glu Gly Tyr Val Ser Tyr Asp Val Met Asn Pro His Asp Asp
1055 1060 1065

Gly Ile Ser Leu Asp Val Phe Val Asp Trp Leu Ile Arg Ala Gly

ES 2 700 578 T3

1070						1075						1080			
His	Pro	Ile	Asp	Arg	Val	Asp	Asp	Tyr	Asp	Asp	Trp	Val	Arg	Arg	
1085						1090					1095				
Phe	Glu	Thr	Ala	Leu	Thr	Ala	Leu	Pro	Glu	Lys	Arg	Arg	Ala	Gln	
1100						1105					1110				
Thr	Val	Leu	Pro	Leu	Leu	His	Ala	Phe	Arg	Ala	Pro	Gln	Ala	Pro	
1115						1120					1125				
Trp	Arg	Gly	Ala	Pro	Glu	Pro	Thr	Glu	Val	Phe	His	Ala	Ala	Val	
1130						1135					1140				
Arg	Thr	Ala	Lys	Val	Gly	Pro	Gly	Asp	Ile	Pro	His	Leu	Asp	Glu	
1145						1150					1155				
Ala	Leu	Ile	Asp	Lys	Tyr	Ile	Arg	Asp	Leu	Arg	Glu	Phe	Gly	Leu	
1160						1165					1170				

Ile

<210> 8

<211> 3525

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido variante de CAR sintético (carB8)"

10

<400> 8

ES 2 700 578 T3

atgggcacga gcgatgttca cgacgcgacc gacggcgтта ccgagactgc actggatgat	60
cgccagagga ctcgtcgtat tgcagaactg tacgcaacgg acccagagtt cgcagcagca	120
gctcctctgc cggccgttgt cgatgcggcg cacaaaccgg gcctgcgtct ggcggaaatc	180
ctgcagaccc tgttcaccgg ctacggcgat cgtccggcgc tgggctatcg tgcacgtgag	240
ctggcgacgg acgaaggcgg tcgtacggtc acgcgtctgc tgccgcgctt cgataacctg	300
acctatgcac aggtgtggag cctgttcaa gcagtggctg cagcgttgcg tcacaatttc	360
gcacaaccga ttaccggg cgacgcggtc gcgactatcg gctttgcgag cccggactat	420
ttgacgctgg atctggtgtg cgcgtatctg ggcctggтca gcgttccttt gcagcataac	480
gctccggtgt ctcgcctggc cccgattctg gccgaggtgg aaccgcgtat tctgacggtg	540
agcgcagaat acctggacct ggcggttgaa tccgtccgtg atgtgaactc cgtcagccag	600
ctggttgttt tcgaccatca tccggaagtg gacgatcacc gtgacgcact ggctcgcgca	660

ES 2 700 578 T3

cgcgagcagc tggccggcaa aggtatcgca gttacgacce tggatgcgat cgcagacgaa 720
 ggcgaggtt tgccggctga gccgatttac acggcggatc acgatcagcg tctggccatg 780
 attctgtata ccagcggctc tacgggtgct ccgaaaggcg cgatgtacac cgaagcgatg 840
 gtggctcgcc tgtggactat gagcgggatc acgggcgacc cgaccccggt tatcaacgtg 900
 aacttcatgc cgctgaacca tctgggcggt cgtatcccga ttagcaccgc cgtgcagaat 960
 ggcggtacca gctacttcgt tccggaaagc gacatgagca cgctgtttga ggatctggcc 1020
 ctggtccgcc ctaccgaact gggctctggtg ccgctgtttg cggacatgct gtaccagcat 1080
 catctggcga ccgtggatcg cctggtgacc cagggcgcgg acgaaactgac tgcggaaaag 1140
 caggccgggtg cggaaactgcg tgaacaggtc ttgggcggtc gtgttatcac cggttttggt 1200
 tccaccgcgc cgttggcggc agagatgctg gcttttctgg atatcacctt ggggtgcacac 1260
 atcgttgacg gttacggtct gaccgaaacc ggtgcggtca cccgtgatgg tgtgattggt 1320
 cgtcctccgg tcattgatta caagctgacg gatgtgcccg agctggggtta cttctccacc 1380
 gacaaaccgt acccgcgtgg cgagctgctg gttcgtagcc acacgttgac tccgggttac 1440
 tacaagcgcc cagaagtcac cgcgtccgtt ttcgatcgcg acggctatta ccacaccggc 1500
 gacgtgatgg cagaaaccgc gccagaccac ctggtgatg tggaccgcgc caacaatggt 1560
 ctgaagctgg cgcaagggtga atttgtcgcc gtggctaacc tggagtccgt tttcagcggc 1620
 gctgctctgg tccgccagat tttcgtgtat ggtaacagcg agcgcagctt tctgttggct 1680
 gttgttgtcc ctaccccgga ggcgctggag caatacagcc ctgccgcatt gaaagcagcc 1740
 ctggcggatt cgctgcagcg tacggcgcgt gatgccgagc tgcagagcta tgaagtgccg 1800
 gcggacttca ttgttgagac tgagcctttt agcgcctgca acggtctgct gagcgggtgtt 1860
 ggcaagttgc tgcgctccgaa tttgaaggat cgctacggtc agcgtttgga gcagatgtac 1920
 gcggacatcg cggctacgca ggcgaaccaa ttgcgtgagc tgcgctcgcg tgcggctact 1980
 caaccggtga tcgacacgct gacgcaagct gcggcgacca tcctgggtac cggcagcgag 2040
 gttgcaagcg acgcacactt tactgatttg ggcggtgatt ctctgagcgc gctgacgttg 2100
 agcaacttgc tgtctgactt ctttggcttt gaagtcccgg ttggcacgat tgtaaccca 2160
 gcgactaatc tggcacagct ggcgcaacat atcgaggcgc agcgcacggc gggtgaccgc 2220
 cgtccatcct ttacgacggt ccacggtgcg gatgctacgg aatccgtgc aagcgaactg 2280
 actctggaca aattcatcga cgctgagact ctgcgcgcag cacctggttt gccgaaggtt 2340
 acgactgagc cgcgtacggt cctggtgagc ggtgccaatg gttggttggg ccgcttcctg 2400
 accctgcagt ggctggaacg tttggcaccg gttggcggta ccctgatcac cattgtgcgc 2460
 ggtcgtgacg atgcagcggc ccgcgcacgc ttgactcagg cttacgatac ggacccagag 2520

ES 2 700 578 T3

ctgtcccgcc gcttcgctga gttggcggat cgccacttgc gtgtggtggc aggtgatata	2580
ggcgatccga atctgggcct gaccccgag atttggcaca gtctggcagc agaggtcgat	2640
ctggtcgttc atccagcggc cctggtcaac cacgtcctgc cgtaccgcca gctgtttggg	2700
ccgaatggtg ttggcaccgc cgaagttatc aagttggctc tgaccgagcg catcaagcct	2760
gttacctacc tgtccacggt tggggtcgcg aggggtattc ctgattttga ggaggacggt	2820
gacattcgta ccgtcagccc ggttcgtccg ctggatggtg gctatgcaaa tggctatggc	2880
aacagcaagt gggctggcga ggtgctgctg cgcgaggcac atgacctgtg tggcctgccg	2940
gttgcgacgt ttcgtagcga catgattctg gccaccgcg gctaccgtgg ccaagtgaat	3000
gtgccggaca tgttcaccgc tctgctgctg tcctgctga tcacgggtgt ggcaccgcgt	3060
tccttctaca ttggtgatgg cgagcgtccg cgtgcacact acccgggcct gaccgtcgat	3120
tttgttgcgg aagcggttac taccctgggt gctcagcaac gtgagggtta tgtctcgat	3180
gacgttatga atccgcacga tgacggtatt agcttggatg tctttgtgga ctggctgatt	3240
cgtgcgggcc acccaattga ccgtggtgac gactatgatg actgggtgcg tcgttttgaa	3300
accgcgttga ccgccttgcc ggagaaacgt cgtgcgcaga ccgttctgcc gctgctgcat	3360
gcctttcgcg cgccacaggc gccgtggcgt ggcgcccctg aaccgaccga agtgtttcat	3420
gcagcgggtc gtaccgctaa agtcgggtccg ggtgatattc cgcacctgga tgaagccctg	3480
atcgacaagt acatccgtga cctgcgcgag ttcggtctga tttag	3525

REIVINDICACIONES

1. Microorganismo recombinante para producir un 1,3-diol graso que tiene una longitud de cadena de al menos 5 átomos de carbono cuando crece en un caldo de fermentación con una fuente de carbono simple derivada de una materia prima renovable, estando el microorganismo modificado por ingeniería genética para expresar una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que comprende:
 - (a) una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14); y
 - (b) una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42).
2. Microorganismo recombinante según la reivindicación 1, en el que dicha tioesterasa se selecciona del grupo que consiste en fatB1, TE_EEI82564, TE_CAD63310 y phaG.
3. Microorganismo recombinante según la reivindicación 1, en el que dicho ácido carboxílico reductasa es carB.
4. Método de producción de un 1,3-diol graso que comprende
 - (a) proporcionar un microorganismo recombinante en un caldo de fermentación, expresando dicho microorganismo una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que comprende una actividad tioesterasa (EC 3.1.2.-, EC 3.1.1.5 o EC 3.1.2.14); y una actividad ácido carboxílico reductasa (EC 6.2.1.3 o EC 1.2.1.42); y
 - (b) aislar un 1,3-diol graso de dicho caldo de fermentación, en el que dicho caldo de fermentación comprende una fuente de carbono simple derivada de una materia prima renovable.
5. Microorganismo recombinante según la reivindicación 1, que expresa además una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que comprende una actividad alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.-).
6. Microorganismo recombinante según la reivindicación 5, en el que dicha alcohol deshidrogenasa es alrA.
7. Microorganismo recombinante según la reivindicación 1, en el que dicho 1,3-diol graso se produce *in vivo*.
8. Microorganismo recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-7, en el que dicho 1,3-diol graso se selecciona del grupo que consiste en un 1,3-diol graso C₅, un 1,3-diol graso C₆, un 1,3-diol graso C₇, un 1,3-diol graso C₈, un 1,3-diol graso C₉, un 1,3-diol graso C₁₀, un 1,3-diol graso C₁₁, un 1,3-diol graso C₁₂, un 1,3-diol graso C₁₃, un 1,3-diol graso C₁₄, un 1,3-diol graso C₁₅, un 1,3-diol graso C₁₆, un 1,3-diol graso C₁₇, un 1,3-diol graso C₁₈ y un 1,3-diol graso C₁₉.
9. Microorganismo recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-7, en el que dicho 1,3-diol graso es un 1,3-diol graso C₁₂.
10. Cultivo celular que comprende el microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-9.
11. Cultivo celular según la reivindicación 10, en el que dicho cultivo celular produce 1,3-dioles grasos.
12. Método según la reivindicación 4, que expresa además una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que comprende una actividad alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.-).
13. Método según la reivindicación 4, o cultivo celular según la reivindicación 11, en el que dicho 1,3-diol graso se selecciona del grupo que consiste en un 1,3-diol graso C₅, un 1,3-diol graso C₆, un 1,3-diol graso C₇, un 1,3-diol graso C₈, un 1,3-diol graso C₉, un 1,3-diol graso C₁₀, un 1,3-diol graso C₁₁, un 1,3-diol graso C₁₂, un 1,3-diol graso C₁₃, un 1,3-diol graso C₁₄, un 1,3-diol graso C₁₅, un 1,3-diol graso C₁₆, un 1,3-diol graso C₁₇, un 1,3-diol graso C₁₈ y un 1,3-diol graso C₁₉.

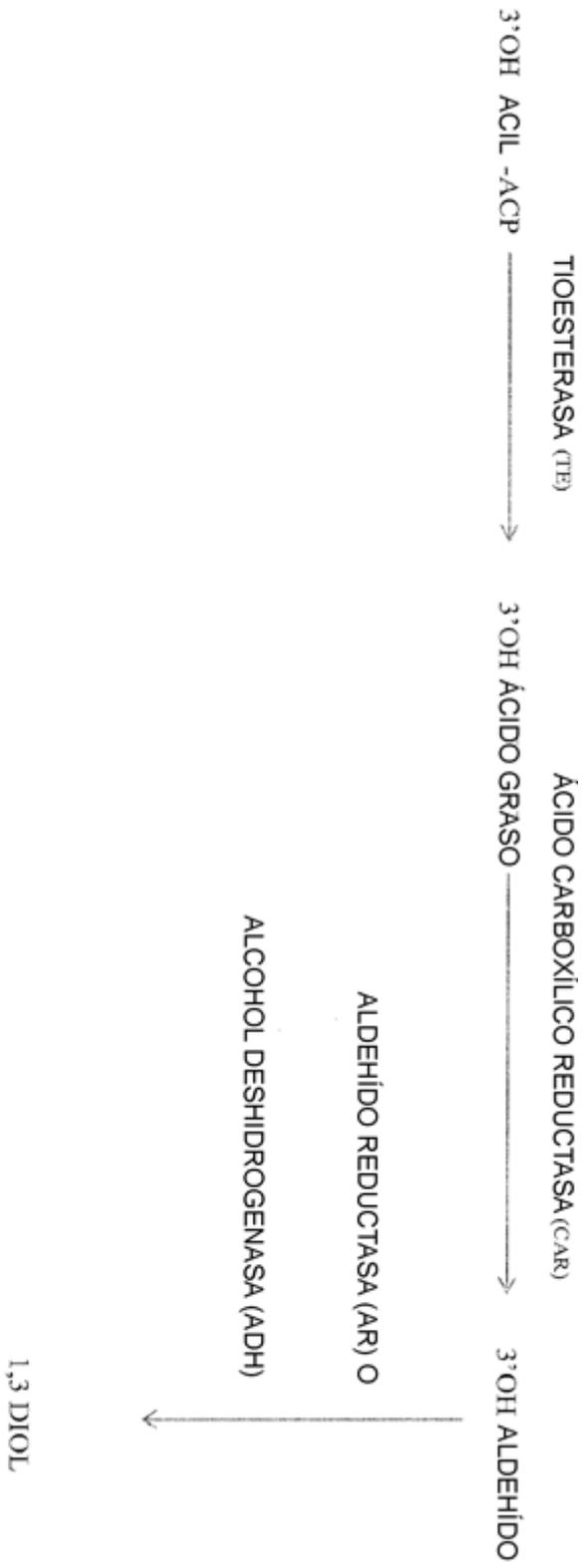


FIGURA 1

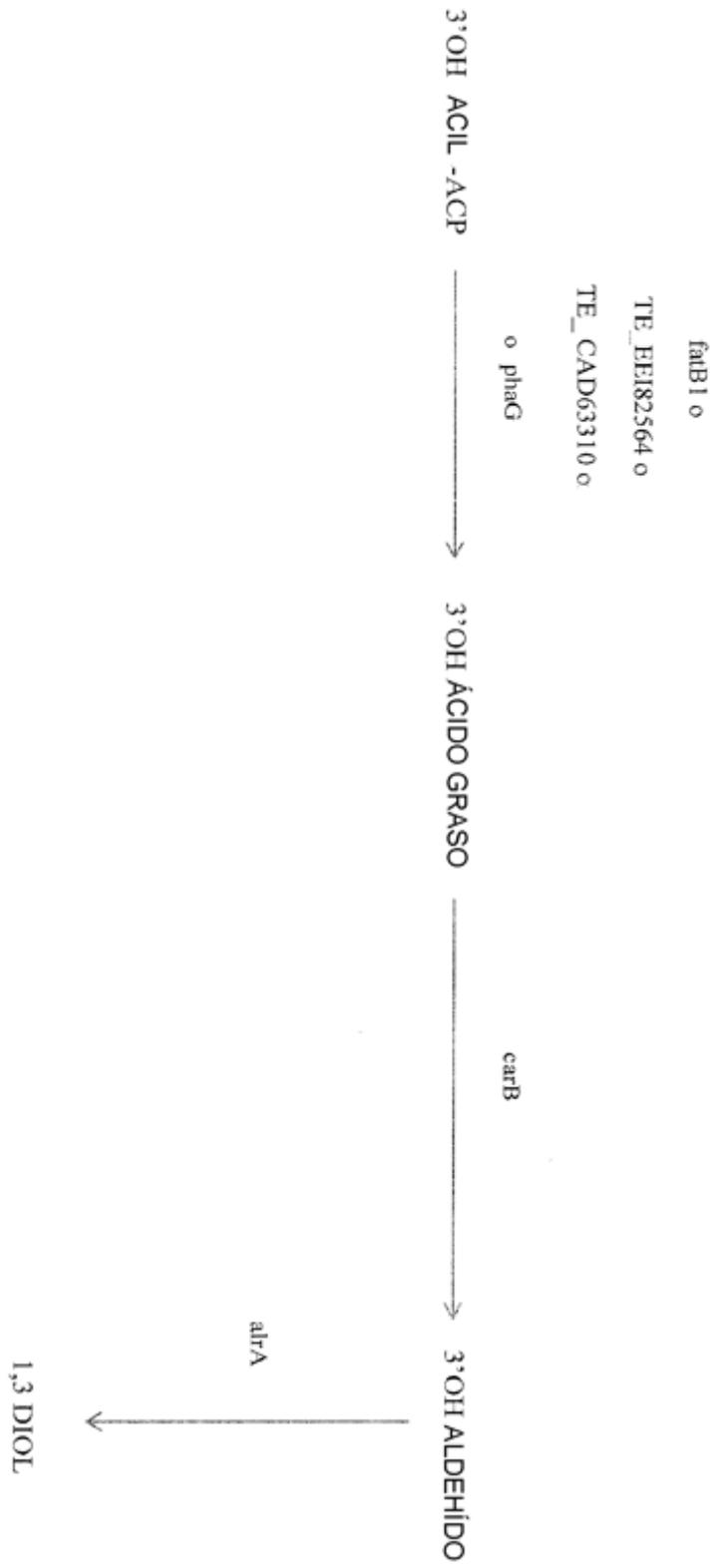


FIGURA 2

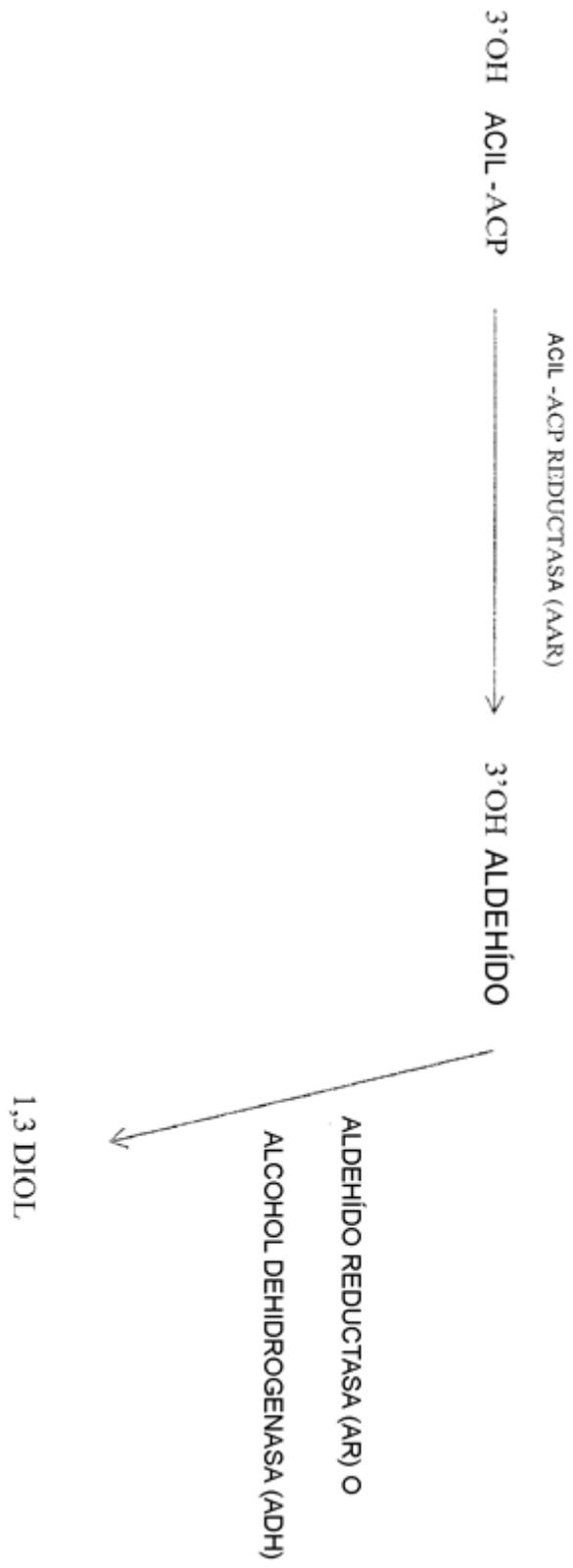


FIGURA 3

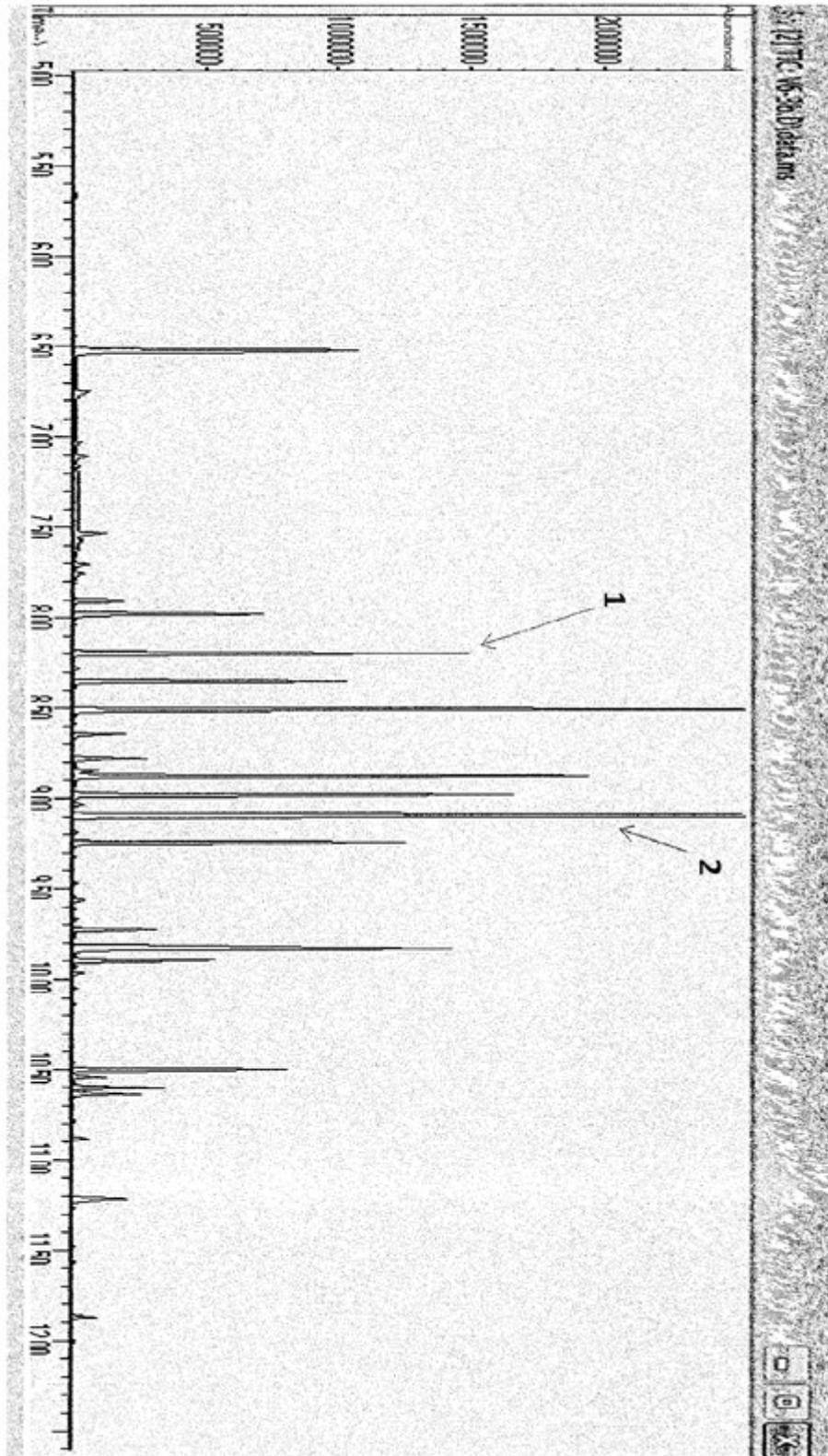


FIGURA 4

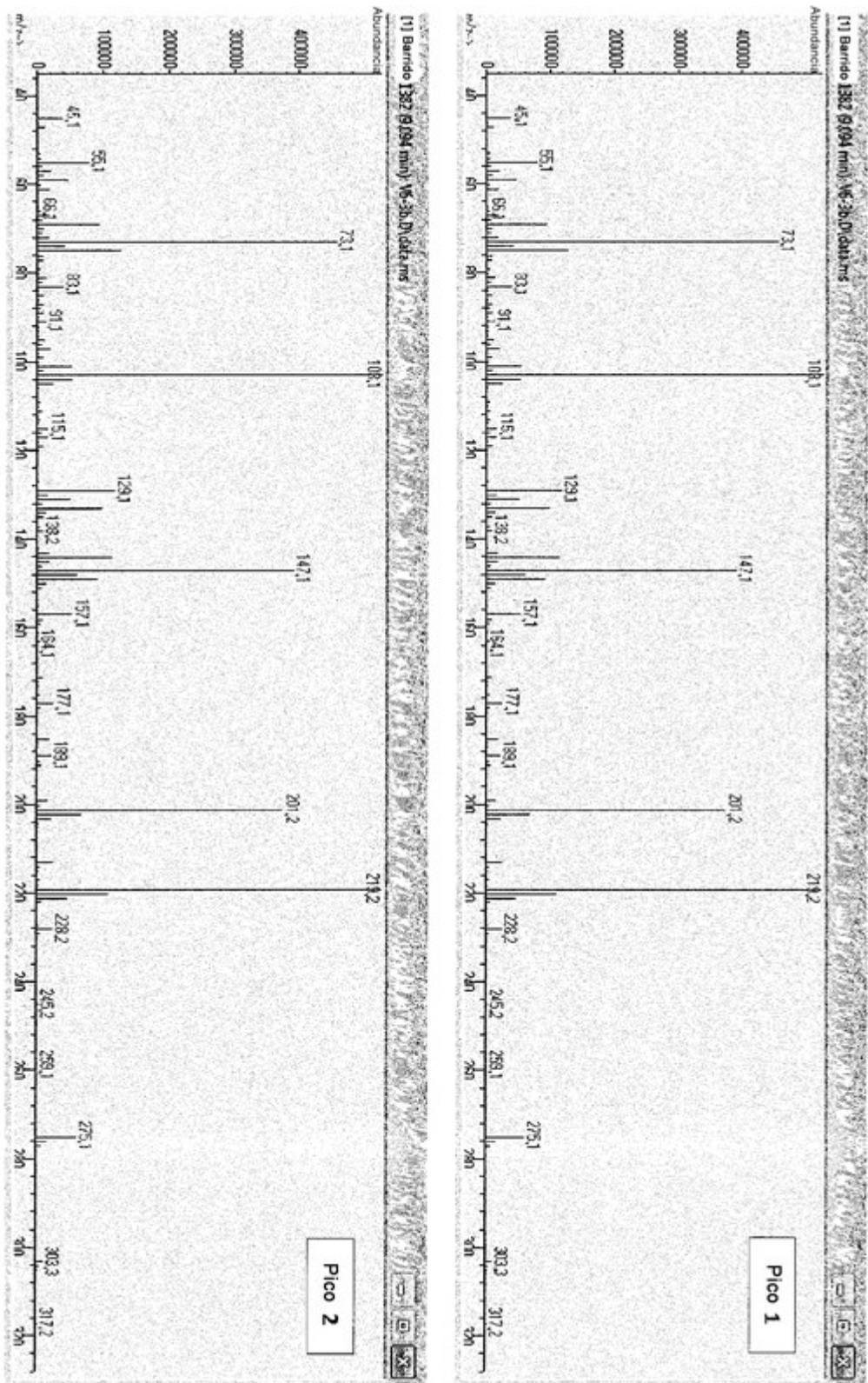


FIGURA 5

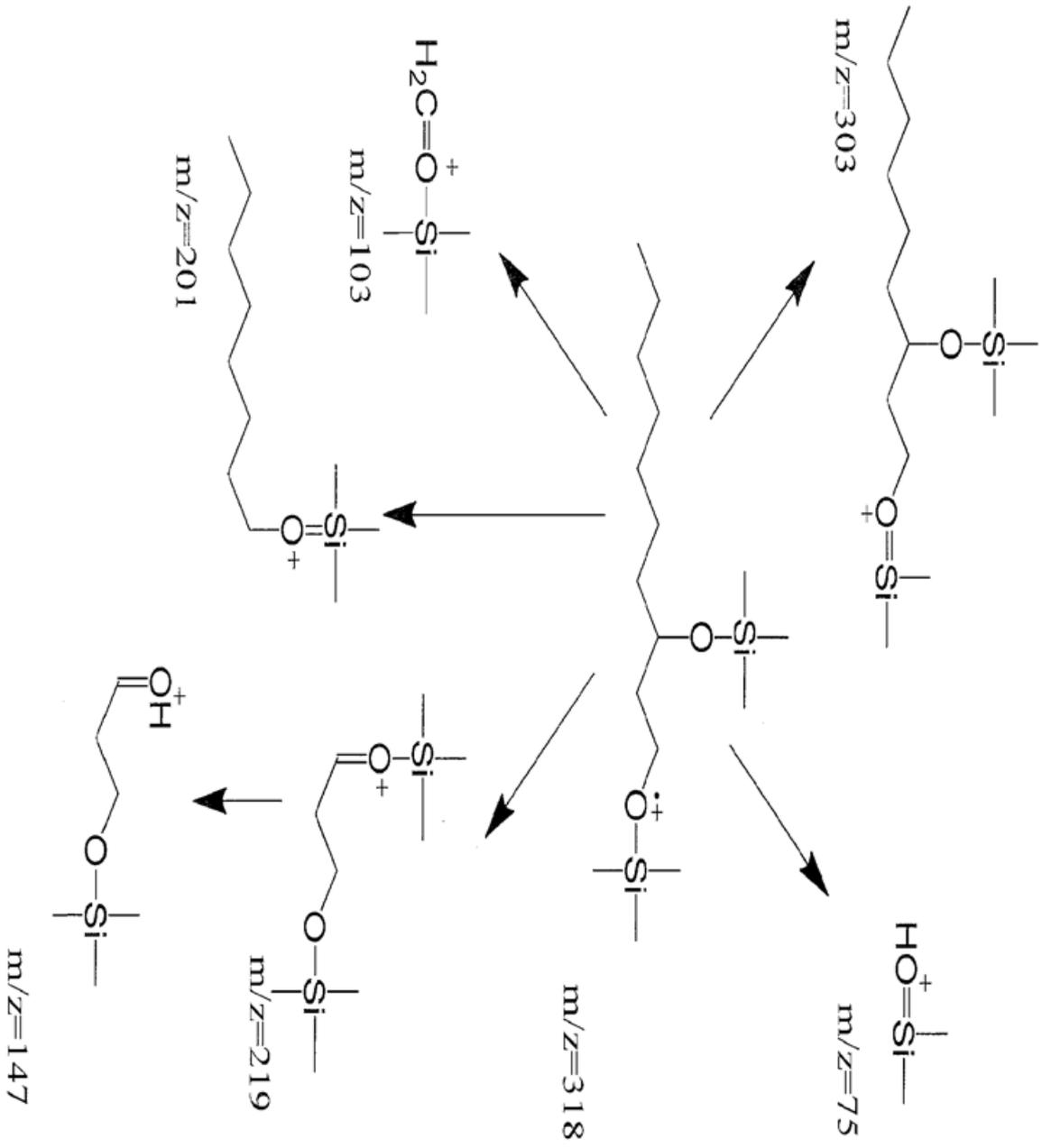


FIGURA 6

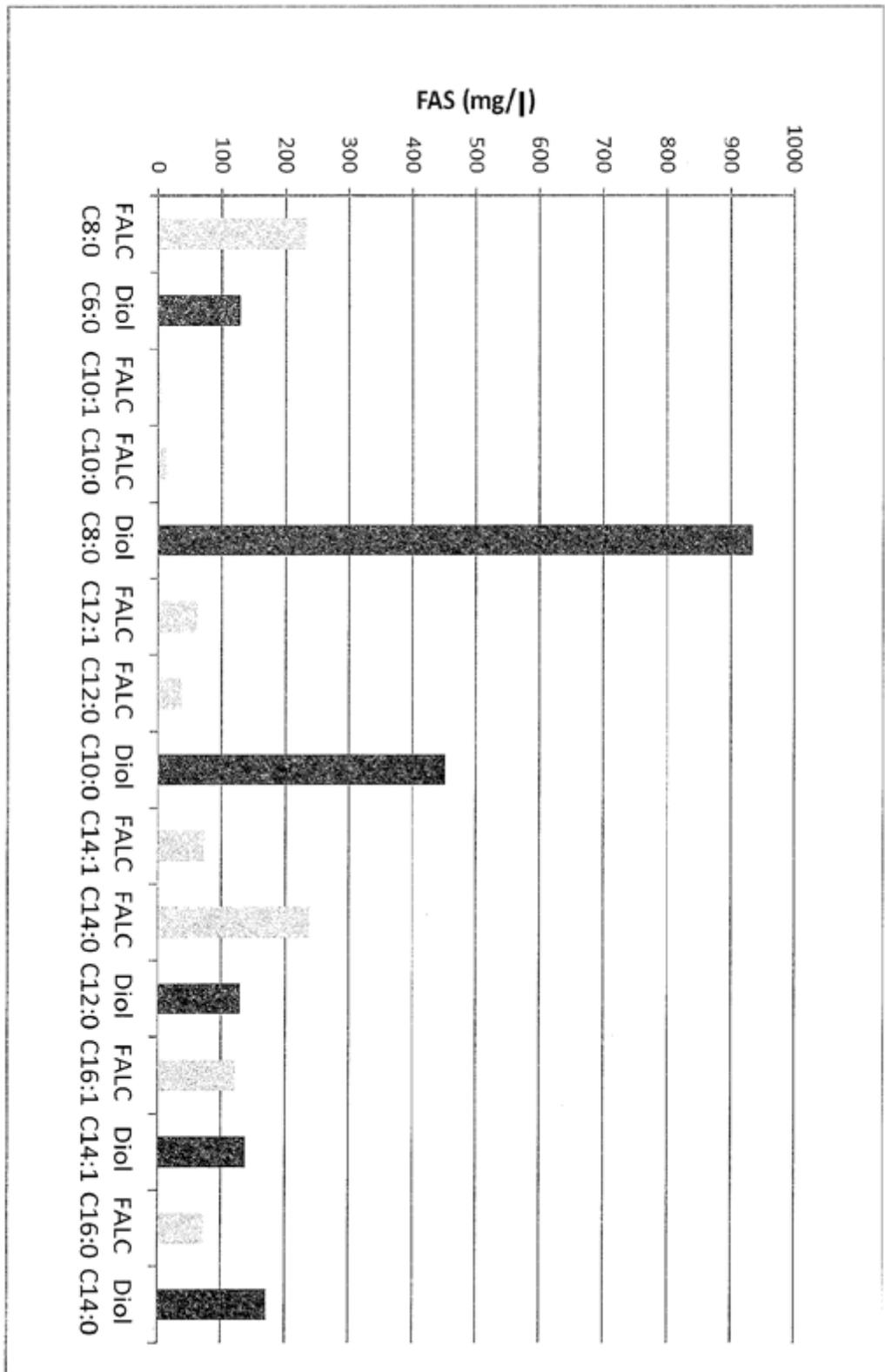


FIGURA 7

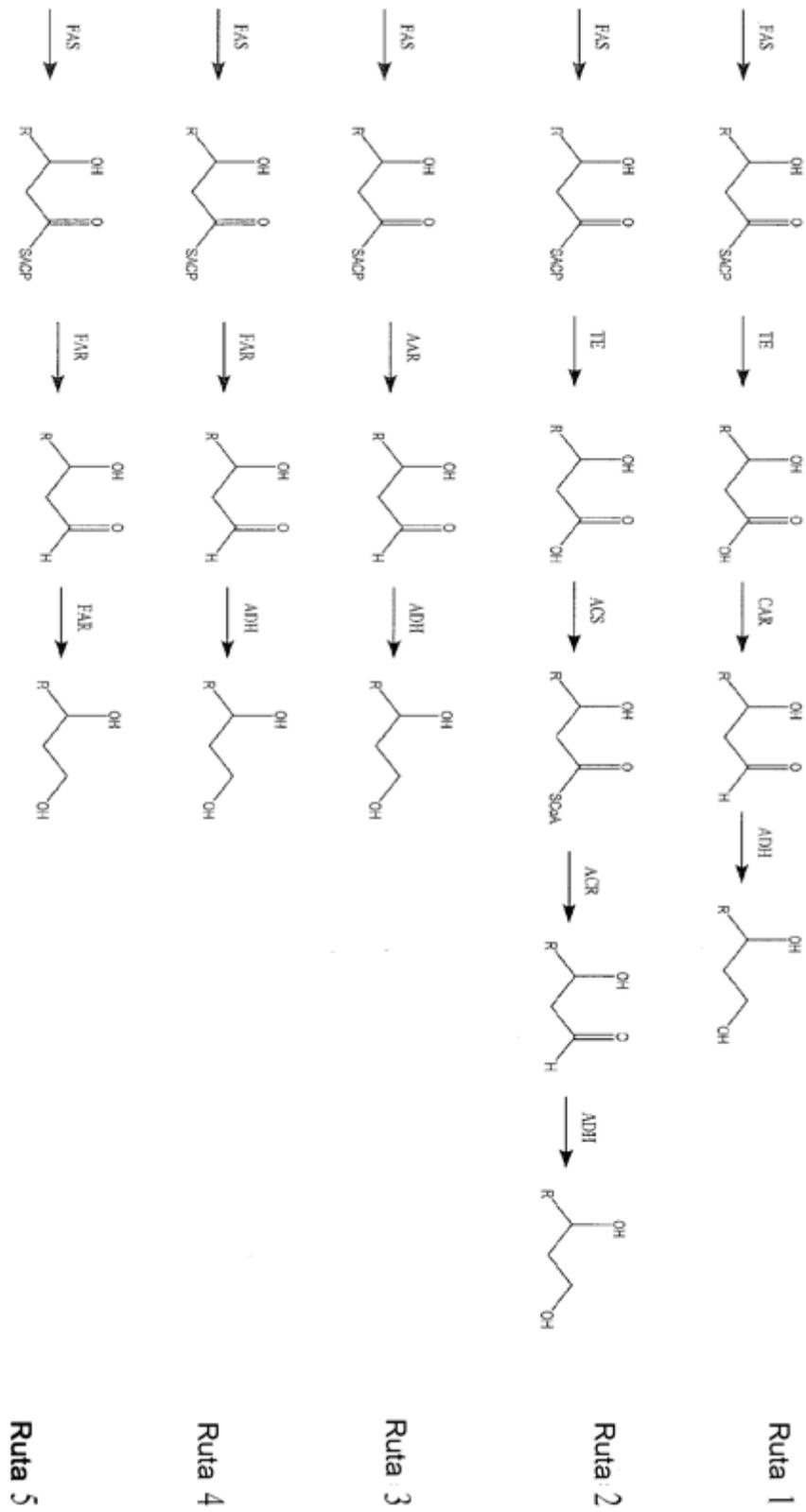


FIGURA 8

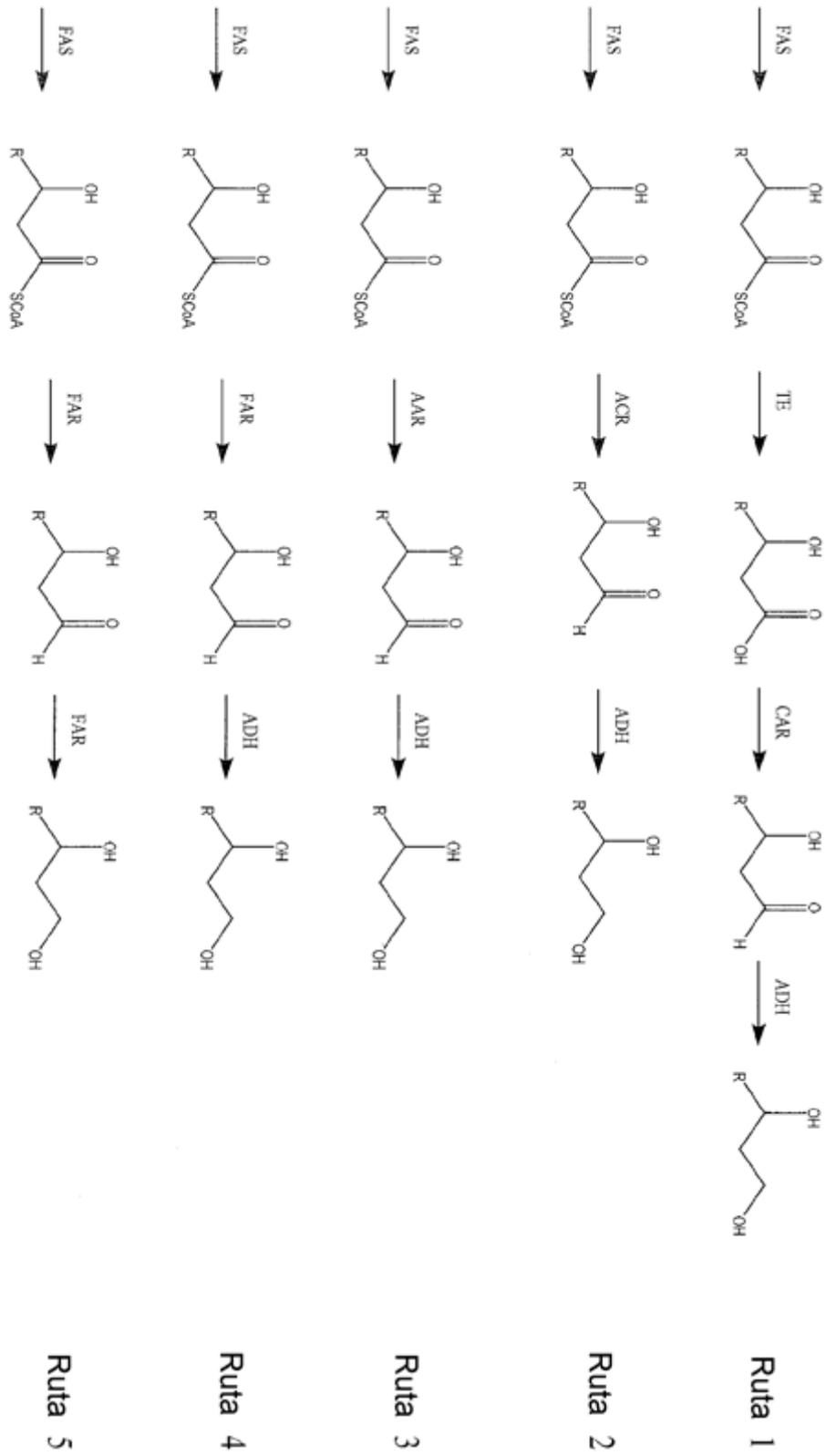


FIGURA 9

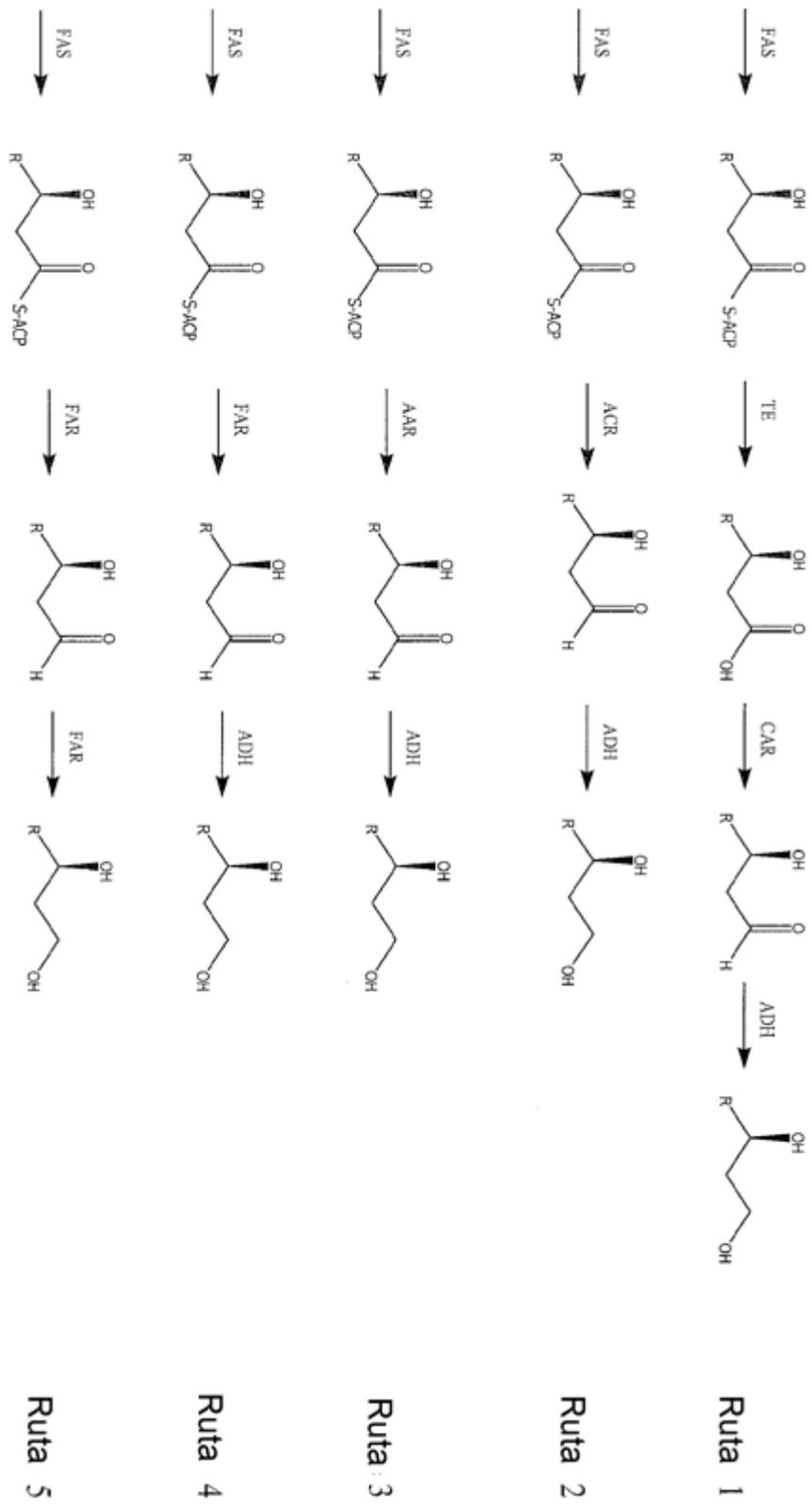


FIGURA 10

ES 2 700 578 T3

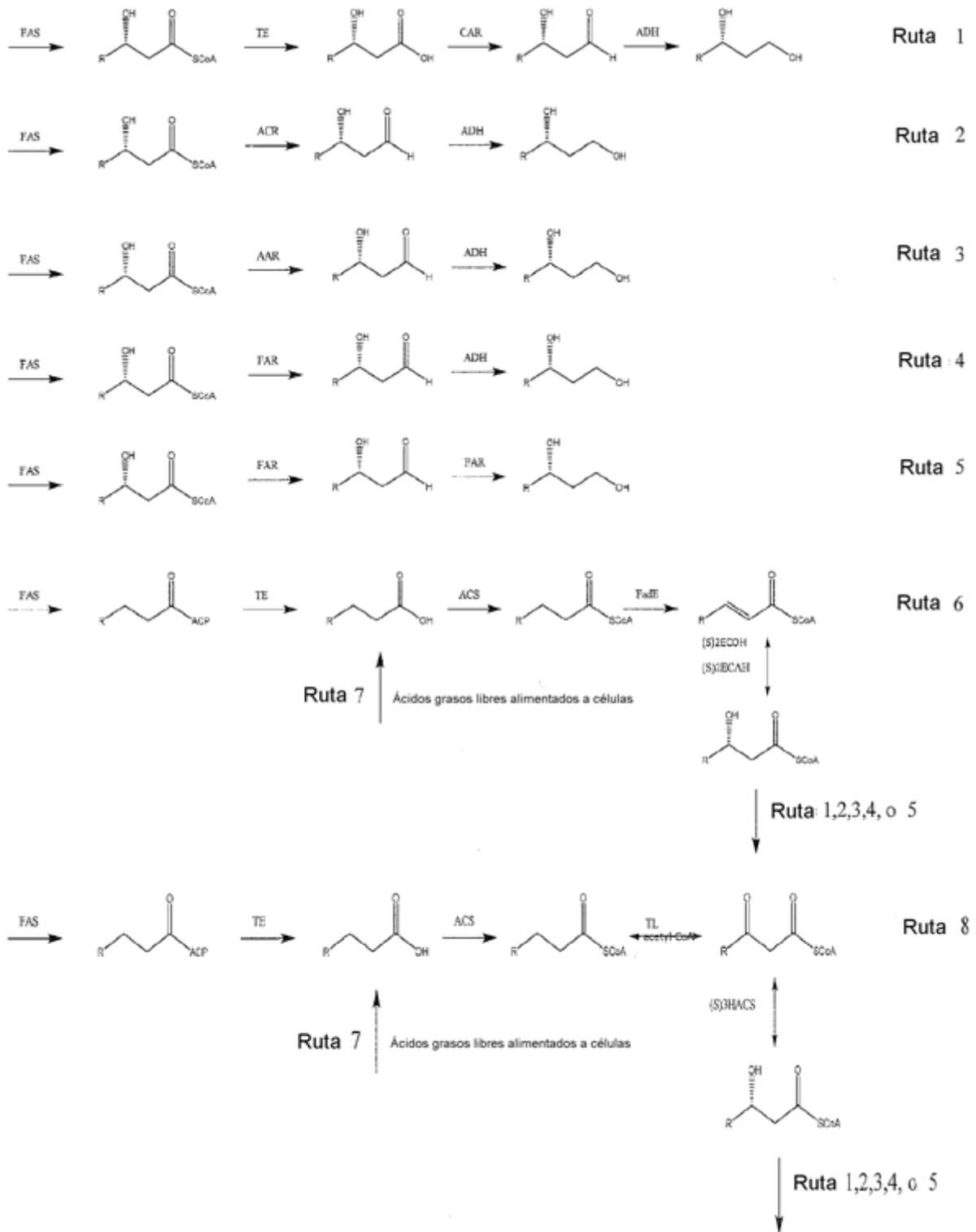


FIGURA 11