

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 774**

51 Int. Cl.:

C12P 13/00 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/06 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2014 PCT/US2014/068950**
87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2015 WO15085271**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2014 E 14827593 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3077526**

54 Título: **Producción microbiana de aminas grasas**

30 Prioridad:

05.12.2013 US 201361912184 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DEL CARDAYRE, STEPHEN B. y
HOM, LOUIS G.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 772 774 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 aminas grasas

5 **Campo**

La divulgación se refiere a microorganismos recombinantes para la producción de aminas grasas y derivados de las mismas. Se contemplan además células hospedadoras recombinantes que expresan proteínas biosintéticas que convierten los aldehídos grasos en aminas grasas *in vivo*. Se incluyen además métodos de producción de aminas grasas mediante el empleo de las células hospedadoras que expresan estas proteínas biosintéticas.

Antecedentes

Las aminas grasas son derivados de nitrógeno de ácidos grasos, olefinas o alcoholes. Están hechas de grasas y aceites naturales, o de materias primas sintéticas o petroquímicas. En la actualidad, estos compuestos se producen principalmente a través de la modificación química de triglicéridos tales como el sebo o los aceites vegetales (por ejemplo, aceite de coco y de colza).

Las aminas grasas disponibles en el mercado están hechas de una mezcla de cadenas de carbono o una longitud de cadena específica que varía de C₈ a C₂₂. En general, se clasifican en aminas primarias, secundarias y terciarias, dependiendo del número de átomos de hidrógeno de una molécula de amoníaco reemplazados por grupos grasos de alquilo o metilo. Se sabe que las aminas grasas son compuestos catiónicos tensioactivos que se adhieren fuertemente a las superficies a través de enlaces físicos o químicos. Muchos productos comerciales se preparan usando aminas grasas como productos intermedios reactivos. Por ejemplo, son útiles como tensioactivos y como componentes de productos de cuidado personal tales como champús y acondicionadores. El mayor mercado para las aminas grasas es en suavizantes y detergentes. Las aminas grasas también se usan como agentes espumantes y humectantes, agente antiestático en la industria textil y de los plásticos, lubricantes, espesantes de pintura, productos químicos de yacimientos petrolíferos, emulsionantes asfálticos, aditivos de petróleo, inhibidores de la corrosión, aditivos de gasolina y aceite combustible, agentes de flotación, agentes humectantes de pigmentos, agentes de curado epoxi, herbicidas y otros (véase Visek K. (2003) "Fatty Amines"; Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology). El documento WO 2011/047101 A1 desvela microorganismos (*E. coli*) que expresan un gen exógeno que codifica una putrescina transaminasa, pero no se refiere a la producción *in vivo* de aminas grasas por los microorganismos. El documento WO 201 0/075483 A2 desvela células hospedadoras que comprenden una tioesterasa exógena y al menos dos genes exógenos que codifican enzimas derivadas de ácidos grasos.

La producción de aminas grasas mediante fermentación microbiana proporciona una serie de ventajas, tales como proporcionar una composición más uniforme, fabricar a un menor coste y reducir el impacto ambiental. Además, proporcionaría nuevas diversas materias primas que están más allá de las grasas y de los aceites naturales y de las materias primas sintéticas o petroquímicas usadas hoy en día. Actualmente, no existe un método eficaz para la producción microbiana de aminas grasas. La divulgación aborda esta necesidad.

Resumen

La presente invención proporciona las siguientes realizaciones definidas en los artículos 1-14, a continuación:

- 45 1. Una célula bacteriana recombinante para la producción de una amina grasa, que comprende:
 - (i) uno o más genes expresados que codifican una enzima biosintética exógena que tiene actividad tioesterasa;
 - 50 (ii) uno o más genes expresados que codifican una enzima biosintética exógena que tiene actividad ácido carboxílico reductasa; e
 - (iii) uno o más genes expresados que codifican una enzima biosintética exógena que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa, en donde dicha célula bacteriana recombinante produce la amina grasa *in vivo*,
 - 55

en donde dicha enzima biosintética exógena que tiene actividad aminotransferasa es una putrescina o GABA aminotransferasa.

- 60 2. La célula bacteriana recombinante del artículo 1, en donde dicha enzima biosintética exógena que tiene actividad tioesterasa convierte una acil-ACP o acil-CoA en un ácido graso.
3. La célula bacteriana recombinante del artículo 2, en donde dicha enzima biosintética exógena que tiene actividad ácido carboxílico reductasa convierte dicho ácido graso en un aldehído graso.
4. La célula bacteriana recombinante del artículo 3, en donde dicha enzima biosintética exógena que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa convierte dicho aldehído graso en una amina grasa.
- 65 5. La célula bacteriana recombinante de uno cualquiera de los artículos 1-4, en donde dicha enzima biosintética exógena que tiene actividad tioesterasa está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen

tesA.

6. La célula bacteriana recombinante de uno cualquiera de los artículos 1-4, en donde dicha enzima biosintética exógena que tiene actividad ácido carboxílico reductasa está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *carB*.

7. La célula bacteriana recombinante del artículo 1, en donde la putrescina aminotransferasa es YgjG, preferentemente, en donde dicha YgjG está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *yjgG*.

8. La célula bacteriana recombinante del artículo 1, en donde la GABA aminotransferasa es *PuuE*, preferentemente, en donde dicha *PuuE* está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *puuE*.

9. La célula bacteriana recombinante de uno cualquiera de los artículos 1-4, en donde dicha enzima biosintética exógena que tiene actividad amina deshidrogenasa es una metilamina deshidrogenasa, preferentemente, en donde dicha metilamina deshidrogenasa es de *Paracoccus denitrificans*.

10. La célula bacteriana recombinante de uno cualquiera de los artículos 1-9, en donde dicha célula bacteriana recombinante se selecciona del grupo que consiste en *Escherichia*, *Bacillus*, *Cyanophyta*, *Lactobacillus*, *Zymomonas*, *Rhodococcus* y *Pseudomonas*, preferentemente, en donde dicha *Escherichia* es *Escherichia coli*.

11. La célula bacteriana recombinante del artículo 10, en donde dicha *Cyanophyta* se selecciona del grupo que consiste en: (a) *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Cyanothece* y *Nostoc punctiforme*; o (b) *Synechococcus elongatus* PCC7942, *Synechocystis sp.* PCC6803 y *Synechococcus sp.* PCC7001.

12. Un cultivo celular que comprende la célula bacteriana recombinante de uno cualquiera de los artículos 1-11.

13. Un método de producción de una amina grasa, que comprende cultivar la célula bacteriana de uno cualquiera de los artículos 1-11 en un caldo de fermentación que contiene una fuente de carbono.

14. El método del artículo 13, que comprende además recoger aminas grasas que se acumulan en el caldo de fermentación.

A continuación, la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Un aspecto de la divulgación proporciona un microorganismo recombinante para la producción de una amina grasa, incluyendo una vía metabólica diseñada para convertir un aldehído graso en una amina grasa. En el presente documento, el microorganismo recombinante tiene una vía metabólica diseñada para convertir un aldehído graso en una amina grasa que incluye una enzima biosintética exógena que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa. En una realización, la enzima biosintética exógena es una putrescina aminotransferasa tal como YgjG. En otra realización, la enzima biosintética exógena es una GABA aminotransferasa tal como *PuuE*. YgjG está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *yjgG* que se expresa en el microorganismo recombinante o la célula microbiana recombinante. De manera similar, *PuuE* está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *puuE* que se expresa en el microorganismo recombinante o la célula microbiana recombinante. En otra realización, la enzima biosintética exógena es una amina deshidrogenasa tal como una metilamina deshidrogenasa de *Paracoccus denitrificans*. El microorganismo recombinante o la célula microbiana recombinante produce la amina grasa *in vivo* o dentro de la célula. La amina grasa es liberada en un medio de cultivo por el microorganismo recombinante o la célula microbiana recombinante. En una realización, el microorganismo recombinante o la célula microbiana es una célula bacteriana recombinante.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un microorganismo recombinante para la producción de una amina grasa, incluyendo una primera vía metabólica diseñada para convertir un aldehído graso en una amina grasa. El microorganismo recombinante tiene una primera vía metabólica diseñada para convertir un aldehído graso en una amina grasa que incluye una enzima biosintética exógena que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa (anteriormente citado). En una realización, el microorganismo recombinante tiene otra o segunda vía metabólica diseñada para convertir una acil-ACP o una acil-CoA en un ácido graso. La segunda vía metabólica diseñada es opcional. En el presente documento, la acil-ACP o acil-CoA es convertida en un ácido graso por una enzima biosintética que tiene actividad tioesterasa. En una realización, la enzima biosintética que tiene actividad tioesterasa está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *tesA* que se expresa en el microorganismo recombinante o en la célula microbiana. El microorganismo recombinante o la célula microbiana recombinante produce la amina grasa *in vivo* o dentro de la célula. La amina grasa es liberada en un medio de cultivo por el microorganismo recombinante o la célula microbiana recombinante. En una realización, el microorganismo recombinante o la célula microbiana es una célula bacteriana recombinante.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un microorganismo recombinante para la producción de una amina grasa, incluyendo una primera vía metabólica diseñada para convertir un aldehído graso en una amina grasa. El microorganismo recombinante tiene una primera vía metabólica diseñada para convertir un aldehído graso en una amina grasa que incluye una enzima biosintética exógena que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa (anteriormente citado). En una realización, el microorganismo recombinante tiene otra o segunda vía metabólica diseñada para convertir una acil-ACP o una acil-CoA en un ácido graso (anteriormente citado). En otra realización, el microorganismo recombinante tiene otra o tercera vía metabólica diseñada para convertir un ácido graso en un aldehído graso. Esta tercera vía metabólica diseñada es opcional e independiente de la segunda vía metabólica diseñada. En el presente documento, el ácido graso es convertido en un aldehído graso por una enzima biosintética que tiene actividad ácido carboxílico reductasa (CAR). En una realización, la enzima biosintética que tiene actividad

CAR está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *carB* que se expresa en el microorganismo recombinante o en la célula microbiana. El microorganismo recombinante o la célula microbiana recombinante produce la amina grasa *in vivo* o dentro de la célula. La amina grasa es liberada en un medio de cultivo por el microorganismo recombinante o la célula microbiana recombinante. En una realización, el microorganismo recombinante o la célula microbiana es una célula bacteriana recombinante.

Otro aspecto de la divulgación proporciona una célula bacteriana recombinante para la producción de una amina grasa, que incluye uno o más genes expresados que codifican una enzima biosintética exógena que tiene actividad tioesterasa; uno o más genes expresados que codifican una enzima biosintética exógena que tiene actividad ácido carboxílico reductasa; y uno o más genes expresados que codifican una enzima biosintética exógena que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa, en donde la célula bacteriana recombinante produce una amina grasa *in vivo* o dentro de la célula bacteriana. La amina grasa es liberada en un medio de cultivo por la célula bacteriana recombinante. En el presente documento, la enzima biosintética exógena que tiene actividad tioesterasa convierte una acil-ACP o acil-CoA en un ácido graso. La enzima biosintética exógena que tiene actividad ácido carboxílico reductasa (CAR) convierte ese ácido graso en un aldehído graso. La enzima biosintética exógena que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa convierte ese aldehído graso en una amina grasa. En una realización, la enzima biosintética exógena que tiene actividad tioesterasa está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *tesA*. En otra realización, la enzima biosintética exógena que tiene actividad CAR está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *carB*. En otra realización más, la enzima biosintética exógena que tiene actividad aminotransferasa es una putrescina aminotransferasa tal como YgjG o una GABA aminotransferasa tal como PuuE. YgjG está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *ygjG*. PuuE está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *puuE*. En otra realización más, la enzima biosintética exógena que tiene actividad amina deshidrogenasa es una metilamina deshidrogenasa tal como una metilamina deshidrogenasa de *Paracoccus denitrificans*.

Otro aspecto de la divulgación proporciona una célula bacteriana recombinante para la producción de una amina grasa, incluyendo uno o más genes expresados que codifican una enzima biosintética exógena que tiene actividad tioesterasa para convertir una acil-ACP o una acil-CoA en un ácido graso; uno o más genes expresados que codifican una enzima biosintética exógena que tiene actividad ácido carboxílico reductasa (CAR) para convertir el ácido graso en un aldehído graso; y uno o más genes expresados que codifican una enzima biosintética exógena que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa para convertir el aldehído graso en una amina grasa, en donde la célula bacteriana recombinante produce la amina grasa *in vivo* o dentro de la célula. En una realización, la enzima biosintética exógena que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa es una putrescina aminotransferasa tal como YgjG. En otra realización, la enzima biosintética exógena que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa es una GABA aminotransferasa tal como PuuE. YgjG está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *ygjG* que se expresa en la célula bacteriana recombinante. De manera similar, PuuE está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *puuE* que se expresa en la célula bacteriana recombinante. En otra realización, la enzima biosintética exógena que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa es una amina deshidrogenasa tal como la ametilamina deshidrogenasa de *Paracoccus denitrificans*. En una realización, la enzima biosintética exógena que tiene actividad tioesterasa está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *tesA*. En otra realización, la enzima biosintética exógena que tiene actividad CAR está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *carB*. La célula bacteriana recombinante produce la amina grasa *in vivo* o dentro de la célula. La amina grasa es liberada en un medio de cultivo por la célula bacteriana recombinante.

La divulgación contempla además una célula bacteriana recombinante para la producción de una amina grasa, incluyendo una primera vía diseñada para convertir una acil-ACP o acil-CoA en un ácido graso; una segunda vía metabólica diseñada para convertir el ácido graso en un aldehído graso; y una tercera vía metabólica diseñada para convertir el aldehído graso en una amina grasa, en donde la célula bacteriana recombinante produce la amina grasa *in vivo* o dentro de la célula. En una realización, la acil-ACP o acil-CoA es convertida en un ácido graso por una enzima biosintética expresada exógenamente que tiene actividad tioesterasa; el ácido graso es convertido en un aldehído graso por una enzima biosintética expresada exógenamente que tiene actividad ácido carboxílico reductasa (CAR); y el aldehído graso es convertido en una amina grasa por una enzima biosintética expresada exógenamente que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa. En una realización, la enzima biosintética exógena que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa es una putrescina aminotransferasa tal como YgjG. En otra realización, la enzima biosintética exógena que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa es una GABA aminotransferasa tal como PuuE. YgjG está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *ygjG* que se expresa en la célula bacteriana recombinante. De manera similar, PuuE está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *puuE* que se expresa en la célula bacteriana recombinante. En otra realización, la enzima biosintética exógena que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa es una amina deshidrogenasa tal como una metilamina deshidrogenasa de *Paracoccus denitrificans*. En una realización, la enzima biosintética exógena que tiene actividad tioesterasa está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *tesA*. En otra realización, la enzima biosintética exógena que tiene actividad CAR está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *carB*. La célula bacteriana recombinante produce la amina grasa *in vivo* o dentro de la célula. La amina grasa es liberada en un medio de cultivo por la célula bacteriana recombinante.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un microorganismo recombinante para la producción de una amina grasa, incluyendo, pero sin limitación, *Escherichia*, *Bacillus*, *Cyanophyta*, *Lactobacillus*, *Zymomonas*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Chrysosporium*, *Saccharomyces*, *Stenotrophomonas*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia* y *Streptomyces*. En una realización, *Escherichia* es *Escherichia coli*. En otra realización, *Cyanophyta* incluye, pero sin limitación, *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Cyanothece* y *Nostoc punctiforme*. En otra realización más, *Cyanophyta* incluye, pero sin limitación, *Synechococcus elongatus* PCC7942, *Synechocystis* sp. PCC6803 y *Synechococcus* sp. PCC7001.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un método de producción de una amina grasa, que comprende cultivar un microorganismo recombinante en un caldo de fermentación que contiene una fuente de carbono. El microorganismo abarca al menos una vía metabólica diseñada para producir una amina grasa *in vivo* (anteriormente citado). Otro aspecto de la divulgación proporciona un método de producción de una amina grasa en una célula bacteriana recombinante, que incluye cultivar una célula que expresa una vía metabólica diseñada para producir una amina grasa (anteriormente citado) en un caldo de fermentación en presencia de una fuente de carbono; y recoger las aminas grasas que se acumulan en el caldo de fermentación.

La divulgación abarca además un cultivo celular que incluye una célula microbiana recombinante para la producción de aminas (anteriormente citado). En una realización, el cultivo celular abarca una célula bacteriana recombinante para la producción de aminas. En otra realización, La célula microbiana recombinante es una célula bacteriana recombinante.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un microorganismo recombinante que tiene una vía metabólica diseñada para la producción de aldehído graso y una enzima biosintética que convierte un aldehído graso en una amina grasa, en donde la enzima biosintética tiene actividad aminotransferasa/transaminasa o amina deshidrogenasa. En una realización, la enzima biosintética es una putrescina aminotransferasa o una GABA aminotransferasa. En otra realización, la enzima biosintética es una amina deshidrogenasa o una amina oxidasa.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un microorganismo recombinante que tiene una vía metabólica diseñada para la producción de aldehído graso y una vía metabólica diseñada para la producción de amina grasa que incluye una enzima biosintética que convierte un aldehído graso en una amina grasa, en donde el microorganismo recombinante es una célula microbiana. En un aspecto, la célula microbiana es una célula recombinante. La célula microbiana incluye, pero sin limitación, *Escherichia*, *Bacillus*, *Cyanophyta*, *Lactobacillus*, *Zymomonas*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Chrysosporium*, *Saccharomyces*, *Stenotrophomonas*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia* y *Streptomyces*. En una realización, *Escherichia* es *Escherichia coli*. En otra realización, *Cyanophyta* incluye, pero sin limitación, *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Cyanothece* y *Nostoc punctiforme*. En otra realización particular, *Cyanophyta* es *Synechococcus elongatus* PCC7942, *Synechocystis* sp. PCC6803 o *Synechococcus* sp. PCC7001.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un microorganismo recombinante que tiene una vía metabólica diseñada para la producción de aldehído graso y una vía metabólica diseñada para la producción de amina grasa. En una realización, la vía metabólica diseñada para la producción de aldehído graso incluye una tioesterasa y/o una ácido carboxílico reductasa (CAR) que convierte un ácido graso en un aldehído graso, mientras que la vía metabólica diseñada para la producción de amina grasa incluye una aminotransferasa/transaminasa o una amina deshidrogenasa que convierte un aldehído graso en una amina grasa. En algunas realizaciones, la tioesterasa está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *tesA* con o sin secuencia líder, mientras que la ácido carboxílico reductasa (CAR) está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *carB*, siendo ambas expresadas en el microorganismo. En una realización, la aminotransferasa/transaminasa es una putrescina aminotransferasa o una GABA aminotransferasa. En una realización, la putrescina aminotransferasa es YgjG, que está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *yjgG* que se expresa en el microorganismo. En otra realización, la GABA aminotransferasa es PuuE, que está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *puuE* que se expresa en el microorganismo. En otra realización más, la amina deshidrogenasa es una metilamina deshidrogenasa de *Paracoccus denitrificans*. En una realización, la amina grasa es liberada en el sobrenadante o medio de cultivo por el microorganismo. En otra realización, la amina grasa se recoge del interior del microorganismo donde se puede extraer durante o después de un procedimiento de fermentación.

La divulgación contempla además un método de producción de una amina grasa, que incluye cultivar un microorganismo recombinante en un caldo de fermentación que contiene una fuente de carbono, en donde el microorganismo recombinante contiene una vía metabólica diseñada para la producción de aldehído graso y una enzima biosintética que convierte un aldehído graso en una amina grasa, en donde la enzima biosintética tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa, y en donde el microorganismo produce una amina grasa *in vivo*.

La divulgación abarca además una célula microbiana recombinante que incluye la expresión de una o más enzimas que tienen actividad tioesterasa y ácido carboxílico reductasa (CAR); y la expresión de una enzima que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa, en donde la célula microbiana produce aminas grasas. En una realización,

la enzima biosintética es una putrescina aminotransferasa tal como YgjG o una GABA aminotransferasa tal como PuvE. En otra realización, la enzima biosintética es una amina deshidrogenasa tal como una metilamina deshidrogenasa de *Paracoccus denitrificans*. En otra realización más, la enzima biosintética es una amina oxidasa.

- 5 Aun así, otro aspecto de la divulgación proporciona un método de producción de una amina grasa en un microorganismo recombinante. El método incluye cultivar una célula microbiana (anteriormente citado) en un medio de fermentación en presencia de una fuente de carbono; y recoger las aminas grasas que se acumulan en el sobrenadante o medio de fermentación. La célula microbiana recombinante expresa una vía metabólica diseñada para la producción de aldehído graso y una enzima biosintética que convierte un aldehído graso en una amina grasa, en donde la enzima biosintética tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa.
- 10 donde la enzima biosintética tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa. En otro aspecto, la célula microbiana recombinante expresa una vía metabólica diseñada para la producción de aldehído graso y una vía metabólica diseñada para la producción de amina que incluye una enzima biosintética que convierte un aldehído graso en una amina grasa, en donde la enzima biosintética tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa.
- 15 Otro aspecto de la divulgación proporciona una amina grasa derivada de una fuente de carbono que no es una materia prima petroquímica. Por ejemplo, la divulgación proporciona aminas grasas derivadas de materias primas renovables, tales como CO₂, CO, glucosa, sacarosa, xilosa, arabinosa, glicerol, manosa, o mezclas de los mismos. Otras materias primas proporcionadas en el presente documento a partir de las que se pueden derivar aminas grasas incluyen almidones, biomasa celulósica, melazas y otras fuentes de carbohidratos, incluyendo las mezclas de carbohidratos
- 20 derivadas de la hidrólisis de la biomasa celulósica, o los materiales de desecho derivados del procesamiento de aceites vegetales o naturales.

Breve descripción de las figuras

- 25 La presente divulgación se entiende mejor cuando se lee junto con las figuras adjuntas, que sirven para ilustrar las realizaciones preferidas. Se entiende que, sin embargo, la divulgación no se limita a las realizaciones específicas desveladas en las figuras.

30 La **Figura 1** es una cromatografía de MS/GC de extractos de células microbianas que muestra un máximo único de amina grasa (véase el grupo central a los 7,61 minutos, marcado con una flecha) producido mediante la expresión de una tioesterasa, una ácido carboxílico reductasa y una aminotransferasa/transaminasa (fila central). La fila superior es el control negativo de F16; la fila central es la muestra de F16-YG; y la fila inferior es el control negativo de YG. Los máximos adicionales de las filas superior y central son alcoholes grasos.

35 La **Figura 2** muestra otra cromatografía de MS/GC que muestra el perfil de elución de la muestra de F16-YG (fila superior) en comparación con el patrón de referencia de 1-dodecilamina (fila inferior). Los máximos adicionales de las filas superior y central son alcoholes grasos.

40 La **Figura 3** muestra el patrón de fragmentación iónica del máximo de 7,6 minutos de la muestra de F16-YG (fila superior) y el patrón de referencia de 1-dodecilamina (fila inferior). También se muestra en la fila superior la estructura molecular de los fragmentos iónicos característicos de 1-dodecilamina, incluyendo C₁₁H₂₄N, C₁₀H₂₂N, C₉H₂₀N.

Descripción detallada

45 Visión general

La divulgación se refiere a la producción microbiana de aminas grasas, que representan una nueva clase de productos químicos renovables. Las aminas grasas se producen a través de un microorganismo que expresa una vía metabólica diseñada para convertir los aldehídos grasos en aminas grasas. Como tales, el microorganismo expresa al menos una enzima biosintética exógena para producir aminas grasas *in vivo*. La enzima biosintética exógena puede tener actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa; o actividad ácido carboxílico reductasa (CAR); o actividad tioesterasa o una combinación de las mismas. También se abarcan en el presente documento formas alternativas de la actividad enzimática.

55 Definiciones

Como se usan en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen los referentes en plural salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por consiguiente, por ejemplo, la referencia a "una célula hospedadora" incluye dos o más de dichas células hospedadoras, la referencia a "una amina grasa" incluye una o más aminas grasas, o mezclas de aminas, la referencia a "una secuencia de ácido nucleico" incluye una o más secuencias de ácido nucleico, la referencia a "una enzima" incluye una o más enzimas, y similares.

65 La expresión "vía metabólica diseñada" se refiere a una o más reacciones químicas optimizadas o diseñadas mediante ingeniería genética catalizadas por al menos una enzima biosintética expresada en una célula para producir (o

aumentar la producción de) una determinada sustancia (es decir, un precursor, un producto intermedio o un producto final) dentro de esa célula. En una realización, la enzima biosintética es una enzima biosintética exógena. En otra realización, la vía metabólica diseñada permite la producción de células de un producto final deseado. En otra realización, la vía metabólica diseñada permite la producción de células de un precursor deseado. En otra realización, la vía metabólica diseñada permite la producción de células de un producto intermedio deseado.

El término "*in vivo*" se refiere a "dentro de la célula" cuando se usa en el contexto de la producción de un producto específico. Por ejemplo, la producción de aminas grasas *in vivo* significa la producción de aminas grasas dentro de la célula.

Los números de registro de secuencias a los que se hace referencia en el presente documento se obtuvieron de las bases de datos proporcionadas por el NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) mantenido por los Institutos Nacionales de Salud, EE.UU. (que se identifican en el presente documento como "Números de registro del NCBI" o, como alternativa, como "Números de registro del GenBank"), y de la base de conocimiento UniProt (UniProtKB) y las bases de datos Swiss-Prot proporcionadas por el Instituto Suizo de Bioinformática (que se identifican en el presente documento como "Números de registro del UniProtKB").

Los números de clasificación enzimática (CE) son establecidos por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), cuya descripción se encuentra disponible en el sitio web de la Nomenclatura de enzimas IUBMB en la World Wide Web. Los números CE clasifican las enzimas de acuerdo con las reacciones catalizadas por enzimas. Por ejemplo, si diferentes enzimas (por ejemplo, de diferentes organismos) catalizan la misma reacción, entonces se clasifican bajo el mismo número CE. Además, a través de la evolución convergente, diferentes pliegues de proteínas pueden catalizar reacciones idénticas y, por lo tanto, reciben números CE idénticos (véase Omelchenko *et al.* (2010) *Biol. Direct* 5:31). Las proteínas que no están relacionadas evolutivamente y que pueden catalizar las mismas reacciones bioquímicas a veces se denominan enzimas análogas (es decir, a diferencia de las enzimas homólogas). Los números CE difieren de, por ejemplo, los identificadores UniProt, que especifican una proteína por su secuencia de aminoácidos.

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 naturales (guanina, (G), adenina, (A), citosina, (C), timina, (T) y uracilo (U)) normalmente se derivan de purina o pirimidina, aunque debe entenderse que también se incluyen análogos de bases naturales y no naturales. El azúcar natural es la pentosa (azúcar de cinco átomos de carbono) desoxirribosa (que forma el ADN) o ribosa (que forma el ARN), aunque debe entenderse que también se incluyen análogos de azúcares naturales y no naturales. Los ácidos nucleicos normalmente están unidos mediante enlaces fosfato para formar ácidos nucleicos o polinucleótidos, aunque se conocen muchos otros enlaces en la técnica (por ejemplo, fosforotioatos, boranofosfatos y similares).

El término "polinucleótido" se refiere a un polímero de ribonucleótidos (ARN) o desoxirribonucleótidos (ADN), que puede ser monocatenario o bicatenario y que puede contener nucleótidos no naturales o modificados. Los términos "polinucleótido", "secuencia de ácido nucleico", y "secuencia de nucleótidos" se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud. Estos términos se refieren a la estructura primaria de la molécula y, por lo tanto, incluyen ADN bicatenario y monocatenario, y ARN bicatenario y monocatenario. Los términos incluyen, como equivalentes, análogos de ARN o ADN hechos de análogos de nucleótidos y polinucleótidos modificados tales como, pero sin limitación, polinucleótidos metilados y/o protegidos terminalmente. El polinucleótido puede estar en cualquier forma, incluyendo, pero sin limitación, de plásmido, vírica, cromosómica, EST, ADNc, ARNm y ARNr.

Como se usa en el presente documento, los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. La expresión "polipéptido recombinante" se refiere a un polipéptido que se produce mediante técnicas recombinantes, en donde, en general, se introduce el ADNc o ARN que codifica la proteína expresada en un vector de expresión adecuado que, a su vez, se usa para transformar una célula hospedadora para producir el polipéptido. De manera similar, las expresiones "polinucleótido recombinante" o "ácido nucleico recombinante" o "ADN recombinante" se producen mediante técnicas recombinantes que son conocidas por los expertos en la materia.

Como se usa en el presente documento, el término "homólogo" se refiere a un polinucleótido o un polipéptido que comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 50 por ciento (%) idéntica a la secuencia polinucleotídica o polipeptídica correspondiente. Preferentemente, los polinucleótidos o polipéptidos homólogos tienen secuencias de polinucleótidos o secuencias de aminoácidos que tienen al menos aproximadamente un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de homología con la secuencia de aminoácidos o la secuencia polinucleotídica correspondientes. Como se usan en el presente documento, los términos secuencia "homología" e "identidad de secuencia" se usan indistintamente.

Un experto en la materia conoce los métodos de determinación de la homología entre dos o más secuencias. En resumen, los cálculos de "homología" entre dos secuencias se pueden realizar de la siguiente manera. Se alinean las

secuencias con fines comparativos óptimos (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para un alineamiento óptimo, y las secuencias no homólogas se pueden descartar para fines comparativos). En una realización preferida, la longitud de una primera secuencia que se alinea con fines comparativos es al menos aproximadamente un 30 %, preferentemente, al menos aproximadamente un 40 %, más preferentemente, en al menos aproximadamente un 50 %, incluso más preferentemente, al menos aproximadamente un 60 %, e incluso más preferentemente, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente un 98 % o aproximadamente un 100 % de la longitud de una segunda secuencia. Luego se comparan los restos de aminoácidos o nucleótidos de las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes de la primera y segunda secuencias. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto 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 una 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 un alineamiento óptimo de las dos secuencias. Puede realizarse la comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias 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 se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch, que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de separación de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 (Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-453). El porcentaje de homología entre dos secuencias de nucleótidos también se puede determinar usando el programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de separación de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Un experto en la materia puede realizar cálculos iniciales de homología y ajustar los parámetros del algoritmo en consecuencia. Un conjunto preferido de parámetros (y el que debería usarse si un profesional no estuviera seguro acerca de qué parámetros deben aplicarse para determinar si una molécula está dentro de una limitación de homología de las reivindicaciones) es una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización por hueco extendido de 4 y una penalización por hueco de desplazamiento de fase de 5. Se conocen métodos adicionales de alineamiento de secuencias en las técnicas biotecnológicas (véase, por ejemplo, Rosenberg (2005) *BMC Bioinformatics* 6:278; Altschul *et al.* (2005) *FEBS J.* 272(20):5101-5109).

La expresión "se hibrida en condiciones de baja rigurosidad, rigurosidad media, alta rigurosidad o muy alta rigurosidad" describe condiciones de hibridación y lavado. Se puede encontrar orientación para realizar reacciones de hibridación en textos biotecnológicos (véase, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1 - 6.3.6, donde se describen en detalle métodos acuosos y no acuosos, y se puede usar cualquier método). Por ejemplo, las condiciones específicas de hibridación son las siguientes: (1) condiciones de hibridación de baja rigurosidad: 6x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de dos lavados en 0,2x SSC, SDS al 0,1 % al menos a 50 °C (la temperatura de los lavados se puede aumentar hasta 55 °C para condiciones de baja rigurosidad); (2) condiciones de hibridación de rigurosidad media: 6x SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2x SSC, SDS al 0,1 % a 60 °C; (3) condiciones de hibridación de alta rigurosidad: 6x SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2x SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C; y (4) condiciones de hibridación de muy alta rigurosidad: fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7 % a 65 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2x SSC, SDS al 1 % a 65 °C. Las condiciones de rigurosidad muy alta (4), en general, son las condiciones preferidas a menos que se especifique lo contrario.

El término "endógeno" significa "que se origina dentro de". Como tales, un polipéptido "endógeno" se refiere a un polipéptido que está codificada por el genoma nativo de la célula hospedadora. Por ejemplo, un polipéptido endógeno puede referirse a un polipéptido que está codificado por el genoma de la célula microbiana parental (por ejemplo, la célula hospedadora parental) a partir de la que la célula recombinante se diseña (o se deriva).

El término "exógeno" significa "que se origina en el exterior". Como tales, un polipéptido "exógeno" se refiere a un polipéptido que no está codificado por el genoma nativo de la célula. Un polipéptido exógeno y/o polinucleótido exógeno puede transferirse a la célula y puede clonarse o derivarse de un tipo o de una especie de célula diferente; o puede clonarse o derivarse del mismo tipo de célula o especie. Por ejemplo, una "enzima biosintética exógena" es un ejemplo de un polipéptido exógeno, en donde el polipéptido codifica una enzima que tiene una determinada actividad enzimática. En otro ejemplo, una variante de polipéptido (es decir, mutante o modificado) es un ejemplo de un polipéptido exógeno. De manera similar, una molécula de ácido nucleico no natural se considera exógena a una célula una vez introducida en la célula. El término "exógeno" también puede usarse con referencia a un polinucleótido, polipéptido o proteína que está presente en una célula hospedadora recombinante en un estado no nativo. Por ejemplo, una secuencia polinucleotídica, polipeptídica o proteica "exógena" puede modificarse en relación con la secuencia de tipo silvestre presente de manera natural en la correspondiente célula hospedadora de tipo silvestre, por ejemplo, una modificación en el nivel de expresión o en la secuencia de un polinucleótido, polipéptido o proteína. En esa misma línea, una molécula de ácido nucleico que se produce de manera natural también puede ser exógena a una célula en particular. Por ejemplo, una secuencia de codificación completa aislada de la célula X es un ácido nucleico exógeno con respecto a la célula Y una vez que esa secuencia de codificación se introduce en la célula Y, incluso si X e Y son el mismo tipo de célula.

El término "sobreexpresado" significa que se hace que un gen se transcriba a una tasa elevada en comparación con la tasa de transcripción endógena para ese gen. En algunos ejemplos, la sobreexpresión incluye además una tasa elevada de traducción de la proteína correspondiente en comparación con la tasa de traducción endógena para esa proteína. En algunas realizaciones, el término "sobreexpresar" significa expresar un polinucleótido o polipéptido en una célula a una concentración mayor que la expresada normalmente en una célula de tipo silvestre correspondiente en las mismas condiciones. En la técnica, se conocen bien métodos de ensayo para la sobreexpresión, por ejemplo, los niveles de ARN transcrito pueden evaluarse usando rtPCR y los niveles de proteína pueden evaluarse usando análisis en gel de SDS page.

El término "heterólogo" significa "derivado de un organismo diferente, de diferente tipo de célula y/o diferentes especies". Como se usa en el presente documento, el término "heterólogo" normalmente se asocia con un polinucleótido o un polipéptido o una proteína, y se refiere a un polinucleótido, un polipéptido o una proteína que no está presente de manera natural en un organismo, un tipo de célula o una especie dados. Por ejemplo, se puede introducir una secuencia polinucleotídica de una planta en una célula hospedadora microbiana mediante métodos recombinantes, de manera que el polinucleótido de la planta es heterólogo a esa célula hospedadora microbiana recombinante. De manera similar, se puede introducir una secuencia polinucleotídica de cianobacteria en una célula hospedadora microbiana del género *Escherichia* mediante métodos recombinantes, de manera que el polinucleótido de cianobacteria es heterólogo a esa célula hospedadora microbiana recombinante. En esas líneas, una "enzima biosintética heteróloga" es un ejemplo de un polipéptido heterólogo, en donde el polipéptido codifica una enzima que tiene una determinada actividad enzimática.

Como se usa en el presente documento, el término "fragmento" de un polipéptido se refiere a una parte más corta de un polipéptido o de una proteína de longitud completa que varía en tamaño desde dos restos de aminoácidos hasta la secuencia de aminoácidos completa menos un resto de aminoácido. En ciertas realizaciones de la divulgación, un fragmento se refiere a la secuencia de aminoácidos completa de un dominio de un polipéptido o de una proteína (por ejemplo, un dominio de unión al sustrato o un dominio catalítico).

El término "mutagénesis" se refiere a un proceso mediante el que la información genética de un organismo se cambia de manera estable. La mutagénesis de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína produce una proteína mutante. La mutagénesis también se refiere a cambios en las secuencias de ácido nucleico no codificantes que producen una actividad proteica modificada.

Una "mutación", como se usa en el presente documento, se refiere a un cambio permanente en una posición de ácido nucleico de un gen o en una posición de aminoácido de un polipéptido o de una proteína. Las mutaciones incluyen sustituciones, adiciones, inserciones y/o eliminaciones. Por ejemplo, una mutación en una posición de aminoácido puede ser una sustitución de un tipo de aminoácido con otro tipo de aminoácido (por ejemplo, una serina (S) puede ser sustituida con una alanina (A); una lisina (L) puede ser sustituida con una T (treonina); etc.). Como tales, un polipéptido o una proteína puede tener una o más mutaciones en las que un aminoácido está sustituido con otro aminoácido. Por ejemplo, un polipéptido o una proteína biosintéticos pueden tener una o más mutaciones en su secuencia de aminoácidos.

La expresión "enzima biosintética" como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que tiene una actividad enzimática relacionada con la biosíntesis de derivados de ácidos grasos (por ejemplo, ácidos grasos, aldehídos grasos, alcoholes grasos, aminas grasas, ésteres grasos, etc.). Un ejemplo de una enzima biosintética como se usa en el presente documento es una enzima que puede convertir un precursor de aldehído graso en una amina grasa (por ejemplo, una enzima biosintética productora de amina grasa). Otro ejemplo de una enzima biosintética como se usa en el presente documento es una enzima que puede convertir un ácido graso en un aldehído graso (por ejemplo, una enzima biosintética productora de aldehído graso). Otro ejemplo más de una enzima biosintética como se usa en el presente documento es una enzima que puede convertir una acil-ACP o acil-CoA en un ácido graso (por ejemplo, una enzima biosintética productora de ácido graso). Cuando una célula se ha transformado con una enzima biosintética, es una célula que expresa la enzima biosintética (por ejemplo, una célula recombinante). En una realización, el título y/o el rendimiento de un compuesto relacionado con la amina grasa producido por una célula que expresa una enzima biosintética productora de amina grasa es al menos dos veces superior al de una célula de tipo silvestre correspondiente (es decir, una célula correspondiente que no expresa la enzima biosintética productora de amina grasa). En otra realización, el título y/o el rendimiento de un compuesto relacionado con amina grasa producido por una célula que expresa la enzima biosintética productora de amina grasa es al menos aproximadamente 1 vez, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, o al menos aproximadamente 10 veces superior al de una célula de tipo silvestre correspondiente. En una realización, el título y/o el rendimiento de un compuesto relacionado con amina grasa producido por una célula que expresa una enzima biosintética productora de amina grasa es al menos aproximadamente un 1 por ciento, al menos aproximadamente un 2 por ciento, al menos aproximadamente un 3 por ciento, al menos aproximadamente un 4 por ciento, al menos aproximadamente un 5 por ciento, al menos aproximadamente un 6 por ciento, al menos aproximadamente un 7 por ciento, al menos aproximadamente un 8 por ciento, al menos aproximadamente un 9 por ciento o aproximadamente un 10 por ciento

superior al de una célula de tipo silvestre correspondiente. En otra realización, el título y/o el rendimiento debido a la expresión de una enzima biosintética productora de amina grasa es de al menos aproximadamente un 20 por ciento a al menos aproximadamente un 100 por ciento superior al la de la célula de tipo silvestre. En otras realizaciones, el título y/o el rendimiento de un compuesto relacionado con amina grasa producido por una célula debido a la expresión de una enzima biosintética productora de amina grasa es al menos aproximadamente un 20 por ciento, al menos aproximadamente un 25 por ciento, al menos aproximadamente un 30 por ciento, al menos aproximadamente un 35 por ciento, al menos aproximadamente un 40 por ciento, al menos aproximadamente un 45 por ciento al menos aproximadamente un 50 por ciento, al menos aproximadamente un 55 por ciento, al menos aproximadamente un 60 por ciento, al menos aproximadamente un 65 por ciento, al menos aproximadamente un 70 por ciento, al menos aproximadamente un 75 por ciento, al menos aproximadamente un 80 por ciento, al menos aproximadamente un 85 por ciento, al menos aproximadamente un 90 por ciento, al menos aproximadamente un 95 por ciento, al menos aproximadamente un 97 por ciento, al menos aproximadamente un 98 por ciento o al menos aproximadamente un 100 por ciento superior al de la célula de tipo silvestre correspondiente.

15 Como se usa en el presente documento, el término "gen" se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican un producto de ARN o un producto proteico, así como secuencias de ácido nucleico unidas operativamente que afectan a la expresión del ARN o proteína (por ejemplo, dichas secuencias incluyen, pero sin limitación, secuencias promotoras o potenciadoras) o secuencias de ácido nucleico unidas operativamente que codifican secuencias que afectan a la expresión del ARN o proteína (por ejemplo, dichas secuencias incluyen, pero sin limitación, sitios de unión a ribosomas o secuencias de control de la traducción).

Las secuencias de control de la expresión son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores de la transcripción, sitios de entrada al ribosoma internos (IRES) y similares, que proporcionan la expresión de la secuencia polinucleotídica en una célula hospedadora. Las secuencias de control de la expresión interactúan específicamente con proteínas celulares que participan en la transcripción (Maniatis *et al.*, *Science*, 236: 1237-1245 (1987)). Se describen ejemplos de secuencias de control de la expresión en textos biotecnológicos (por ejemplo, véase Goeddel, "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology", Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)). En los métodos de la presente divulgación, una o más secuencias de control de la expresión están operativamente unidas a una o más secuencias de polinucleótidos. Por "unidas operativamente" se entiende que una secuencia polinucleotídica y una secuencia de control de la expresión están conectadas de manera que permiten la expresión génica cuando las moléculas apropiadas (por ejemplo, proteínas activadoras de la transcripción) se unen a la secuencia de control de la expresión. Los promotores unidos operativamente se encuentran en dirección 5' de la secuencia polinucleotídica seleccionada en términos de la dirección de transcripción y traducción. Los potenciadores unidos operativamente se pueden ubicar en dirección 5', dentro o en dirección 3' del polinucleótido seleccionado.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico, es decir, una secuencia polinucleotídica, al que se ha unido. Un tipo de vector útil es un episoma (es decir, un ácido nucleico capaz de realizar la replicación extracromosómica). Los vectores útiles son aquellos capaces de realizar la replicación autónoma y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos. Los vectores capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están unidos operativamente se denominan, en el presente documento, "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante se encuentran normalmente en forma de "plásmidos" que, en general, se refieren a bucles de ADN bicatenarios circulares que, en su forma vectorial, no están unidos al cromosoma. Se proporcionan otros vectores de expresión útiles en forma lineal. También se incluyen otras formas de vectores de expresión que tienen funciones equivalentes y que se dan a conocer en la técnica a continuación. En algunas realizaciones, un vector recombinante incluye además un promotor unido operativamente a la secuencia polinucleotídica. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor regulado por el desarrollo, un promotor específico del orgánulo, un promotor específico del tejido, un promotor inducible, un promotor constitutivo o un promotor específico de la célula. El vector recombinante normalmente comprende al menos una secuencia seleccionada de una secuencia de control de la expresión acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica; un marcador de selección acoplado operativamente a la secuencia polinucleotídica; una secuencia marcadora acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica; un resto de purificación acoplado operativamente a la secuencia polinucleotídica; una secuencia de secreción acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica; y una secuencia de dirección acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica. En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleótidos se incorpora de manera estable en el ADN genómico de la célula hospedadora, y la expresión de la secuencia de nucleótidos está bajo el control de una región promotora regulada. Los vectores de expresión como se usan en el presente documento incluyen una secuencia polinucleotídica particular como se describe en el presente documento en una forma adecuada para la expresión de la secuencia polinucleotídica en una célula hospedadora. Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se vaya a transformar, el nivel de expresión del polipéptido deseado, etc. Los vectores de expresión descritos en el presente documento pueden introducirse en células hospedadoras para producir polipéptidos, incluyendo polipéptidos de fusión, codificados por las secuencias polinucleotídicas como se describe en el presente documento.

65 Las expresiones "célula recombinante" y "célula hospedadora recombinante" se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a una célula que se ha modificado para expresar exógenamente al menos una enzima

biosintética. En una realización particular, la enzima biosintética puede convertir un precursor de aldehído graso en una amina grasa. Por consiguiente, en una realización, la célula recombinante abarca una enzima biosintética que puede aumentar la actividad específica de la célula recombinante para producir aminas grasas o compuestos derivados de aminas grasas. Una célula recombinante puede derivarse de un microorganismo o de una célula microbiana tal como una bacteria, un virus o un hongo. La célula recombinante puede usarse para producir aminas grasas. En algunas realizaciones, la célula recombinante expresa exógenamente uno o más polinucleótidos, codificando cada polinucleótido un polipéptido que tiene actividad enzimática biosintética, en donde la célula recombinante produce una composición relacionada con la amina grasa cuando se cultiva en presencia de una fuente de carbono en condiciones eficaces para expresar el/los polinucleótido/s.

Como se usa en el presente documento, El término "microorganismo" se refiere a un organismo microscópico. Son ejemplos de un microorganismo una bacteria, un virus o un hongo. En una realización, un microorganismo es una célula bacteriana. En otra realización, un microorganismo es un procarionta o una célula procarionta. En otra realización más, un microorganismo es una célula fúngica tal como una célula de levadura. En otra realización, un microorganismo es una célula vírica. En una realización relacionada, un "microorganismo recombinante" es un microorganismo que ha sido modificado genéticamente y que expresa o abarca una secuencia de ácido nucleico exógena y/o heteróloga. En otra realización relacionada, un "microorganismo recombinante" es un microorganismo que ha sido modificado genéticamente y que expresa una vía metabólica diseñada que incluye al menos una proteína expresada exógenamente (por ejemplo, una enzima biosintética exógena).

El término "acil-ACP" se refiere a un aciltioéster formado entre el carbono carbonílico de la cadena de alquilo y el grupo sulfhidrilo de la fracción fosfopanteteinilo de una proteína portadora de acilo (ACP). La fracción fosfopanteteinilo se une después de la traducción a un resto de serina conservado en la ACP mediante la acción de la proteína sintasa portadora de holo-acilo (ACPS), una fosfopanteteinil transferasa. En algunas realizaciones, una acil-ACP es un producto intermedio en la síntesis de acil-ACP completamente saturadas. En otras realizaciones, una acil-ACP es un producto intermedio en la síntesis de acil-ACP insaturadas. En algunas realizaciones, la cadena de carbono tendrá aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 átomos de carbono. Cada una de estas acil-ACP son sustratos para las enzimas que los convierten en derivados de ácidos grasos.

El término "acil-CoA" es un compuesto temporal formado cuando la coenzima A (CoA) se une al extremo de un ácido graso dentro de una célula viva. Se refiere a un grupo de coenzimas que participan en el metabolismo de los ácidos grasos. En algunas realizaciones, la cadena de carbono tendrá aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 átomos de carbono. Cada una de estas acil-CoA son sustratos para las enzimas que los convierten en derivados de ácidos grasos.

La expresión "vía metabólica para la producción de aldehído graso" significa cualquier vía biosintética que produce aldehídos grasos. La vía metabólica para la producción de aldehídos grasos puede incluir cualquier cantidad de enzimas para producir aldehídos grasos.

La expresión "vía metabólica para la producción de aminas grasas" significa cualquier vía biosintética que produce aminas grasas. La vía metabólica para la producción de aminas grasas puede incluir al menos una enzima para producir aminas grasas.

Como se usa en el presente documento, "amina grasa" significa una amina que tiene la fórmula RNH₂. Una amina grasa como se menciona en el presente documento puede ser cualquier amina grasa hecha de, por ejemplo, un ácido graso o aldehído graso o aldehído graso derivado de una acil-ACP grasa. En algunas realizaciones, el grupo R es de al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18 o al menos 19 átomos de carbono de longitud. Como alternativa, o además, el grupo R es de 24 o menos, 23 o menos, 22 o menos, 20 o menos, 19 o menos, 18 o menos, 17 o menos, 16 o menos, 15 o menos, 14 o menos, 13 o menos, 12 o menos, 11 o menos, 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, o 6 o menos átomos de carbono de longitud. Por consiguiente, el grupo R puede tener un grupo R limitado por dos cualquiera de los criterios de valoración anteriores. Por ejemplo, el grupo R puede tener 6-16 átomos de carbono de longitud, 10-14 átomos de carbono de longitud, o 12-18 átomos de carbono de longitud. En algunas realizaciones, la composición de amina grasa comprende una o más de una amina grasa C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, 22, 23 y C24. En otras realizaciones, la composición de amina grasa incluye una o más de una amina grasa C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17 y C18. En otras realizaciones más, la composición de amina grasa incluye aminas grasas C12, C14, C16 y C18; aminas grasas C12, C14 y C16; aminas grasas C14, C16 y C18; o aminas grasas C12 y C14. El grupo R de una amina grasa, puede ser una cadena lineal o una cadena ramificada. Las cadenas ramificadas pueden tener más de un punto de ramificación y pueden incluir ramificaciones cíclicas. En algunas realizaciones, la amina grasa ramificada es una amina grasa ramificada C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23 o C24. El grupo R de una amina grasa ramificada o no ramificada puede estar saturado o insaturado. Si está insaturado, el grupo R puede tener uno o más de un punto de insaturación. En algunas realizaciones, la amina grasa insaturada es una amina grasa monoinsaturada. En ciertas realizaciones, la amina grasa insaturada es una amina grasa insaturada C6:1, C7:1, C8:1, C9:1, C10:1, C11:1, C12:1, C13:1, C14:1, C15:1, C16:1, C17:1, C18:1, C19:1, C20:1, C21:1, C22:1, C23:1 o C24:1. En ciertas realizaciones, la amina grasa insaturada es una amina grasa insaturada C10:1, C12:1, C14:1,

C16:1 o C18:1. En otras realizaciones, la amina grasa insaturada está insaturada en la posición omega-7. En ciertas realizaciones, la amina grasa insaturada tiene un doble enlace *cis*. Las aminas grasas se clasifican en aminas primarias, secundarias y terciarias, dependiendo del número de átomos de hidrógeno de una molécula de amoníaco reemplazados por grupos grasos de alquilo o metilo. Los ejemplos de aminas grasas que pueden usarse como

5 detergentes, en tratamientos de agua, como agentes de flotación, en el petróleo, como inhibidores de la corrosión, en productos textiles, en caucho y similares, son aminas terciarias tales como di-metil-alquilaminas (C10, C12, C14, C16 o C18) y di-alquil-metilaminas (C10); y mezclas de aminas terciarias tales como di-metil-alquilaminas (C8-C18, C12-C18, C12-C14 o C16-C18).

10 El término "clon" normalmente se refiere a una célula o a un grupo de células descendientes de y esencialmente idénticas genéticamente a un único ancestro común, por ejemplo, las bacterias de una colonia bacteriana clonada surgieron de una sola célula bacteriana.

15 Como se usa en el presente documento, el término "cultivo" típico se refiere a un medio líquido que comprende células viables. En una realización, un cultivo comprende células que se reproducen en un medio de cultivo predeterminado en condiciones controladas, por ejemplo, un cultivo de células hospedadoras recombinantes cultivadas en medios líquidos que comprenden una fuente de carbono y nitrógeno seleccionados. "Cultivar" o "cultivo" se refiere al crecimiento de una población de células hospedadoras (por ejemplo, células hospedadoras recombinantes) en condiciones adecuadas en un medio líquido o sólido. En algunas realizaciones, cultivar se refiere a la bioconversión

20 fermentativa de un sustrato hasta la obtención de un producto final. Los medios de cultivo son bien conocidos, y los componentes individuales de dichos medios de cultivo están disponibles en fuentes comerciales (por ejemplo, medios DIFCO y medios BBL). En un ejemplo, el medio de nutrientes acuoso es un "medio rico" que incluye fuentes complejas de nitrógeno, sales y carbono, tales como el medio YP, que incluye 10 g/l de peptona y 10 g/l de extracto de levadura. En otro ejemplo, el medio de nutrientes es un "medio mínimo" compuesto de oligoelementos, nutrientes y sales.

25 Las expresiones "una actividad modificada" o "un nivel de actividad modificado", por ejemplo, con respecto a una actividad enzimática en una célula hospedadora recombinante, se refieren a una diferencia en una o más características en la actividad enzimática según lo determinado en relación con la célula hospedadora primaria o nativa. Por lo general, dichas diferencias en la actividad se determinan entre una célula hospedadora recombinante

30 (es decir, que tiene actividad modificada) y la célula hospedadora de tipo silvestre correspondiente, en particular, mediante la comparación del cultivo de una célula hospedadora recombinante con el cultivo de la célula hospedadora de tipo silvestre correspondiente. Las actividades modificadas pueden ser el resultado de, por ejemplo, cantidades modificadas de proteína expresada por una célula hospedadora recombinante (por ejemplo, como resultado de un aumento o de una disminución del número de copias de secuencias de ADN que codifican la proteína, aumento o

35 disminución del número de transcripciones de ARNm que codifican la proteína, y/o aumento o disminución de las cantidades de traducción proteica de la proteína a partir del ARNm); cambios en la estructura de la proteína (por ejemplo, cambios en la estructura primaria, tales como, cambios en la secuencia de codificación de la proteína que producen cambios en la especificidad del sustrato, cambios en los parámetros cinéticos observados); y cambios en la estabilidad de la proteína (por ejemplo, aumento o disminución de la degradación de la proteína). En determinados

40 casos, las secuencias de codificación para los polipéptidos descritos en el presente documento son codones optimizados para la expresión en una célula hospedadora en particular. Por ejemplo, para la expresión en *E. coli*, se pueden optimizar, por consiguiente, uno o más codones (véase Grosjean *et al.* (1982) *Gene* 18: 199-209).

45 La expresión "secuencias reguladoras", como se usa en el presente documento, normalmente se refiere a una secuencia de bases en el ADN, unida operativamente a secuencias de ADN que codifican una proteína que finalmente controla la expresión de la proteína. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen, pero sin limitación, secuencias promotoras de ARN, secuencias de unión de 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 a ribosomas (por ejemplo,

50 secuencias de Shine-Dalgarno en procariontes o secuencias de Kozak en eucariotas), codones de inicio, codones de terminación). Como se usa en el presente documento, la expresión "la expresión de dicha secuencia de nucleótidos se modifica con respecto a la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre", significa un aumento o una disminución en el nivel de expresión y/o la actividad de una secuencia de nucleótidos endógena o la expresión y/o actividad de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido heterólogo o no nativo. La expresión "nivel de expresión alterado" y "nivel de expresión modificado" se usan indistintamente, y significan que un polinucleótido, polipéptido o hidrocarburo está presente a una concentración diferente en una célula hospedadora modificada en comparación con su concentración en una célula de tipo silvestre correspondiente en las mismas condiciones. Como se usa en el presente

55 documento, el término "expresar" con respecto a un polinucleótido es hacer que funcione. Un polinucleótido que codifica un polipéptido (o una proteína), cuando se expresa, se transcribirá o se traducirá para producir ese polipéptido (o esa proteína).

60

Como se usa en el presente documento, el término "título" se refiere a la cantidad de una amina grasa o un compuesto o composición relacionado con la amina grasa producidos por unidad de volumen de cultivo de células hospedadoras. En cualquier aspecto de las composiciones y de los métodos descritos en el presente documento, se produce una

65 amina grasa 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 cualquiera de los dos valores anteriores. En otras realizaciones, se produce una amina grasa a un título de superior a 100 g/l, superior a 200 g/l o superior a 300 g/l. Un título preferido de amina grasa producida por una célula hospedadora recombinante de acuerdo con los métodos de la divulgación es de 5 g/l a 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. El título puede referirse a una amina grasa en particular, o a una combinación o composición de aminas grasas producidas por un cultivo de células hospedadoras recombinantes dado. Por ejemplo, la expresión de proteína biosintética que puede convertir un aldehído graso en una amina grasa en una célula hospedadora recombinante tal como *E. coli* da lugar a la producción de un título más alto en comparación con una célula hospedadora recombinante que expresa el polipéptido de tipo silvestre correspondiente que carece de expresión de la proteína biosintética que puede convertir un aldehído graso en una amina grasa. En una realización, el título más alto varía de al menos aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 200 g/l.

Como se usa en el presente documento, el "rendimiento de un compuesto relacionado con la amina grasa que incluye aminas grasas producidas por una célula hospedadora" se refiere a la eficacia mediante la que una fuente de carbono de entrada se convierte en producto en una célula hospedadora. Las células hospedadoras diseñadas para producir una amina grasa o un compuesto relacionado con amina grasa de acuerdo con los métodos de la divulgación tienen un rendimiento de al menos aproximadamente el 3 %, al menos aproximadamente el 4 %, al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente el 6 %, al menos aproximadamente el 7 %, al menos aproximadamente el 8 %, al menos aproximadamente el 9 %, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 11 %, al menos aproximadamente el 12 %, al menos aproximadamente el 13 %, al menos aproximadamente el 14 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 16 %, al menos aproximadamente el 17 %, al menos aproximadamente el 18 %, al menos aproximadamente el 19 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 21 %, al menos aproximadamente el 22 %, al menos aproximadamente el 23 %, al menos aproximadamente el 24 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 26 %, al menos aproximadamente el 27 %, al menos aproximadamente el 28 %, al menos aproximadamente el 29 % o al menos aproximadamente el 30 %, o un intervalo limitado por dos cualquiera de los valores anteriores. En otras realizaciones, se produce una amina grasa a un rendimiento superior a aproximadamente el 30 %, superior a aproximadamente el 35 %, superior a aproximadamente el 40 %, superior a aproximadamente el 45 %, superior a aproximadamente el 50 %, superior a aproximadamente el 55 %, superior a aproximadamente el 60 %, superior a aproximadamente el 65 %, superior a aproximadamente el 70 %, superior a aproximadamente el 75 %, superior a aproximadamente el 80 %, superior a aproximadamente el 85 %, superior a aproximadamente el 90 % o superior. Como alternativa, o además, el rendimiento es de aproximadamente el 30 % o inferior, de aproximadamente el 27 % o inferior, de aproximadamente el 25 % o inferior, o de aproximadamente el 22 % o inferior. En otra realización, el rendimiento es de aproximadamente el 50 % o inferior, de aproximadamente el 45 % o inferior, o de aproximadamente el 35 % o inferior. En otra realización, el rendimiento es de aproximadamente el 95 % o inferior, o el 90 % o inferior, o el 85 % o inferior, o el 80 % o inferior, o el 75 % o inferior, o el 70 % o inferior, o el 65 % o inferior, o el 60 % o inferior, o el 55 % o inferior, o el 50 % o inferior. Por consiguiente, el rendimiento puede estar limitado por dos cualquiera de los criterios de valoración anteriores. Por ejemplo, el rendimiento de una amina grasa o un compuesto relacionado con amina grasa producido por la célula hospedadora recombinante de acuerdo con los métodos de la divulgación puede ser de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 15 %, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 25 %, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 22 %, de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 27 %, de aproximadamente el 18 % a aproximadamente el 22 %, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 28 %, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 30 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 40 %, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 50 %, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 60 %, de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 70 %, de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 80 %, de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 90 % o de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 100 %. El rendimiento puede referirse a una amina grasa o un compuesto relacionado con amina grasa o una combinación

de aminas grasas en particular producidos por un cultivo de células hospedadoras recombinantes dado. Por ejemplo, la expresión de una proteína biosintética que puede convertir un aldehído graso en una amina grasa en una célula hospedadora recombinante tal como *E. coli* da lugar a la producción de un mayor rendimiento de aminas grasas o compuestos derivados de aminas grasas que incluyen composiciones o mezclas de aminas grasas en comparación con una célula hospedadora que expresa el correspondiente polipéptido de tipo silvestre. En una realización, el rendimiento más alto varía de aproximadamente el 10 % a aproximadamente 100 % del rendimiento teórico.

Como se usa en el presente documento, el término "productividad" se refiere a la cantidad de una amina grasa o un compuesto relacionado con amina grasa que incluye una composición o mezcla de una o más aminas grasas producidas por unidad de volumen de cultivo de células hospedadoras por unidad de tiempo. En cualquier aspecto de las composiciones y de los métodos descritos en el presente documento, La productividad de un compuesto relacionado con la amina grasa que incluye una composición o combinación de aminas grasas producidas por una célula hospedadora 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, 2500 mg/l/hora, o tanto como 10 g/l/hora (dependiendo de la masa celular). Por ejemplo, la productividad de un compuesto relacionado con aminas grasas que incluye una composición o combinación de aminas grasas producida por una célula hospedadora recombinante de acuerdo con los métodos de la presente descripción puede ser de 500 mg/l/hora a 2500 mg/l/hora, o de 700 mg/l/hora a 2000 mg/l/hora. La productividad puede referirse a un compuesto relacionado con aminas grasas en particular que incluye una composición de aminas grasas o una mezcla de aminas grasas o una combinación de aminas grasas producida por un cultivo de células hospedadoras dado. Por ejemplo, la expresión de una proteína biosintética que puede convertir un aldehído graso en una amina grasa en una célula hospedadora recombinante tal como *E. coli* da lugar a la producción de una mayor productividad de compuestos derivados de aminas grasas que incluyen aminas grasas, y composiciones y mezclas de las mismas en comparación con una célula hospedadora recombinante que expresa el correspondiente polipéptido de tipo silvestre. En una realización, la productividad más alta varía de aproximadamente 0,3 g/l/ha aproximadamente 3 g/l/h.

Como se usa en el presente documento, la expresión "especie de grasa total" y "producto de amina grasa total" y "derivado de amina grasa" pueden usarse indistintamente en el presente documento con referencia a la cantidad de aminas grasas que puede producir la célula hospedadora que expresa la proteína biosintética que puede convertir un aldehído graso en una amina grasa, según lo evaluado mediante GC-FID.

Como se usa en el presente documento, la expresión "tasa de utilización de glucosa" significa la cantidad de glucosa usada por el cultivo por unidad de tiempo, indicada como gramos/litro/hora (g/l/h).

Como se usa en el presente documento, la expresión "fuente de carbono" se refiere a un sustrato o compuesto adecuado para su uso como fuente de carbono para el crecimiento de células procariontas o eucariotas simples. Las fuentes de carbono pueden ser de diferentes formas, incluyendo, pero sin limitación, polímeros, carbohidratos, ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, aminoácidos, péptidos y gases (por ejemplo, CO y CO₂). Los ejemplos de fuentes de carbono incluyen, pero sin limitación, 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 glicerol, o mezclas de los mismos. Además, la fuente de carbono puede ser un producto de la fotosíntesis, tal como glucosa. En ciertas realizaciones, la fuente de carbono es una mezcla de gases que contiene CO procedente del gas de combustión. En otra realización, la fuente de carbono es una mezcla de gases que contiene CO procedente de la reforma de un material que contiene carbono, tal como biomasa, carbón o gas natural. En otras realizaciones, la fuente de carbono es gas de síntesis, metano o gas natural. En determinadas realizaciones preferidas, la fuente de carbono es biomasa. En otras realizaciones preferidas, la fuente de carbono es glucosa. En otras realizaciones preferidas, la fuente de carbono es sacarosa. En otras realizaciones, la fuente de carbono es glicerol. En otras realizaciones preferidas, la fuente de carbono es zumo de caña de azúcar, jarabe de caña de azúcar o jarabe de maíz. En otras realizaciones preferidas, la fuente de carbono se deriva de materias primas renovables, tales como CO₂, CO, glucosa, sacarosa, xilosa, arabinosa, glicerol, manosa, o mezclas de los mismos. En otras realizaciones, la fuente de carbono se deriva de materias primas renovables, incluyendo almidones, biomasa celulósica, melazas y otras fuentes de carbohidratos, incluyendo las mezclas de carbohidratos derivadas de la hidrólisis de la biomasa celulósica, o los materiales de desecho derivados del procesamiento de aceites vegetales o naturales.

Como se usa en el presente documento, El término "biomasa" se refiere a cualquier material biológico del que se deriva una fuente de carbono. En algunas realizaciones, una biomasa se procesa en una fuente de carbono, que es adecuada para la bioconversión. En otras realizaciones, la biomasa no requiere procesamiento adicional en una fuente de carbono. La fuente de carbono se puede convertir en una composición que comprenda aminas grasas. Una fuente ilustrativa de biomasa es materia vegetal o vegetación, tal como de maíz, caña de azúcar o césped de pradera. Otra

fuentes ilustrativas de biomasa son los productos de desecho metabólicos, tales como materia animal (por ejemplo, estiércol de vaca). Otras fuentes ilustrativas de biomasa incluyen algas y otras plantas marinas. La biomasa también incluye productos de desecho de la industria, la agricultura, la silvicultura y los hogares, incluyendo, pero sin limitación, glicerol, residuos de fermentación, ensilado, paja, madera, aguas residuales, basura, restos urbanos celulósicos y restos de comida (por ejemplo, jabones, aceites y ácidos grasos). El término "biomasa" también puede referirse a fuentes de carbono, tales como carbohidratos (por ejemplo, monosacáridos, disacáridos o polisacáridos).

Como se usa en el presente documento, el término "aislado", con respecto a productos (tales como aminas grasas, y composiciones y mezclas de las mismas) se refiere a productos que están separados de los componentes celulares, medios de cultivo celular, o precursores químicos o sintéticos. Las aminas grasas producidas mediante los métodos descritos en el presente documento pueden ser relativamente inmiscibles en el caldo de fermentación, así como en el citoplasma. Por lo tanto, las aminas grasas pueden acumularse en una fase orgánica, ya sea intracelular o extracelular.

Como se usa en el presente documento, Los términos "purificar", "purificado/a" o "purificación" significan la eliminación o el aislamiento de una molécula de su entorno mediante, por ejemplo, aislamiento o separación. Las moléculas "esencialmente purificadas" están al menos aproximadamente un 60 % libres (por ejemplo, al menos aproximadamente un 70 % libres, al menos aproximadamente un 75 % libres, al menos aproximadamente un 85 % libres, al menos aproximadamente un 90 % libres, al menos aproximadamente un 95 % libres, al menos aproximadamente un 97 % libres y al menos aproximadamente un 99 % libres) de otros componentes con los que están asociadas. Como se usa en el presente documento, estos términos también se refieren a la eliminación de contaminantes de una muestra. Por ejemplo, la eliminación de contaminantes puede producir un aumento en el porcentaje de compuestos derivados de aminas grasas que incluyen aminas grasas, y composiciones y mezclas de las mismas en una muestra. Por ejemplo, cuando se produce un compuesto relacionado con aminas grasas en una célula hospedadora recombinante, el compuesto relacionado con aminas grasas puede purificarse mediante la eliminación de proteínas de la célula hospedadora y/u otro material de la célula hospedadora. Después de la purificación, se aumenta el porcentaje de aminas grasas en la muestra. Los términos "purificar", "purificado/a" y "purificación" son términos relativos que no requieren una pureza absoluta. Por consiguiente, por ejemplo, cuando se produce un compuesto relacionado con aminas grasas en células hospedadoras recombinantes, el compuesto de aminas grasas está esencialmente separado de otros componentes celulares (por ejemplo, ácidos nucleicos, polipéptidos, lípidos, carbohidratos u otros hidrocarburos).

Como se usa en el presente documento, el término "atenuar" significa debilitar, reducir o disminuir. Por ejemplo, un polipéptido puede atenuarse modificando el polipéptido para reducir su actividad (por ejemplo, modificando una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido).

Las expresiones "enzima biosintética productora de aldehído graso" o "enzima generadora de aldehído graso" se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a un polipéptido o una proteína o una enzima que tiene la actividad enzimática para generar aldehídos grasos o precursores de aldehído graso. Los ejemplos de dichas enzimas incluyen, pero sin limitación, una reductasa de ácido carboxílico (CAR) (por ejemplo, CarB) y/o una tioesterasa (TE) (por ejemplo, TesA, 'tesA); una acil-ACP reductasa (AAR) (por ejemplo, de *Synechococcus elongatus* PCC7942); una acil-CoA reductasa (por ejemplo, Acr1); una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa); y similares.

De precursores de aldehído graso a aminas grasas

La divulgación se refiere a la producción microbiana de aminas grasas. Como se muestra en el presente documento, los microorganismos pueden modificarse genéticamente para expresar diversas enzimas biosintéticas con el fin de producir aminas grasas *in vivo*. De manera más específica, un microorganismo puede ser modificado genéticamente para expresar una vía metabólica que convierta un aldehído graso en una amina grasa. La vía expresa al menos una enzima biosintética que tiene aminotransferasa (por ejemplo, putrescina aminotransferasa (YgjG) o GABA aminotransferasa (PuuE) de *Escherichia coli*) o amina deshidrogenasa (por ejemplo, metilamina deshidrogenasa de *Paracoccus denitrificans* o quinohemoproteína amina deshidrogenasa de *Pseudomonas sp.*) o actividad amina oxidasa para convertir aldehídos grasos en aminas grasas. Las transaminasas llevan a cabo la misma reacción que las aminotransferasas, y estos nombres a veces se usan indistintamente. Por ejemplo, la GABA aminotransferasa también se conoce como 4-aminobutirato transaminasa. En una realización, la aminotransferasa o transaminasa o la amina deshidrogenasa o la amina oxidasa es una enzima biosintética exógena o expresada exógenamente en la célula. Como alternativa, las aminas grasas se pueden producir combinando las vías diseñadas para la producción de aminas grasas que expresan una enzima biosintética que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa o amina oxidasa para convertir aldehídos grasos en aminas grasas con una vía diseñada para la producción de aldehído graso que expresa una enzima biosintética exógena que produce aldehídos grasos. Dichos precursores de aldehído graso pueden generarse *in vivo* a través de una variedad de procesos y vías diseñadas, tales como una vía de ácido carboxílico reductasa (CAR) diseñada utilizada para la producción de aldehído graso (véase la Patente de EE.UU. n.º 8.097.439, incorporada en el presente documento por referencia) o una vía de CAR y tioesterasa (TE) diseñada utilizada para la producción de alcohol graso (véase la Patente de EE.UU. n.º 8.097.439, anteriormente citado) o una vía de fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) y CAR utilizada para la producción de aldehído graso o alcohol graso (véase la publicación de solicitud de EE. UU. n.º 20130035513) o una vía de acil-ACP reductasa (AAR) diseñada utilizada para la producción de aldehído graso (véase la Patente de EE. UU. n.º 8.268.599) o para la producción de

alcanos (véase la Patente de EE.UU. n.º 8.323.924). Un ejemplo de una TE adecuada es 'Tesa (es decir, una tioesterasa truncada de *E. coli* que tiene su secuencia líder del periplasma eliminada (de ahí el apóstrofe), de manera que permanezca en el citoplasma); un ejemplo de una CAR adecuada es CarB; un ejemplo de una AAR adecuada es la enzima de *Synechococcus elongatus* PCC7942 (véase la Tabla 6, citado a continuación).

- 5 En una realización, la coexpresión de una vía diseñada para la producción de aldehído graso y una vía diseñada para la producción de amina grasa con la expresión de una enzima biosintética que tiene actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa o amina oxidasa, Complementando con una fuente de nitrógeno apropiada (por ejemplo, glutamato o amoníaco o peróxido de hidrógeno) permite la conversión de un precursor de aldehído en la amina correspondiente (véase la Tabla 1 para la putrescina aminotransferasa; Véanse las Tablas 2, 3 y 4 para los ejemplos de reacciones enzimáticas). La disponibilidad de donantes de nitrógeno (por ejemplo, glutamato) para la reacción de aminotransferasa se puede mejorar opcionalmente sobreexpresando la glutamato deshidrogenasa para aumentar la velocidad de la biosíntesis de glutamato. La glutamato deshidrogenasa de *E. coli* nativa usa NADPH como cofactor rédox, por lo tanto, el reemplazo de esta enzima por una glutamato deshidrogenasa que es capaz de usar NADH en su lugar (tal como, por ejemplo, las glutamato deshidrogenasas de *Bacteroides* sp., que incluyen, pero sin limitación, *B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis*, *B. distasonis*, *B. ovatus*, *B. vulgatus*, y *B. Uniformis*) puede aumentar la disponibilidad de NADPH en la célula. Esto puede proporcionar un mayor suministro de NADPH para otros procesos biosintéticos que dependen de NADPH (por ejemplo, biosíntesis de ácidos grasos).
- 10
- 15
- 20 La Tabla 1 que se presenta a continuación (citado a continuación) representa los números CE y nombres para diferentes enzimas biosintéticas que son útiles en la producción de aminas, incluyendo las aminotransferasas/transaminasas. La comisión enzimática o el número de clasificación (número CE) es un esquema de clasificación numérica para las enzimas, basado en las reacciones químicas que catalizan. Los números CE no especifican técnicamente enzimas, más bien, especifican reacciones catalizadas por enzimas. Por ejemplo, si diferentes enzimas (por ejemplo, de diferentes organismos) catalizan la misma reacción, entonces reciben el mismo número CE. Además, diferentes pliegues de proteínas pueden catalizar una reacción idéntica y, por lo tanto, se les puede asignar un número CE idéntico debido a la evolución convergente (es decir, estas se denominan enzimas isofuncionales no homólogas o NISE [Non-homologous Isofunctional Enzymes]). Como se muestra en la Tabla 1, la actividad enzimática de la putrescina aminotransferasa se clasifica con el número CE 2.6.1.82. Todas las enzimas que se muestran en la Tabla 1 participan en reacciones químicas que producen aminas y se clasifican como aminotransferasas/transaminasas, porque su número CE es CE 2.6.1 (véase también la Tabla 7, citado a continuación). La Tabla 2 que figura a continuación (citado a continuación) muestra una serie de enzimas biosintéticas diferentes que pueden producir aminas grasas a partir de precursores de aldehídos grasos. Por ejemplo, las aminotransferasas o transaminasas, las amina oxidasas y las amina deshidrogenasas catalizan reacciones en las que los precursores de aldehídos grasos se convierten en aminas grasas. En una realización, una vía metabólica diseñada incluye una aminotransferasa o transaminasa para la producción de aldehídos grasos *in vivo*. En otra realización, una vía metabólica diseñada incluye una amina oxidasa para la producción de aldehídos grasos *in vivo*. En otra realización, una vía metabólica diseñada incluye una amina deshidrogenasa para la producción de aldehídos grasos *in vivo*. La Tabla 3 que figura a continuación (citado a continuación) muestra la reacción catalizada por la putrescina aminotransferasa, es decir, convertir los aldehídos grasos en aminas grasas.
- 25
- 30
- 35
- 40

Tabla 1: Enzimas que participan en la producción de aminas con CE 2.6.1

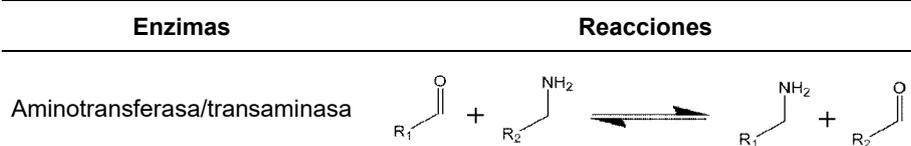
2.6.1.1	Aspartato transaminasa.	2.6.1.44	Alanina-glioxilato transaminasa.
2.6.1.2	Alanina transaminasa.	2.6.1.45	Serina - glioxilato transaminasa.
2.6.1.3	Cisteína transaminasa.	2.6.1.46	Diaminobutirato-piruvato transaminasa.
2.6.1.4	Glicina transaminasa.	2.6.1.47	Alanina - oxomalonato transaminasa.
2.6.1.5	Tirosina transaminasa.	2.6.1.48	5-aminovalerato transaminasa.

(continuación)

- | | | | |
|----------|--|----------|--|
| 2.6.1.6 | Leucina transaminasa. | 2.6.1.49 | Dihidroifenilalanina transaminasa. |
| 2.6.1.7 | Kinurenina - oxoglutarato transaminasa. | 2.6.1.50 | Glutamina - escilo-inositol transaminasa. |
| 2.6.1.8 | 2,5-diaminovalerato transaminasa. | 2.6.1.51 | Serina - piruvato transaminasa. |
| 2.6.1.9 | Histidinol-fosfato transaminasa. | 2.6.1.52 | Fosfoferina transaminasa. |
| 2.6.1.10 | Entrada transferida: 2.6.1.21. | 2.6.1.53 | Entrada transferida: 1.4.1.13. |
| 2.6.1.11 | Acetilornitina transaminasa. | 2.6.1.54 | Piridoxamina-fosfato transaminasa. |
| 2.6.1.12 | Alanina - oxoácido transaminasa. | 2.6.1.55 | Taurina--2-oxoglutarato transaminasa. |
| 2.6.1.13 | Ornitina aminotransferasa. | 2.6.1.56 | 1D-1-guanidino-3-amino-1,3-didesoxi-esciloinositol transaminasa. |
| 2.6.1.14 | Asparagina--oxo-ácido transaminasa. | 2.6.1.57 | Aminoácido aromático transaminasa. |
| 2.6.1.15 | Glutamina-piruvatotransaminasa. | 2.6.1.58 | Fenilalanina (histidina) transaminasa. |
| 2.6.1.16 | Glutamina-fructosa-6-fosfato transaminasa (isomerizante). | 2.6.1.59 | dTDP-4-amino-4,6-didesoxigalactosa transaminasa. |
| 2.6.1.17 | Succinildiaminopimelato transaminasa. | 2.6.1.60 | Aminoácido aromático-glioxilato transaminasa. |
| 2.6.1.18 | Beta-alanina - piruvato transaminasa. | 2.6.1.61 | Entrada eliminada. |
| 2.6.1.19 | 4-aminobutirato transaminasa. | 2.6.1.62 | Adenosilmetionina - 8-amino-7-oxononanoato transaminasa. |
| 2.6.1.20 | Entrada eliminada. | 2.6.1.63 | Kinurenina - glicoxilato transaminasa. |
| 2.6.1.21 | Aminoácido D transaminasa. | 2.6.1.64 | Glutamina-fenilpiruvato transaminasa. |
| 2.6.1.22 | (S)-3-amino-2-metilpropionato transaminasa. | 2.6.1.65 | N(6)-acetil-beta-lisina transaminasa. |
| 2.6.1.23 | 4-hidroxiglutamato transaminasa. | 2.6.1.66 | Valina - piruvato transaminasa. |
| 2.6.1.24 | Diyodotirosina transaminasa. | 2.6.1.67 | 2-aminohexanoato transaminasa. |
| 2.6.1.25 | Entrada transferida: 2.6.1.24. | 2.6.1.68 | Ornitina (lisina) transaminasa. |
| 2.6.1.26 | Hormona tiroidea transaminasa. | 2.6.1.69 | Entrada eliminada. |
| 2.6.1.27 | Triptófano transaminasa. | 2.6.1.70 | Aspartato-fenilpiruvato transaminasa. |
| 2.6.1.28 | Triptófano - fenilpiruvato transaminasa. | 2.6.1.71 | Lisina - piruvato 6-transaminasa. |
| 2.6.1.29 | Diaminotransaminasa. | 2.6.1.72 | D-4-hidroxifenilglicina transaminasa. |
| 2.6.1.30 | Piridoxamina - piruvato transaminasa. | 2.6.1.73 | Metionina - glioxilatotransaminasa. |
| 2.6.1.31 | Piridoxamina - oxaloacetato transaminasa. | 2.6.1.74 | Cefalosporina-C transaminasa. |
| 2.6.1.32 | Valina - 3-metil-2-oxoalderato transaminasa. | 2.6.1.75 | Cisteína-conjugada transaminasa. |
| 2.6.1.33 | dTDP-4-amino-4,6-didesoxi-D-glucosa transaminasa. | 2.6.1.76 | Diaminobutirato--2-oxoglutarato transaminasa. |
| 2.6.1.34 | UDP-2-acetamido-4-amino-2,4,6-tridesoxiglucosa transaminasa. | 2.6.1.77 | Taurina-piruvato aminotransferasa. |
| 2.6.1.35 | Glicina - oxaloacetato transaminasa. | 2.6.1.78 | Aspartato - preferato aminotransferasa. |
| 2.6.1.36 | L-lisina 6-transaminasa. | 2.6.1.79 | Glutamato - preferato aminotransferasa |
| 2.6.1.37 | 2-aminoetilfosfonato - piruvato transaminasa. | 2.6.1.80 | Nicotianamina aminotransferasa. |
| 2.6.1.38 | Histidina transaminasa. | 2.6.1.81 | Succinilornitina transaminasa. |
| 2.6.1.39 | 2-aminoadipato transaminasa. | 2.6.1.82 | Putrescina aminotransferasa. |
| 2.6.1.40 | (R)-3-amino-2-metilpropionato--piruvato transaminasa. | 2.6.1.83 | LL-diaminopimelato aminotransferasa. |
| 2.6.1.41 | D-metionina-piruvato transaminasa. | 2.6.1.84 | Arginina-piruvato transaminasa. |
| 2.6.1.42 | Aminoácido de cadena ramificada transaminasa. | 2.6.1.85 | Aminodesoxicorismato sintasa. |
| 2.6.1.43 | Aminolevulinato transaminasa. | 2.6.1.86 | 2-amino-4-desoxicorismato sintasa. |

Tabla 2: Reacciones enzimáticas que producen aminas grasas

Producción de aminas grasas a partir de aldehídos grasos



(continuación)

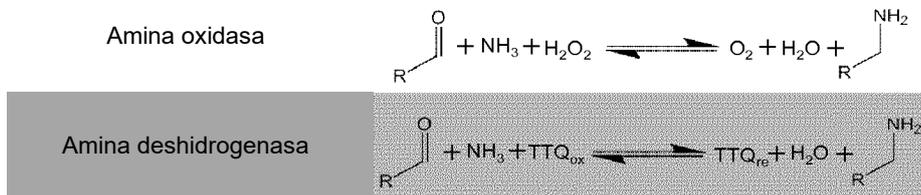
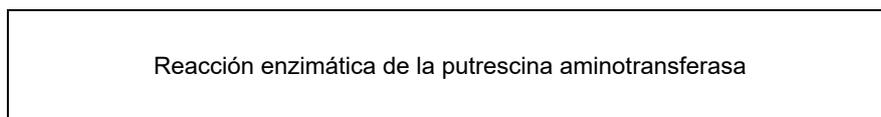


Tabla 3: Reacción enzimática de la putrescina aminotransferasa



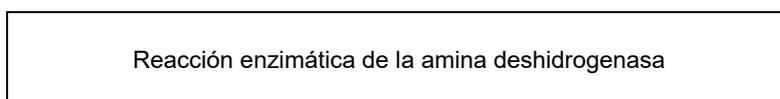
5

Para ilustrar la divulgación, se diseñaron células hospedadoras recombinantes para expresar una tioesterasa (TE), que cataliza la conversión de las acil-ACP o acil-CoA en ácidos grasos libres; y una ácido carboxílico reductasa (CAR), que convierte los ácidos grasos libres en aldehídos grasos. Las células hospedadoras recombinantes se diseñaron además para expresar una putrescina aminotransferasa (YgjG) para convertir los aldehídos grasos en aminas grasas (véase el Ejemplo 1 para resultados experimentales; véase la Tabla 3 (anteriormente citado) para la reacción enzimática llevada a cabo por YgjG; véase la Tabla 5 (citado a continuación) para el mecanismo de aminotransferasa/transaminasa). En el presente documento, el gen *ygjG* se clonó a partir de *E. coli* y se ligó en un vector de expresión para generar un plásmido de expresión. Se generó un segundo plásmido de expresión clonando e integrando un gen *carB* y un gen *tesA*. Luego, las células se transformaron con ambos plásmidos y se cultivaron en un caldo de fermentación con una fuente de carbono. Se confirmó la producción de aminas grasas mientras que las células de control no producían aminas grasas (véase el Ejemplo 1). Se puede usar cualquier aminotransferasa/transaminasa adecuada para producir aminas grasas siempre que la actividad enzimática pueda convertir los aldehídos grasos en aminas grasas. Si la célula produce aldehídos grasos de manera natural, entonces la célula está diseñada para expresar una putrescina aminotransferasa exógena (YgjG) como se muestra en el Ejemplo 1 para convertir los aldehídos grasos presentes de manera natural en aminas grasas.

En otra realización, se puede usar una amina deshidrogenasa en lugar de una aminotransferasa para convertir los aldehídos grasos en aminas grasas (véase la Tabla 4 (citado a continuación) para la reacción enzimática llevada a cabo por una amina deshidrogenasa; y la Tabla 7 (citado a continuación) para ejemplos de enzimas). Esto es aplicable si la fuente de nitrógeno es amoníaco en lugar de aminoácidos. Los ejemplos de amina deshidrogenasas son útiles para convertir aldehídos grasos en aminas grasas comprendidas en los números CE 1.4.9; CE 1.4.98; y CE 1.4.99 (véase la Tabla 7, citado a continuación). Por ejemplo, la alanina deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa, L-lisina-6-deshidrogenasa; y metilamina deshidrogenasa son ejemplos de amina deshidrogenasas que se pueden usar para convertir aldehídos grasos en aminas grasas (véase la Tabla 7, citado a continuación).

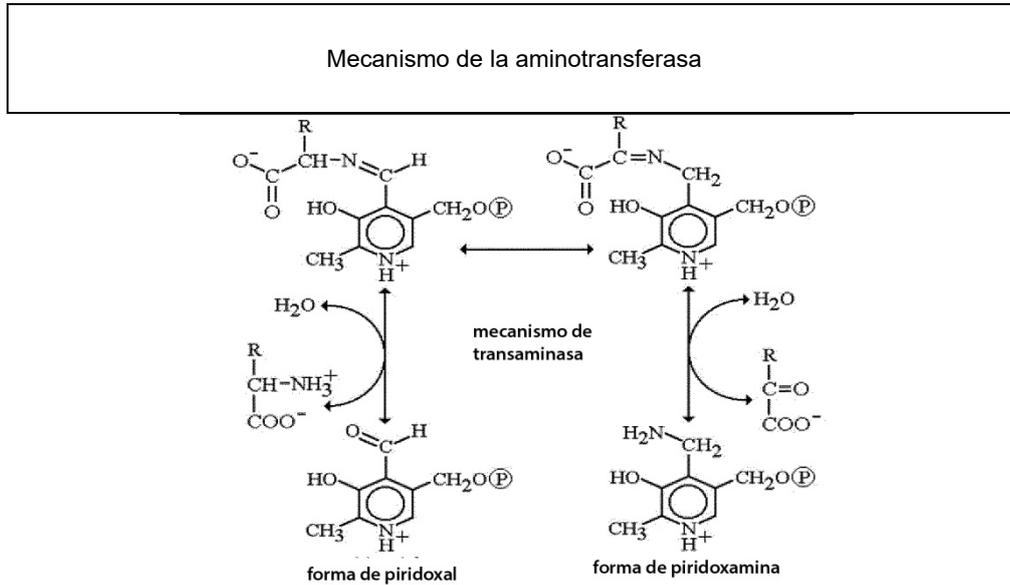
En otra realización más, se puede usar la amina oxidasa en lugar de una aminotransferasa para convertir aldehídos grasos en aminas grasas.

Tabla 4: Reacción de la amina deshidrogenasa



40

Tabla 5: Mecanismo para la aminotransferasa/transaminasa



5 Las Tablas 6 y 7 que figuran a continuación (citado a continuación) representan diferentes actividades enzimáticas y sus correspondientes números de clasificación enzimática (CE)

Tabla 6: Actividades enzimáticas

Designación del gen	Organismo fuente	Nombre de la enzima	N.º de registro	Número de CE	Uso ilustrativo
accA	<i>E. coli</i> , <i>Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad A (carboxiltransferasa alfa)	AAC73296, NP_414727	6.4.1.2	aumento de la producción de Malonil-CoA
accB	<i>E. coli</i> , <i>Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad B (BCCP: proteína portadora de carboxi de biotina)	NP_417721	6.4.1.2	aumento de la producción de Malonil-CoA
accC	<i>E. coli</i> , <i>Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad C (biotina carboxilasa)	NP_417722	6.4.1.2, 6.3.4.14	aumento de la producción de Malonil-CoA
accD	<i>E. coli</i> , <i>Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad D (carboxiltransferasa beta)	NP_416819	6.4.1.2	aumento de la producción de Malonil-CoA
fadI	<i>E. coli</i> W3110	acil-CoA sintasa	AP_002424	2.3.1.86, 6.2.1.3	aumento de la producción de ácido graso
fabA	<i>E. coli</i> K12	β -hidroxidecanoil tioéster deshidratasa/isomerasa	NP_415474	4.2.1.60	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso
fabB	<i>E. coli</i>	3-oxoacil-[acil-proteína portadora] sintasa I	BAA16180	2.3.1.41	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso
fabD	<i>E. coli</i> K12	[acil-proteína portadora] S-maloniltransferasa	AAC74176	2.3.1.39	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso
fabF	<i>E. coli</i> K12	3-oxoacil-[acil-proteína portadora] sintasa II	AAC74179	2.3.1.179	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso
fabG	<i>E. coli</i> K12	3-oxoacil-[acil-proteína portadora] reductasa	AAC74177	1.1.1.100	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso
fabH	<i>E. coli</i> K12	3-oxoacil-[acil-proteína portadora] sintasa III	AAC74175	2.3.1.180	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso
fabI	<i>E. coli</i> K12	enoil-[acil-proteína portadora] reductasa	NP_415804	1.3.1.9	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso
fabR	<i>E. coli</i> K12	Represor de la transcripción	NP_418398-	ninguno	modulación de la producción de ácidos grasos insaturados
fabV	<i>Vibrio cholerae</i>	enoil-[acil-proteína portadora] reductasa	YP_001217283	1.3.1.9	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso
fabZ	<i>E. coli</i> K12	(3R)-hidroximiristol acil proteína portadora deshidratasa	NP_414722	4.2.1	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso
fadE	<i>E. coli</i> K13	acil-CoA deshidrogenasa	AAC73325	1.3.99.3, 1.3.99.-	reducción de la degradación de ácidos grasos
fadD	<i>E. coli</i> K12	acil-CoA sintetasa	NP_416319	6.2.1.3	reducción de la degradación de ácidos grasos
fadA	<i>E. coli</i> K12	3-cetoacil-CoA tiolasa	YP_02627	2.3.1.16	reducción de 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	reducción de la degradación de ácidos grasos
fadR	<i>E. coli</i>	proteína reguladora de la transcripción	NP_415705	ninguno	Bloqueo e inversión de la degradación de ácidos grasos

(continuación)

Control de la longitud de la cadena					
	<i>E. coli</i>	tiosterasa: la secuencia líder es los aminoácidos 1-26	POADA1	3.1.2.-, 3.1.1.5	Longitud de cadena de C18
tesA (con o sin secuencia líder)	<i>E. coli</i>	tiosterasa	AAC73596, NP_415027	3.1.2.-, 3.1.1.5	Longitud de la cadena C18:1
tesA (sin secuencia líder)	<i>E. coli</i>	tiosterasa	L109P	3.1.2.-, 3.1.1.5	Longitud de cadena <C18
tesA (mutante de tiosterasa 1 de <i>E. coli</i> complejada con ácido octanoico)	<i>Umbellularia californica</i>	tiosterasa	Q41635	3.1.2.14	Longitud de la cadena C12:0
fatB 1	<i>Cuphea hookeriana</i>	tiosterasa	AAC49269	3.1.2.14	Longitud de la cadena C8:0 - C10:0
fatB2	<i>Cuphea hookeriana</i>	tiosterasa	AAC72881	3.1.2.14	Longitud de la cadena C14:0 - C16:0
fatB3	<i>Cinnamomum camp hora</i>	tiosterasa	Q39473	3.1.2.14	Longitud de la cadena C14:0
fatB	<i>Arabidopsis thaliana</i>	tiosterasa	CAA85388	3.1.2.14	Longitud de la cadena C16:1
fatB 1	<i>Umbellularia californica</i>	tiosterasa	Q41635	3.1.2.14	Longitud de la cadena C12:0
fatA1	<i>Helianthus annuus</i>	tiosterasa	AAL79361	3.1.2.14	Longitud de la cadena C18:1
fatA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	tiosterasa	NP_189147, NP_193041	3.1.2.14	Longitud de la cadena C18:1
fatA	<i>Brassica juncea</i>	tiosterasa	CAC39106	3.1.2.14	Longitud de la cadena C18:1
fatA	<i>Cuphea hookeriana</i>	tiosterasa	AAC72883	3.1.2.14	Longitud de la cadena C18:1
tes	<i>Photobacterium profundum</i>	tiosterasa	YP_130990	3.1.2.14	Longitud de la cadena
tesB	<i>E. coli</i>	tiosterasa	NP_414986	3.1.2.14	Longitud de la cadena
fadM	<i>E. coli</i>	tiosterasa	NP_414977	3.1.2.14	Longitud de la cadena
yciA	<i>E. coli</i>	tiosterasa	NP_415769	3.1.2.14	Longitud de la cadena
ybgC	<i>E. coli</i>	tiosterasa	NP_415264	3.1.2.14	Longitud de la cadena
Control del nivel de saturación					
Sfa	<i>E. coli</i>	Supresor de fabA	AAN79592, AAC44390	ninguno	aumento de ácidos grasos monoinsaturados
fabA	<i>E. coli</i> K12	β-hidroxicanonoil tioéster deshidratasa/isomerasa	NP_415474	4.2.1.60	producción de ácidos grasos insaturados
GnsA	<i>E. coli</i>	supresores de la mutación nula secC	ABD18647.1	ninguno	aumento ésteres de ácidos grasos insaturados
GnsB	<i>E. coli</i>	supresores de la mutación nula secC	AAC74076.1	ninguno	aumento ésteres de ácidos grasos insaturados
fabB	<i>E. coli</i>	3-oxoacil-[acil-proteína portadora] sintasa I	BAA16180	2.3.1.41	modulación de la producción de ácidos grasos insaturados
des	<i>Bacillus subtilis</i>	D5 acil grasa desaturasa	034653	1.14.19	modulación de la producción de ácidos grasos insaturados

(continuación)						
Producción de ésteres						
AT3G51970	<i>Arabidopsis thaliana</i>	alcohol de cadena larga O-grasa-aciltransferasa	NP_190765	2.3.1.26		producción de ésteres
EL01	<i>Pichia angusta</i>	Ácido graso elongasa	BAD98251	2.3.1.-		producción de ácidos grasos de longitud de cadena muy larga
plsC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	aciltransferasa	AAA16514	2.3.1.51		producción de ésteres
DAGAT/DGAT	<i>Arabidopsis thaliana</i>	diacilglicerol aciltransferasa	AAF19262	2.3.1.20		producción de ésteres
hWS	<i>Homo sapiens</i>	acil-CoA alcohol de cera aciltransferasa	AAX48018	2.3.1.20		producción de ésteres
aff1	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	éster de cera sintasa/acil-CoA, diacilglicerol aciltransferasa bifuncional	AAO17391	2.3.1.20		producción de ésteres
ES9	<i>Marinobacter hydrocarbonoclastus</i>	éster de cera sintasa	ABO21021	2.3.1.20		producción de ésteres
mWS	<i>Simmondsia chinensis</i>	éster de cera sintasa	AAD38041	2.3.1.-		producción de ésteres
Producción de alcoholes grasos						
		tiosterasas (véase lo anterior)				aumento de la producción de ácidos grasos/alcoholes grasos
BmFAR	<i>Bombyx mori</i>	FAR (acil-CoA reductasa formadora de alcoholes grasos)	BAC79425	1.1.1.-		conversión de acil-CoA en alcohol graso
acr1	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	acil-CoA reductasa	YP_047869	1.2.1.42		reducción de acil graso-CoA en aldehídos grasos
yqhD	<i>E. coli W3110</i>	alcohol deshidrogenasa	AP_003562	1.1.-.-		reducción de aldehídos grasos en alcoholes grasos; aumento de la producción de alcoholes grasos
airA	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	alcohol deshidrogenasa	CAG70252	1.1.-.-		reducción de aldehídos grasos en alcoholes grasos
BmFAR	<i>Bombyx mori</i>	FAR (acil-CoA reductasa formadora de alcoholes grasos)	BAC79425	1.1.1.-		reducción de acil graso-CoA en alcohol graso
GTNG 1865	<i>Geobacillus thermo denitrificans NG80-2</i>	aldehído deshidrogenasa de cadena larga	YP_001125970	1.2.1.3		reducción de aldehídos grasos en alcoholes grasos
AAR	<i>Synechococcus elongatus</i>	Acil-ACP reductasa	YP_400611	1.2.1.42		reducción de acil graso-ACP/CoA en aldehídos grasos
carB	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	proteína ácido carboxílico reductasa	YP_889972	6.2.1.3, 1.2.1.42		reducción de ácidos grasos en aldehído graso
FadD	<i>E. coli K12</i>	acil-CoA sintetasa	NP_416319	6.2.1.3		activación de los ácidos grasos a acil graso-CoA
atoB	<i>Erwinia carotovora</i>	acetyl-CoA acetiltransferasa	YP_049388	2.3.1.9		producción de butanol
hbd	<i>Butyrivibrio fibrisovens</i>	Beta-hidroxitubiril-CoA deshidrogenasa	BAD51424	1.1.1.157		producción de butanol
CPE0095	<i>Clostridium perfringens</i>	crotonasebutiril-CoA deshidrogenasa	BAB79801	4.2.1.55		producción de butanol

(continuación)

Producción de alcoholes grasos					
bcd	<i>Clostridium beijerinckii</i>	butiril-CoA deshidrogenasa	AAM14583	1.3.99.2	producción de butanol
ALDH	<i>Clostridium beijerinckii</i>	aldehído deshidrogenasa de acilación de la coenzima A	AAT66436	1.2.1.3	producción de butanol
AdhE	<i>E. coli</i> CFT073	aldehído-alcohol deshidrogenasa	AAN80172	1.1.1.1 1.2.1.10	producción de butanol
Producción de éster acetilico de alcohol graso					
		tiosterasas (véase lo anterior)			modificación de la producción
acr1	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	acil-CoA reductasa	YP_047869	1.2.1.42	modificación de la producción
yqhD	<i>E. Coli</i> K12	alcohol deshidrogenasa	AP_003562	1.1.-.-	modificación de la producción
AAT	<i>Fragaria xananassa</i>	alcohol O-acetiltransferasa	AAG13130	2.3.1.84	modificación de la producción
Producción de olefina terminal					
OleT	<i>Jeotgalicoccus</i> sp.	Ácido graso descarboxilasa	HQ709266	1.11.2.4	ácidos grasos descarboxilados
Exportación de productos					
AtMRP5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	asociada a resistencia a múltiples fármacos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_171908	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
AmiS2	<i>Rhodococcus</i> sp.	Transportador de ABC AmiS2	JC5491	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
AtPGP1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	p glucoproteína 1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_181228	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
AcrA	<i>CandidatusProtochlamydiaamoebophila</i> UWE25	supuesta proteína transportadora de salida de múltiples fármacos acrA	CAF23274	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
AcrB	<i>CandidatusProtochlamydiaamoebophila</i> UWE25	probable proteína transportadora de salida de múltiples fármacos, acrB	CAF23275	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
TolC	<i>Francisellatularensis</i> subsp. novicida	Proteína de membrana externa [biogénesis de la envoltura celular,	ABD59001	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
AcrE	<i>Shigella sonnei</i> Ss046	la proteína transmembrana afecta a la formación de septos y a la permeabilidad de la membrana celular	YP_312213	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
AcrF	<i>E. coli</i>	proteína F de resistencia a la acriflavina	P24181	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
tII1619	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> [BP-1]	transportador de salida de múltiples fármacos	NP_682409.1	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
tII0139	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> [BP-1]	transportador de salida de múltiples fármacos	NP_680930.1	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto

(continuación)						
Fermentación						
genes de puntos de control de la replicación						aumento de la eficiencia de la producción
umuD	<i>Shigella sonnei</i> Ss046	ADN polimerasa V, subunidad	YP_310132	3.4.21.-		aumento de la eficiencia de la producción
umuC	<i>E. coli</i>	ADN polimerasa V, subunidad	ABC42261	27.7.7		aumento de la eficiencia de la producción
pntA, pntB	<i>Shigella flexneri</i>	NADH:NADPH transhidrogenasa (subunidades alfa y beta)	P07001, POAB70	1.6.1.2		aumento de la eficiencia de la producción
Otros						
fabK	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	trans-2-enoil-ACP reductasa II	AAF98273	1.3.1.9		Contribución a la biosíntesis de los ácidos grasos
fabL	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	enoil-(acil proteína transportadora) reductasa	AAU39821	1.3.1.9		Contribución a la biosíntesis de los ácidos grasos
fabM	<i>Streptococcus mutans</i>	trans-2, cis-3-decenil-ACP isomerasa	DAA05501	4.2.1.17		Contribución a la biosíntesis de los ácidos grasos

Tabla 7: Ejemplos de amino transferasas/transaminasas (CE 2.6.1) y amina deshidrogenasas (CE 1.4.9, C.E. 1.4.98, CE 1.4.99)

Designación/Nombre	Función	Organismo	N.º de registro
Beta alanina-piruvato transaminasa	Beta-alanina: piruvato transaminasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7	YP_001345604
ygjG	Putrescina aminotransferasa	<i>Escherichia coli</i> MG1655	NP_417544
gabT	5-aminovalerato transaminasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	AAG03655
Lat	L-lisina 6-transaminasa	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	NP_217807
GABA-T	4-aminobutirato transaminasa	<i>Sus scrofa</i>	NP_999428
Aid	Alanina deshidrogenasa	<i>Bacillus subtilis subsp. natto</i> BEST195	BAI86717
gdhA	Glutamato deshidrogenasa (NADPH)	<i>Escherichia coli</i> MG1655	NP_416275
Gdh	Glutamato deshidrogenasa (NADH)	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	AAA25611
L-lisina 6-deshidrogenasa	L-lisina 6-deshidrogenasa	<i>Achromobacter denitrificans</i>	AAZ94428
mauRFBEDACJGMN	Metilamina deshidrogenasa	<i>Paracoccus denitrificans</i>	P52685.1 P29897.2 P29894.1 P29896.2 P29895.2 P22619.2 P22364.1 P22566.2 ABL72797.1 ABL72798.1 AAA86469.1

5 Células hospedadoras microbianas y sus cultivos

Los microorganismos de la divulgación funcionan como células hospedadoras microbianas y abarcan una o más secuencias polinucleotídicas que incluyen un marco de lectura abierto que codifica al menos una enzima biosintética exógena de la presente divulgación. En una realización, se produce una composición de aminas grasas cultivando células hospedadoras que expresan una enzima biosintética exógena (por ejemplo, aminotransferasas/transaminasas o amina deshidrogenasas o amina oxidasas) en presencia de una fuente de carbono en condiciones eficaces para expresar las aminas grasas. En otra realización, se produce una composición de aminas grasas mediante el cultivo de células hospedadoras que expresan una o más de una enzima biosintética exógena (por ejemplo, aminotransferasas/transaminasas o amina deshidrogenasas o amina oxidasas en combinación con una o más enzimas generadoras de aldehídos tales como una CAR (por ejemplo, CarB) y/o una TE (por ejemplo, TesA, 'tesA) en presencia de una fuente de carbono en condiciones eficaces para expresar las aminas grasas. En otra realización, se produce una composición de aminas grasas mediante el cultivo de células hospedadoras que expresan una o más de una enzima biosintética exógena (por ejemplo, aminotransferasas/transaminasas o amina deshidrogenasas o amina oxidasas en combinación con una o más enzimas generadoras de aldehídos tales como una acil-ACP reductasa (AAR) (por ejemplo, de *Synechococcus elongatus* PCC7942) en presencia de una fuente de carbono en condiciones eficaces para expresar las aminas grasas. En otra realización, se produce una composición de aminas grasas mediante el cultivo de células hospedadoras que expresan una o más de una enzima biosintética exógena (por ejemplo, aminotransferasas/transaminasas o amina deshidrogenasas o amina oxidasas en combinación con una o más enzimas generadoras de aldehídos tales como una acil-CoA reductasa (por ejemplo, Acr1) en presencia de una fuente de carbono en condiciones eficaces para expresar las aminas grasas. En otra realización, se produce una composición de aminas grasas mediante el cultivo de células hospedadoras que expresan una o más de una enzima biosintética exógena (por ejemplo, aminotransferasas/transaminasas o amina deshidrogenasas o amina oxidasas en combinación con una o más enzimas generadoras de aldehídos tales como una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) en presencia de una fuente de carbono en condiciones eficaces para expresar las aminas grasas.

La expresión de las enzimas biosintéticas da lugar a la producción de aminas grasas con mayores rendimientos de aminas grasas y/o composiciones de aminas grasas o mezclas de las mismas. En una realización, la expresión de un polipéptido aminotransferasa o amina deshidrogenasa en la célula hospedadora produce un alto rendimiento de aminas grasas o composiciones de las mismas. En otra realización, la expresión de un polipéptido aminotransferasa o amina deshidrogenasa en combinación con una o más enzimas generadoras de aldehídos en la célula hospedadora produce un alto rendimiento de aminas grasas y composiciones de las mismas. En otra realización, la expresión de una amina oxidasa en combinación con una o más enzimas generadoras de aldehídos en la célula hospedadora produce altos rendimientos de aminas grasas y composiciones de las mismas. En algunas realizaciones, las enzimas

biosintéticas se expresan exógenamente en la célula.

Las células hospedadoras o microorganismos de la divulgación pueden incluir cepas hospedadoras o células hospedadoras que están modificadas genéticamente para contener alteraciones con el fin de probar la eficacia de mutaciones o manipulaciones específicas en las actividades enzimáticas (es decir, células o microorganismos recombinantes). Se pueden usar diferentes manipulaciones y alteraciones genéticas opcionales indistintamente de una célula hospedadora a otra, dependiendo de qué vías enzimáticas nativas están presentes en la célula hospedadora original. En una realización, se puede usar una cepa hospedadora para probar la expresión de un polipéptido aminotransferasa o amina deshidrogenasa en combinación con un polipéptido generador de aldehídos. Una cepa hospedadora puede abarcar una serie de alteraciones genéticas para evaluar variables específicas, que incluyen, pero sin limitación, condiciones de cultivo que incluyen 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 hospedadora abarca una eliminación opcional de *fadE* y *fhuA*. La acil-CoA deshidrogenasa (FadE) es una enzima que es importante para metabolizar los ácidos grasos. Cataliza la segunda etapa en la utilización de los ácidos grasos (beta-oxidación), que es el proceso de romper las cadenas largas de ácidos grasos (acil-CoA) en moléculas de acetyl-CoA. De manera más específica, la segunda etapa del ciclo de β -oxidación de la degradación de los ácidos grasos en las bacterias es la oxidación de acil-CoA a 2-enoil-CoA, que es catalizada por FadE. Cuando *E. coli* carece de FadE, no puede crecer en los ácidos grasos como fuente de carbono, pero puede crecer en el acetato. La incapacidad para utilizar ácidos grasos de cualquier longitud de cadena coincide con el fenotipo presentado de las cepas de *fadE*, es decir, cepas mutantes de *fadE* donde se interrumpe la función de FadE. El gen *fadE* se puede desactivar o atenuar opcionalmente para garantizar que las acil-CoA, que pueden ser productos intermedios en una vía de aminas grasas, se puedan acumular en la célula de modo que todas las acil-CoA se puedan convertir eficazmente en aminas grasas. Sin embargo, la atenuación de *fadE* es opcional cuando se usa el azúcar como fuente de carbono, ya que, en dichas condiciones, la expresión de FadE es probablemente inhibida y, por lo tanto, FadE solo puede estar presente en pequeñas cantidades y no puede competir eficazmente con la éster sintasa por los sustratos de acil-CoA. La FadE se inhibe debido a la represión catabólica. *E. coli* y otros microbios prefieren consumir azúcar que ácidos grasos, entonces, cuando ambas fuentes están disponibles, el azúcar se consume primero reprimiendo el regulón de *fad* (véase D. Clark, *J Bacteriol.* (1981) 148(2):521-6)). Además, La ausencia de azúcares induce la expresión de FadE. Los productos intermedios de acil-CoA podrían perderse en la vía de oxidación beta, ya que las proteínas expresadas por el regulón de *fad* (incluyendo *FadE*) están reguladas y competirán eficazmente por las acil-CoA. Por consiguiente, puede ser beneficioso en ciertas circunstancias tener el gen *fadE* desactivado o atenuado. Dado que muchas fuentes de carbono están basadas en carbohidratos, es opcional atenuar *FadE*. El gen *fhuA* codifica la proteína TonA, que es un transportador y receptor acoplado a energía en la membrana externa de *E. coli* (V. Braun (2009) *J Bacteriol.* 191(11):3431-3436). Su eliminación es opcional. La eliminación de *fhuA* permite que la célula se vuelva más resistente al ataque de fagos, lo que puede ser beneficioso en ciertas condiciones de fermentación. Por consiguiente, puede ser deseable eliminar *fhuA* en una célula hospedadora que probablemente esté sujeta a una posible contaminación durante los procesos de fermentación.

En otra realización, la cepa hospedadora (anteriormente citado) también puede abarcar la sobreexpresión opcional de uno o más de los siguientes genes, incluyendo *fadR*, *fabA*, *fabD*, *fabG*, *fabH*, *fabV* y/o *fabF*. Los ejemplos de dichos 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 cholera* (YP_001217283), y *fabF* de *Clostridium acetobutylicum* (NP_350156). La sobreexpresión opcional de uno o más de estos genes, que codifican enzimas y reguladores en la biosíntesis de ácidos grasos, puede servir para aumentar el título de los compuestos derivados de ácidos grasos en diferentes condiciones de cultivo.

En otra realización, se usan cepas de *E. coli* como células hospedadoras para la producción de aminas grasas. De manera similar, estas células hospedadoras pueden proporcionar una sobreexpresión opcional de uno o más genes de biosíntesis (es decir, genes que codifican enzimas y reguladores de la biosíntesis de ácidos grasos) que pueden aumentar el título de compuestos derivados de ácidos grasos tales como las aminas grasas en diferentes condiciones de cultivo, que incluyen, pero sin limitación, *fadR*, *fabA*, *fabD*, *fabG*, *fabH*, *fabV* y/o *fabF*. Los ejemplos de modificaciones genéticas incluyen *fadR* de *Escherichia coli*, *fabA* de *Salmonella typhimurium* (NP_460041), *fabD* de *Salmonella typhimurium* (NP_460164), *fabG* de *Salmonella typhimurium* (NP_460165), *fabH* de *Salmonella typhimurium* (NP_460163), *fabV* de *Vibrio cholera* (YP_001217283), y *fabF* de *Clostridium acetobutylicum* (NP_350156).

En algunas realizaciones, las células hospedadoras o los microorganismos que se usan para expresar las enzimas biosintéticas (por ejemplo, aminotransferasas o amina deshidrogenasas en combinación con enzimas generadoras de aldehídos tales como CAR y/o TE y/o AAR y/o PPTasa) pueden expresar genes que abarcan ciertas actividades enzimáticas que pueden aumentar la producción de uno o más derivados de ácidos grasos particulares, tales como los ésteres grasos, alcoholes grasos, aminas grasas, aldehídos grasos, derivados de ácidos grasos bifuncionales, diácidos y similares. En una realización, la célula hospedadora tiene actividad tioesterasa (C.E. 3.1.2.* o C.E. 3.1. 2.14 o C.E. 3.1.1.5) para la producción de ácidos grasos que se puede aumentar sobreexpresando el gen. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad éster sintasa (C.E. 2.3.1.75) para la producción de ésteres grasos.

En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad acil-ACP reductasa (AAR) (C.E. 1.2.1.80) y/o actividad alcohol deshidrogenasa (C.E. 1.1.1.1.) y/o actividad alcohol graso acil-CoA reductasa (FAR) (C.E. 1.1.1.*) y/o actividad ácido carboxílico reductasa (CAR) (CE 1.2.99.6) para la producción de alcoholes grasos. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad acil-ACP reductasa (AAR) (C.E. 1.2.1.80) para la producción de aldehídos grasos. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad acil-ACP reductasa (AAR) (C.E. 1.2.1.80) y actividad descarboxilasa para la producción de alcanos y alquenos. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad acil-CoA reductasa (C.E. 1.2.1.50), actividad acil-CoA sintasa (FadD) (C.E. 2.3.1.86) y actividad tioesterasa (C.E. 3.1.2.* o C.E. 3.1. 2.14 o C.E. 3.1.1.5) para la producción de alcoholes grasos. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad éster sintasa (C.E. 2.3.1.75), actividad acil-CoA sintasa (FadD) (C.E. 2.3.1.86) y actividad tioesterasa (C.E. 3.1.2.* o C.E. 3.1. 2.14 o C.E. 3.1.1.5) para la producción de ésteres grasos. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad OleA para la producción de cetonas. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad OleBCD para la producción de olefinas internas. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad acil-ACP reductasa (AAR) (C.E. 1.2.1.80) y actividad alcohol deshidrogenasa (C.E. 1.1.1.1.) para la producción de alcoholes grasos. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad tioesterasa (C.E. 3.1.2.* o C.E. 3.1. 2.14 o C.E. 3.1.1.5) y actividad descarboxilasa para formación de olefinas terminales. La expresión de actividades enzimáticas en microorganismos y células microbianas se enseña en los números de patente de EE.UU. n.º 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 otras realizaciones, Las células hospedadoras o los microorganismos que se usan para expresar las enzimas biosintéticas (por ejemplo, aminotransferasas o amina deshidrogenasas en combinación con enzimas generadoras de aldehídos tales como CAR y/o TE y/o AAR y/o PPTasa) incluirán ciertas actividades enzimáticas nativas que son reguladas al alza o sobreexpresadas para producir uno o más derivados de ácidos grasos particulares, tales como aminas grasas. En una realización, la célula hospedadora tiene actividad tioesterasa nativa (C.E. 3.1.2.* o C.E. 3.1. 2.14 o C.E. 3.1.1.5) para la producción de ácidos grasos que se puede aumentar sobreexpresando el gen de tioesterasa.

La presente divulgación incluye cepas o microorganismos hospedadores que expresan genes que codifican las enzimas biosintéticas (por ejemplo, aminotransferasas o amina deshidrogenasas en combinación con enzimas generadoras de aldehído tales como CAR y/o TES y/o AAR y/o PPTasa). En una realización, al menos una enzima biosintética se expresa de manera exógena en la célula hospedadora. Por ejemplo, la célula hospedadora puede expresar una aminotransferasa exógena para producir aminas grasas. En otra realización, se expresan exógenamente una o más enzimas biosintéticas en la célula hospedadora. Por ejemplo, la célula hospedadora puede expresar una aminotransferasa exógena y una ácido carboxílico reductasa (CAR) exógena para producir aminas grasas. En otra realización más, se expresan exógenamente una o más enzimas biosintéticas en la célula hospedadora en combinación con una o más enzimas biosintéticas que se sobreexpresan en la célula hospedadora. Por ejemplo, la célula hospedadora puede expresar una aminotransferasa exógena y una ácido carboxílico reductasa (CAR) exógena en combinación con una tioesterasa exógena y/o sobreexpresada para producir aminas grasas. La tioesterasa puede ser una tioesterasa expresada exógenamente. Como alternativa, la tioesterasa puede ser una tioesterasa nativa que se sobreexpresa o se regula al alza en la transcripción e en la célula a través de un promotor particularmente potente u otras técnicas de biología molecular que son bien conocidas por los expertos en la materia. Las células hospedadoras recombinantes producen aminas grasas, y composiciones y mezclas de las mismas. Las aminas grasas normalmente se extraen del medio de cultivo y/o se aíslan de las células hospedadoras. En una realización, las aminas grasas se extraen del medio de cultivo (extracelulares). En otra realización, las aminas grasas se aíslan de las células hospedadoras (intracelulares). En otra realización, las aminas grasas se extraen del medio de cultivo y se aíslan de las células hospedadoras. La composición de aminas grasas producida por una célula hospedadora puede analizarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, GC-FID, para determinar la distribución de determinadas aminas grasas, así como las longitudes de cadena y el grado de saturación de los componentes de la composición de aminas grasas.

Los ejemplos de células hospedadoras que funcionan como microorganismos (por ejemplo, células microbianas), incluyen, pero sin limitación, células del género *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Zymomonas*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Chryso sporium*, *Saccharomyces*, *Stenotrophomonas*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia* o *Streptomyces*. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula bacteriana Gram-positiva. En otras realizaciones, la célula hospedadora es una célula bacteriana Gram-negativa. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de *E. coli*. En alguna realización, la célula hospedadora es un linfocito B de *E. coli*, una célula C de *E. coli*, una célula K de *E. coli* o una célula W de *E. coli*. En otras realizaciones, la célula hospedadora 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 más, la célula hospedadora 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*. En otras realizaciones más, la célula hospedadora es una célula de *Streptomyces lividans* o una célula de *Streptomyces murinus*. En otras realizaciones más, la célula hospedadora es una célula de *Actinomycetes*. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de *Saccharomyces cerevisiae*.

En otras realizaciones, la célula hospedadora es una célula eucariota de una planta, algas, cianobacteria, bacteria verde de azufre verde, bacteria verde sin azufre, bacteria púrpura de azufre, bacteria púrpura sin azufre, extremófilo, levadura, hongo, un organismo diseñado de los mismos o un organismo sintético. En algunas realizaciones, la célula hospedadora depende de la luz o fija el carbono. En algunas realizaciones, la célula hospedadora tiene actividad autótrofa.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora tiene actividad fotoautótrofa, tal como en presencia de luz. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es heterótrofa o mixotrófica en ausencia de luz. En ciertas realizaciones, la célula hospedadora 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*, *Chlorobium tepidum*, *Chlorojlexus auranticus*, *Chromatium vinosum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium thermocellum*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pseudomonas fluorescens*, o *Zymomonas mobilis*.

En una realización particular, la célula microbiana es de una cianobacteria que incluye, pero sin limitación, *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Cyanothece* y *Nostoc punctiforme*. En otra realización, la célula microbiana es de una especie cianobacteriana específica que incluye, pero sin limitación, *Synechococcus elongatus* PCC7942, *Synechocystis sp. PCC6803* y *Synechococcus sp. PCC7001*.

Métodos de creación de células hospedadoras recombinantes y cultivos

Se pueden usar diferentes métodos bien conocidos en la técnica para diseñar células hospedadoras para producir aminos grasas y/o composiciones o mezclas de aminos grasas. Los métodos pueden incluir el uso de vectores, preferentemente, vectores de expresión, que incluyen un ácido nucleico que codifica la enzima biosintética (por ejemplo, aminotransferasas o amina deshidrogenasas solas o en combinación con enzimas generadoras de aldehídos tales como CAR y/o TE y/o AAR y/o PPTasa), como se describe en el presente documento. Los expertos en la materia apreciarán que se puede usar una variedad de vectores víricos y no víricos en los métodos descritos en el presente documento.

En alguna realización de la presente divulgación, un título superior de aminos grasas en una determinada composición es un título más alto de un determinado tipo de amina grasa o una combinación de aminos grasas producida por un cultivo de células hospedadoras recombinantes en relación con el título de la misma amina de ácido graso o combinación de aminos grasas producida mediante un cultivo de control de una célula hospedadora de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, se proporcionan polipéptidos biosintéticos (por ejemplo, aminotransferasas o amina deshidrogenasas solas o en combinación con polipéptidos de enzimas generadoras de aldehídos tales como CAR y/o TE y/o AAR y/o PPTasa) a la célula hospedadora a través de un vector recombinante, que puede incluir un promotor unido operativamente a una secuencia polinucleotídica específica que codifica un polipéptido biosintético específico. En ciertas realizaciones, el promotor es un promotor regulado por el desarrollo, un promotor específico del orgánulo, un promotor específico del tejido, un promotor inducible, un promotor constitutivo o un promotor específico de la célula. El vector recombinante normalmente comprende al menos una secuencia seleccionada de una secuencia de control de la expresión acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica; un marcador de selección acoplado operativamente a la secuencia polinucleotídica; una secuencia marcadora acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica; un resto de purificación acoplado operativamente a la secuencia polinucleotídica; una secuencia de secreción acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica; y una secuencia de dirección acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica. Las secuencias polinucleotídicas, que comprende marcos abiertos de lectura que codifican proteínas, y se pueden integrar secuencias reguladoras unidas operativamente en un cromosoma de las células hospedadoras recombinantes, incorporarse en uno o más sistemas de expresión de plásmidos residentes en las células hospedadora recombinantes, o ambas cosas.

Los vectores de expresión incluyen una secuencia polinucleotídica como se describe en el presente documento en una forma adecuada para la expresión de la secuencia polinucleotídica en una célula hospedadora. Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se vaya a transformar, el nivel de expresión del polipéptido deseado, etc. Los vectores de expresión descritos en el presente documento pueden introducirse en células hospedadoras para producir polipéptidos, incluyendo polipéptidos de fusión, codificados por las secuencias polinucleotídicas como se describe en el presente documento. La expresión de genes que codifican polipéptidos en procariontes, por ejemplo, *E. coli*, se lleva a cabo con mayor frecuencia con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de polipéptidos de fusión o no de fusión. Los sistemas de expresión adecuados para las células tanto procariontes como

eucariotas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)). En ciertas realizaciones, una secuencia polinucleotídica de la divulgación está unida operativamente a un promotor derivado del bacteriófago T5. En una realización, la célula hospedadora es una célula de levadura. En esta realización, el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Los vectores pueden introducirse en células procariotas o eucariotas a través de una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico foráneo (por ejemplo, ADN) en una célula hospedadora. Se pueden encontrar métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedadoras en, por ejemplo, Sambrook *et al.* (anteriormente citado).

Para la transformación estable de células bacterianas, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transformación que se usen, solo una pequeña fracción de células absorberá y replicará el vector de expresión. Para identificar y seleccionar estos transformantes, se puede introducir un gen que codifique un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a un antibiótico) en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos tales como, pero sin limitación, ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Los ácidos nucleicos que codifican un marcador seleccionable pueden introducirse en una célula hospedadora en el mismo vector que el que codifica un polipéptido descrito en el presente documento o pueden introducirse en un vector separado. Las células transformadas de manera estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse según el crecimiento en presencia de un fármaco de selección apropiado.

Cultivo y fermentación de células hospedadoras recombinantes

Como se usa en el presente documento, el término "fermentación" se refiere, en general, a la conversión de materias orgánicas en sustancias diana por las células hospedadoras, por ejemplo, la conversión de una fuente de carbono por células hospedadoras recombinantes en aminas grasas o derivados de las mismas mediante la propagación de un cultivo de las células hospedadoras recombinantes en un medio que comprende la fuente de carbono. Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones permisivas para la producción" significa cualquier condición que permita que una célula hospedadora produzca un producto deseado, tal como una amina grasa, o una composición o mezcla de aminas grasas. De manera similar, la expresión "condiciones en las que se expresa la secuencia polinucleotídica de un vector" significa cualquier condición que permita que una célula hospedadora sintetice un polipéptido. Las condiciones adecuadas incluyen, por ejemplo, las condiciones de fermentación. Las condiciones de fermentación pueden comprender muchos parámetros, incluyendo, pero sin limitación, intervalos de temperatura, niveles de aireación, tasas de alimentación y composición de los medios. Cada una de estas condiciones, de forma individual y en combinación, permite que la célula hospedadora crezca. La fermentación puede ser aeróbica, anaeróbica o variaciones de las mismas (tal como microaeróbica). Los medios de cultivo ilustrativos incluyen caldos o geles. En general, el medio incluye una fuente de carbono que puede ser metabolizada directamente por una célula hospedadora. Además, se pueden usar enzimas en el medio para facilitar la movilización (por ejemplo, la despolimerización del almidón o de la celulosa en azúcares fermentables) y el posterior metabolismo de la fuente de carbono.

Para la producción a pequeña escala, las células hospedadoras diseñadas se pueden cultivar en lotes de, por ejemplo, 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 a expresar una secuencia polinucleotídica deseada, tal como una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido aminotransferasa/transaminasa o amina deshidrogenasa o amina oxidasa solo o en combinación con una secuencia polinucleotídica generadora de aldehído que codifica un polipéptido CAR y/o TE y/o AAR y/o PPtasa. Para la producción a gran escala, las células hospedadoras diseñadas pueden cultivarse en cultivos que tienen lotes de volumen de aproximadamente 10 l, 100 l, 1000 l, 10.000 l, 100.000 l, 1.000.000 l o superior; fermentarse; e inducirse a expresar una secuencia polinucleotídica deseada. En una realización preferida, las aminas grasas y las composiciones derivadas de aminas grasas descritas en el presente documento se encuentran en el entorno extracelular del cultivo de células hospedadoras recombinantes, y pueden aislarse fácilmente del medio de cultivo. En otra realización, las aminas grasas y las composiciones derivadas de aminas grasas descritas en el presente documento se encuentran en el entorno intracelular de las células hospedadoras recombinantes cultivadas en cultivo. Una amina grasa o un derivado de la misma puede ser secretada por la célula hospedadora recombinante, transportada al entorno extracelular o transferida pasivamente al entorno extracelular del cultivo de células hospedadoras recombinantes. La composición de aminas grasas se puede aislar de un cultivo de células hospedadoras recombinantes usando métodos de rutina conocidos en la técnica.

Cribado de células hospedadoras recombinantes

En una realización de la presente divulgación, la actividad de un polipéptido aminotransferasa/transaminasa o amina deshidrogenasa o amina oxidasa se determina mediante el cultivo de células hospedadoras recombinantes que abarcan una o más secuencias de polipéptido aminotransferasa/transaminasa o amina deshidrogenasa o amina oxidasa (opcionalmente, en combinación con uno o más polipéptidos generadores de aldehído), seguido de un cribado para identificar las características de, por ejemplo, composiciones de aminas grasas producidas por las células hospedadoras recombinantes; por ejemplo, el título, el rendimiento y la productividad de aminas grasas, y composiciones y mezclas de las mismas. En otra realización, la actividad de un polipéptido

aminotransferasa/transaminasa o amina deshidrogenasa o amina oxidasa se determina cultivando células hospedadoras recombinantes que abarcan una o más secuencias polinucleotídicas de aminotransferasa/transaminasa o amina deshidrogenasa o amina oxidasa, seguido de un cribado para identificar las características de, por ejemplo, composiciones de aminas grasas producidas por las células hospedadoras recombinantes; por ejemplo: el título, el rendimiento y la productividad de aminas grasas, y composiciones y mezclas de las mismas. Los polipéptidos aminotransferasa/transaminasa o amina deshidrogenasa o amina oxidasa y sus fragmentos pueden analizarse para determinar su actividad en una célula y/o la mejora/el aumento de la producción de compuestos derivados de aminas usando métodos de rutina conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pone en contacto un polipéptido aminotransferasa/transaminasa o amina deshidrogenasa o amina oxidasa, o un fragmento del mismo, con un sustrato *in vivo* (por ejemplo, un aldehído graso producido mediante la expresión conjunta de CAR y/o TE y/o AAR y/o PPTasa en la célula) en condiciones que permitan que el polipéptido funcione y lleve a cabo su actividad enzimática. Se puede medir una disminución del nivel del sustrato o un aumento del nivel de una amina grasa o composición de aminas grasas para determinar la actividad de la aminotransferasa/transaminasa o amina deshidrogenasa o amina oxidasa. Como alternativa, se puede alimentar una célula que expresa un polipéptido aminotransferasa/transaminasa o amina deshidrogenasa o amina oxidasa, o un fragmento del mismo, con un sustrato de aldehído graso en condiciones que sigan permitiendo que el polipéptido funcione y lleve a cabo su actividad enzimática. Después, se puede medir un aumento del nivel de una amina grasa o composición de aminas grasas para determinar la actividad de la aminotransferasa/transaminasa o amina deshidrogenasa o amina oxidasa.

20 Productos derivados de células hospedadoras recombinantes

Como se usa en el presente documento, "fracción de carbono moderno" o fM tiene el mismo significado que lo definido por los materiales de referencia del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) (SRM 4990B y 4990C, conocidos como estándares de ácidos oxálicos HOxI y HOxII, respectivamente. La definición fundamental se refiere a 0,95 veces la proporción de isótopos de $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ de HOxI (denominada AD 1950). Esto es más o menos equivalente a la madera de antes de la revolución industrial corregida para la desintegración. Para la biosfera viva actual (materia vegetal), fM es de aproximadamente 1,1.

Los bioproductos (por ejemplo, las composiciones de aminas grasas producidas de acuerdo con la presente divulgación) que comprenden compuestos orgánicos producidos biológicamente, y en particular, las composiciones de aminas grasas producidas usando la vía biosintética del presente documento, han sido producidos a partir de fuentes renovables y, por tanto, son nuevas composiciones de materia. Estos nuevos bioproductos se pueden distinguir de los compuestos orgánicos derivados del carbono petroquímico basándose en la huella isotópica del carbono doble o la datación por ^{14}C . Además, La fuente específica de carbono de origen biológico (por ejemplo, glucosa frente a glicerol, etc.) puede determinarse mediante la huella isotópica del carbono doble (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n.º 7.169.588). La capacidad de distinguir los bioproductos de los compuestos orgánicos a base de petróleo es beneficiosa para rastrear estos materiales en el comercio. Por ejemplo, los compuestos orgánicos o productos químicos que comprenden perfiles de isótopos de carbono tanto biológicos como basados en el petróleo pueden distinguirse de los compuestos orgánicos y químicos fabricados solo de materiales a base de petróleo. Por lo tanto, los bioproductos producidos en el presente documento pueden ser seguidos o rastreados en el comercio basándose en su perfil único de isótopos de carbono. Los bioproductos se pueden distinguir de los compuestos orgánicos a base de petróleo mediante la comparación de la proporción estable de isótopos de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) en cada muestra. La proporción de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de un bioproducto dado es una consecuencia de la proporción de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en el dióxido de carbono atmosférico en el momento en que se fija el dióxido de carbono. También refleja la vía metabólica exacta. También se producen variaciones regionales. El petróleo, las plantas C3 (de hoja ancha), las plantas C4 (hierbas) y los carbonatos marinos, muestran diferencias significativas en la $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y en los valores correspondientes de $\delta^{13}\text{C}$. Las plantas tanto C4 como C3 presentan un intervalo de proporciones isotópicas $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, 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.* (1977) "Radiocarbon" 19:355). El carbón y el petróleo se encuentran generalmente en este último intervalo.

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

Se ha desarrollado una serie de MR alternativos en cooperación con el IAEA (*International Atomic Energy Agency*, organismo internacional de energía atómica), USGS, el NIST (*National Institute of Standards and Technology*, instituto nacional de estándares y tecnología) y con otros laboratorios de isótopos internacionales seleccionados. La anotación para las desviaciones por mil con respecto a PDB es $\delta^{13}\text{C}$. Las mediciones se realizan en CO_2 mediante espectrometría de masas de proporciones isotópicas (IRMS, *Isotope-ratio mass spectrometry*) de alta resolución, en iones moleculares de masas 44, 45 y 46. Las composiciones descritas en el presente documento incluyen las composiciones de aminas grasas y los productos producidos mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Específicamente, la composición o el producto de aminas grasas puede tener un $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente -28 o superior, aproximadamente -27 o superior, -20 o superior, -18 o superior, -15 o superior, -13 o superior, -10 o superior, o -8 o superior. Por ejemplo, la composición o el producto de aminas grasas puede tener un $\delta^{13}\text{C}$ 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 el producto de aminas grasas

puede tener un $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente -10, -11, -12 o -12,3. Las composiciones y los productos de aminas grasas producidos de acuerdo con la divulgación del presente documento también se pueden distinguir de los compuestos orgánicos basados en petróleo comparando la cantidad de ^{14}C en cada compuesto. Como el ^{14}C tiene una semivida nuclear de 5.730 años, los combustibles a base de petróleo que contienen carbono "más antiguo" pueden distinguirse de las composiciones de aminas grasas y de los bioproductos que contienen carbono "más nuevo" (véase, por ejemplo, Currie, "Source Apportionment of Atmospheric Particles", Characterization of Environmental Particles, J. Buffle y 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 de 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, el ^{14}C ha adquirido una segunda característica temporal geoquímica. Su concentración en el CO_2 atmosférico y, por lo tanto, en la biosfera viva, aproximadamente se ha duplicado en el máximo de las pruebas nucleares, a mediados de la década de los 60 del siglo pasado. Desde entonces, ha vuelto gradualmente a la tasa de isótopos inicial cosmogénica (atmosférica) en estado estacionario ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$) de aproximadamente $1,2 \times 10^{-12}$, con una "semivida" de relajación aproximada de 7-10 años. Esta última semivida no debe tomarse literalmente; si no que, debe usarse la función de entrada nuclear atmosférica/desintegración detallada para trazar la variación del ^{14}C atmosférico y biosférico desde el inicio de la era nuclear. Es esta última característica temporal del ^{14}C biosférico la que mantiene la promesa de la datación anual del carbono biosférico reciente. El ^{14}C puede medirse mediante espectrometría de masas con acelerador (EMA), dándose los resultados en unidades de "fracción de carbono moderno" (fM). Las composiciones y los productos de aminas grasas 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 medida de ^{14}C se conoce como el porcentaje de carbono moderno (pMC). Para un arqueólogo o geólogo que usa dataciones con ^{14}C , AD 1950 es igual a "cero años". Esto también representa un pMC de 100. La "bomba de carbono" en la atmósfera alcanzó casi el doble del nivel normal en 1963 en el máximo de las armas termonucleares. Su distribución dentro de la atmósfera se ha aproximado desde su aparición, mostrando valores superiores a pMC de 100 para plantas y animales que viven desde AD 1950. Ha disminuido gradualmente con el tiempo y el valor actual está cerca de un pMC de 107,5. Esto significa que un material de biomasa nuevo, tal como de maíz, daría un distintivo de ^{14}C de pMC cercano a 107,5. Los compuestos a base de petróleo tendrán un valor de pMC de cero. La combinación de carbono fósil con carbono actual dará lugar a una dilución del contenido actual de pMC. Suponiendo que un pMC de 107,5 representa el contenido de ^{14}C de los materiales de biomasa actuales y un pMC de 0 representa el contenido de ^{14}C de los productos derivados del petróleo, el valor medido de pMC para ese material reflejará las proporciones de los dos tipos de componentes. Por ejemplo, un material derivado al 100 % de la soja actual daría un distintivo de radiocarbono de un valor de pMC cercano a 107,5. Si ese material se diluyera al 50 % con productos a base de petróleo, daría un distintivo de radiocarbono de un pMC de aproximadamente 54. Se deriva un contenido de carbono con base biológica asignando el "100 %" a un pMC de 107,5 y el "0 %" a un pMC de 0. Por ejemplo, una muestra que mide un pMC de 99 dará un contenido de carbono con base biológica equivalente del 93 %. Este valor se conoce como el resultado medio de carbono con base biológica, y supone que todos los componentes de dentro del material analizado se originaron a partir del material biológico actual o del material a base de petróleo. Un bioproducto que comprende una o más aminas grasas 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 o 100. En otros casos, una composición de ésteres grasos descrita en el presente documento puede tener un pMC de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100; de aproximadamente 60 y aproximadamente 100; de aproximadamente 70 y aproximadamente 100; de aproximadamente 80 y aproximadamente 100; de aproximadamente 85 y aproximadamente 100; de aproximadamente 87 y aproximadamente 98; o de aproximadamente 90 y aproximadamente 95. En otros casos más, una composición de aminas grasas descrita en el presente documento puede tener un pMC de aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94 o 94,2.

Composiciones de aminas grasas

La estructura de las aminas grasas se basa en uno o más grupos alquilo alifáticos C8 a C24 ($R = \text{C}_8\text{-C}_{24}$) y una o más aminas (N) o amonios cuaternarios. La cadena alifática de alquilo es fuertemente hidrófoba, mientras que la amina es hidrófila. Por consiguiente, la amina grasa tiene una naturaleza anfífila como molécula (que contiene entidades hidrófobas e hidrófilas). Cuando se disuelven en agua u otros disolventes, las aminas grasas forman micelas, porque el disolvente repele una parte de la molécula. Como tales, las aminas grasas son compuestos catiónicos tensioactivos (es decir, tensioactivos que se caracterizan por su fracción hidrófila) que están adheridos fuertemente a las superficies mediante enlaces físicos o químicos, modificando así las propiedades de la superficie. Las propiedades tensioactivas de las aminas grasas son emulsificación, humectación, formación de espuma y espesamiento. Además, las aminas grasas tienen propiedades adsorbentes que incluyen suavizado, adhesión, lubricación, inhibición de la corrosión, propiedades antiestáticas e hidrofobación; así como propiedades reactivas que incluyen intercambio iónico, decoloración y floculación.

La presente divulgación contempla la producción de aminas grasas y derivados de las mismas que son útiles en muchas aplicaciones industriales, incluso como productos intermedios químicos, como adyuvantes de procesamiento y como componentes funcionales en numerosas formulaciones. Los ejemplos de aminas grasas incluyen las producidas en las presentes células hospedadoras y las derivadas de precursores de aldehídos grasos como se describe en el presente documento. Las aminas grasas y/o las composiciones o mezclas de aminas grasas que se producen en el presente documento pueden usarse, individualmente, o en combinaciones o mezclas adecuadas. Las aminas grasas de la presente divulgación encuentran uso en aplicaciones industriales que incluyen, pero sin limitación, detergentes (limpiadores, espesantes, suavizantes de productos textiles); detergentes líquidos para la vajilla; agentes espumantes y humectantes; desemulsionantes (productos farmacéuticos, papel, petróleo); emulsionantes (disolventes, limpiadores disolventes, siliconas, aceite, cera de pulir, tratamiento de cuero, triglicéridos); tensioactivos; champús y acondicionadores; agentes antiestáticos en la industria textil y de los plásticos (productos textiles, polímeros, electrónica, aerosoles electrostáticos, papel); aditivos de combustible; lubricantes y aditivos lubricantes (espesantes de grasa, aceite de motor); espesantes de pintura; procesamiento de minerales; fabricación de papel; producción y refinación de petróleo (aditivos de petróleo, productos químicos para yacimientos petrolíferos); emulsionantes asfálticos; inhibidores de la corrosión (ácido, tratamiento acuoso, trabajos de metal, petróleo); aditivos de gasolina y de aceite combustible; agentes de flotación; agentes de curado epoxi; y productos químicos agrícolas y herbicidas. En algunos aspectos, la divulgación se refiere a un método de producción de una composición de aminas grasas que incluye aminas grasas que están hechas de una mezcla de cadenas de carbono o una longitud de cadena específica que varía de aproximadamente C8 a aproximadamente C24. En un aspecto particular, la divulgación se refiere a un método de producción de una composición de aminas grasas que comprende aminas grasas primarias (RNH₂). En otro aspecto, también se contemplan las aminas grasas secundarias (R₂NH) y/o las aminas grasas terciarias (trialquilo (R₃N), dialquilmetilo (R₂NCH₃) y/o alquildimetilo (RN(CH₃)₂)). En otro aspecto, La presente divulgación abarca la producción de aminas primarias que pueden convertirse en los componentes básicos primarios para muchos productos industriales, así como proporcionar el material de origen para numerosos derivados químicos tales como poliaminas, aminas etoxiladas, diaminas etoxiladas, aminas propoxiladas, sales de amina, óxidos de amina, amidas, amidas etoxiladas y nitrilos. En aspectos relacionados, el método abarca un hospedador de producción modificado genéticamente adecuado para fabricar aminas grasas y composiciones de aminas grasas que incluyen, pero sin limitación, aminas primarias que son adecuadas para producir derivados químicos y composiciones de los mismos que incluyen, pero sin limitación, poliaminas, aminas etoxiladas, diaminas etoxiladas, aminas propoxiladas, sales de amina, óxidos de amina, amidas, amidas etoxiladas y nitrilos.

En general, la amina grasa o la composición de aminas grasas de la presente divulgación se aísla del entorno extracelular de la célula hospedadora. En algunas realizaciones, la amina grasa o la composición de aminas grasas es secretada espontáneamente, parcial o completamente, desde la célula hospedadora. En realizaciones alternativas, la amina grasa o la composición de aminas grasas es transportada al ambiente extracelular, opcionalmente, con ayuda de una o más proteínas transportadoras. En otras realizaciones más, la amina grasa o la composición de aminas grasas es transportada pasivamente al ambiente extracelular.

Los métodos pueden producir aminas grasas, incluyendo una amina grasa C8-C24. En algunas realizaciones, la amina grasa incluye una amina grasa C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23 y/o C24. En otras realizaciones, la composición de amina grasa incluye una o más de una amina grasa C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17 y C18. En otras realizaciones más, la composición de amina grasa incluye aminas grasas C12, C14, C16 y C18; aminas grasas C12, C14 y C16; aminas grasas C14, C16 y C18; o aminas grasas C12 y C14. El grupo R de una amina grasa, puede ser una cadena lineal o una cadena ramificada. Las cadenas ramificadas pueden tener más de un punto de ramificación y pueden incluir ramificaciones cíclicas. En algunas realizaciones, la amina grasa ramificada es una amina grasa ramificada C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23 o C24. El grupo R de una amina grasa ramificada o no ramificada puede estar saturado o insaturado. Si está insaturado, el grupo R puede tener uno o más de un punto de insaturación. En algunas realizaciones, la amina grasa insaturada es una amina grasa monoinsaturada. En ciertas realizaciones, la amina grasa insaturada es una amina grasa insaturada C6:1, C7:1, C8:1, C9:1, C10:1, C11:1, C12:1, C13:1, C14:1, C15:1, C16:1, C17:1, C18:1, C19:1, C20:1, C21:1, C22:1, C23:1 o C24:1. En ciertas realizaciones, la amina grasa insaturada es una amina grasa insaturada C10:1, C12:1, C14:1, C16:1 o C18:1. En otras realizaciones, la amina grasa insaturada está insaturada en la posición omega-7. En ciertas realizaciones, la amina grasa insaturada tiene un doble enlace *cis*.

En una realización preferida, la amina grasa es una amina primaria que incluye, pero sin limitación, octilamina, decilamina, dodecilamina, tetradecilamina, hexadecilamina, octadecilamina, estearilamina y oleilamina. En otra realización, la amina grasa es una amina secundaria, por ejemplo, 1-dodecilamina (laurilamina), 1-hexadecilamina (palmitilamina), 1-octadecilamina (estearilamina) y similares. En otra realización, la amina grasa es una amina terciaria, por ejemplo, 1-octadecen-9-ilamina (oleilamina) y similares. Otros ejemplos de aminas grasas son las alquildimetilaminas, que incluyen, pero sin limitación, octildimetilamina, decildimetilamina, dodecildimetilamina, tetradecildimetilamina, hexadecildimetilamina, octadecildimetilamina y oleildimetilamina. Otros ejemplos más de aminas grasas son dialquilmetilaminas que incluyen, pero sin limitación, dioctilmetilamina, didecilmetilamina, didodecilmetilamina, ditetradecilmetilamina, dihexadecilmetilamina y dioctadecilmetilamina. La divulgación contempla además aminas grasas producidas por las células hospedadoras recombinantes como se describe en el presente

documento que pueden usarse para derivados químicos, tales como amidas grasas (por ejemplo, estearamida, oleamida, erucamida); cuaternarias (por ejemplo, cloruro de tetrametilamonio, bromuro de tetrametilamonio, bromuro de tetraetilamonio, bromuro de tetrapropilamonio); y etoxiladas (por ejemplo, laurilamina, estearilamina, oleilamina, octadecilamina).

5 En otras realizaciones, la amina grasa incluye una amina grasa de cadena lineal. En otras realizaciones, la amina grasa incluye una amina grasa de cadena ramificada. En otras realizaciones más, la amina grasa comprende una fracción cíclica. En algunas realizaciones, la amina grasa es una amina grasa insaturada. En otras realizaciones, la amina grasa es una amina grasa monoinsaturada. En otras realizaciones más, la amina grasa es una amina grasa saturada. En otro aspecto, la divulgación presenta aminas grasas producidas mediante cualquiera de los métodos o cualquiera de los microorganismos descritos en el presente documento, o un tensioactivo que abarca una amina grasa producida mediante cualquiera de los métodos o cualquiera de los microorganismos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la amina grasa tiene un $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente -15,4 o superior. En ciertas realizaciones, la amina grasa tiene un $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente -15,4 a aproximadamente -10,9, o de aproximadamente -13,92 a aproximadamente -13,84. En algunas realizaciones, las aminas grasas tienen una $f_M^{14}\text{C}$ de al menos aproximadamente 1,003. En ciertas realizaciones, la amina grasa tiene una $f_M^{14}\text{C}$ de al menos aproximadamente 1,01 o al menos aproximadamente 1,5. En algunas realizaciones, las aminas grasas tienen una $f_M^{14}\text{C}$ de aproximadamente 1,111 a aproximadamente 1,124.

20 Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos están destinados a ilustrar la divulgación, y no deben interpretarse como limitantes de la invención de ninguna manera.

25 Ejemplo 1:

Se generaron los precursores de aldehído graso y las aminas grasas correspondientes *in vivo* expresando conjuntamente una tioesterasa (*tesA*) y una ácido carboxílico reductasa (*CarB*) con una putrescina aminotransferasa (*ygjG*) complementando con una fuente de nitrógeno (glutamato). Los precursores de aldehído graso se convirtieron en las aminas correspondientes.

Se clonó el gen *ygjG* de la cepa MG1655 de *E. coli* mediante PCR con los siguientes cebadores:

Cebador directo:

'5-AGGAGGAATAACATATGAACAGGTTACCTTCGAGCGCATCGGC-3'

Cebador inverso:

'5-CCCAAGCTTCGAATTCTTACGCTTCTTCGACACTTACTCGCATGGCC-3'

Después, se ligó el gen *ygjG* al vector de expresión pACYC (es decir, vector de expresión de alto número de copias), para generar el plásmido pACYC-*ygjG*. Se generó un segundo plásmido y se denominó pCL1920-*CarB*-18-*cTesA2*-13C05 (es decir, plásmido de bajo número de copias), que contenía el gen *carB* de *Mycobacterium smegmatis* y una variante del gen tioesterasa (*tesA*) de *E. coli*. Los dos plásmidos se transformaron conjuntamente en una cepa de *E. coli* no productora de aminas grasas (DVD2.1, que contiene $\Delta fadE \Delta tonA$ *fabB*-A329V *P*_{T5}-*entD* de la cepa MG1655 de *E. coli*) dando la cepa F16-YG. Las células hospedadoras también se transformaron con cada uno de los plásmidos por separado para su uso como controles, dando las cepas de control F16 (pCL1920-*CarB*-18-*cTesA2*-13C05) y la cepa de control YG (pACYC-*ygjG*).

Las células se cultivaron a 32 °C en medio M9 mínimo complementado con glucosa al 3 % (p/v), TRITON X-100 al 0,5 % (v/v), bis-tris 0,1 M, pH 7,0, e inducido a $\text{DO}_{600} \sim 1,0$ con isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida 1 mM (IPTG). (IPTG genera la transcripción del operón *lac*, y se usa para inducir la expresión de proteínas donde el gen está bajo el control del operador *lac*). En el momento de la inducción, también se añadieron 5 g/l de L-glutamato como fuente de nitrógeno. Las cepas que contenían pACYC-*ygjG* se cultivaron en presencia del antibiótico carbenicilina, y las cepas que contenían pCL1920-*CarB*-18-*cTesA2*-13C05 se cultivaron en presencia de espectinomicina, para seleccionar los respectivos plásmidos. Tras el crecimiento nocturno, los cultivos de las tres cepas se complementaron con otros 10 g/l de glucosa y 5 g/l de L-glutamato. Se congelaron alícuotas de 1 ml de cultivo a las 24 horas después de la inducción.

Para preparar muestras para el análisis, se añadieron 0,5 ml de acetato de etilo a cada parte alícuota de cultivo. Las muestras se agitaron luego con formación de vórtice a velocidad máxima durante 15 minutos y se centrifugaron durante 5 minutos. La fase orgánica se analizó con una espectrometría de masas mediante cromatografía de gases (GCMS de Agilent 6890) en modo EI (es decir, método: alcano 1 CTC sin división). La cepa F16-YG, en la que *ygjG*, *carB*, y *tesA* se expresaron exógenamente, produjo un máximo único a los 7,6 minutos (Figura 1, grupo central) que no se observó en ninguno de los controles negativos de YG o F16 (Figura 1, grupo superior e inferior). El máximo único en la muestra del cultivo de F16-YG a los 7,6 minutos se identificó como 1-dodecilamina según el banco de compuestos

químicos NIST 05. Se procesó un patrón de referencia analítico adquirido en Sigma/Aldrich (Producto n.º 325163) de forma consecutiva con la muestra de F16-YG, que confirmó la identidad del compuesto como 1-dodecilamina por su tiempo de retención (Figura 2) y por su patrón de fragmentación iónica (Figura 3) que muestra fragmentos característicos a $m/z = 142, 156$ y 170 , y un ion molecular a 185 .

5

Ejemplo 2:

Se pueden generar los precursores de aldehído graso y las aminas grasas correspondientes *in vivo* expresando conjuntamente una acil-ACP reductasa (AAR) con una putrescina aminotransferasa (*ygjG*) complementando con una fuente de nitrógeno (glutamato). Los precursores de aldehído graso se pueden convertir en las aminas correspondientes.

10

Se puede clonar el gen *ygjG* de la cepa MG1655 de *E. coli* mediante PCR con los siguientes cebadores:

15

Cebador directo:

'5-AGGAGGAATAACATATGAACAGGTTACCTTCGAGCGCATCGGC-3'

Cebador inverso:

20

'5-CCCAAGCTTCGAATTCTTACGCTTCTTCGACACTTACTCGCATGGCC-3'

El gen *ygjG* puede entonces ligarse al vector de expresión pACYC para generar el plásmido pACYC-*ygjG*. Se puede generar un segundo plásmido y denominarse pCL1920-*aar*, que es un plásmido basado en pCL que contiene un gen para AAR de *Synechococcus elongatus* PCC7942 (*aar*). Los dos plásmidos pueden transformarse conjuntamente en la cepa de *E. coli* que no produce aminas grasas (anteriormente citado) dando la cepa F17-YG. Las células hospedadoras también se pueden transformar con cada uno de los plásmidos por separado para su uso como controles, dando la cepa de control F17 (pCL1920-*aar*) y la cepa de control YG (pACYC-*ygjG*).

25

30

Las células se pueden cultivar a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio M9 mínimo complementado con glucosa al 3 % (p/v), TRITON X-100 al 0,5 % (v/v), bis-tris 0,1 M, pH 7,0, e inducido a $\text{DO}_{600} \sim 1,0$ con isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida 1 mM (IPTG). En el momento de la inducción, también se pueden añadir 5 g/l de L-glutamato como fuente de nitrógeno. Las cepas que contienen pACYC-*ygjG* se pueden cultivar en presencia del antibiótico carbenicilina (0,05 mg/ml), y las cepas que contienen pCL1920-*aar* se pueden cultivar en presencia de 0,1 mg/ml de espectinomicina para seleccionar los respectivos plásmidos. Tras el crecimiento nocturno, los cultivos de las tres cepas pueden complementarse con otros 10 g/l de glucosa y 5 g/l de L-glutamato. Se pueden congelar alícuotas de 1 ml de cultivo a las 24 horas después de la inducción.

35

40

Para preparar muestras para el análisis, se pueden añadir 0,5 ml de acetato de etilo a cada parte alícuota de cultivo. Las muestras se pueden agitar luego con formación de vórtice a velocidad máxima durante aproximadamente 15 minutos y centrifugarse durante aproximadamente 5 minutos si es necesario. La fase orgánica se puede analizar con una espectrometría de masas por cromatografía de gases (GCMS de Agilent 6890) en modo EI (es decir, método: alcano 1 CTC sin división). La cepa F17-YG, en la que *ygjG* y/o *aar* se expresan exógenamente, se espera que produzca uno o más máximos únicos que representan aminas grasas similares a las observadas en el Ejemplo 1 (anteriormente citado) y que no se observaron en ninguno de los controles negativos de YG o F17. Cualquier máximo único de la muestra del cultivo de F17-YG puede identificarse como aminas grasas según el banco de compuestos químicos NIST 05. A efectos comparativos, se puede procesar un patrón de referencia analítico de Sigma/Aldrich (Producto n.º 325163) de forma consecutiva con la muestra de F17-YG, para confirmar la identidad del compuesto que se está produciendo por su tiempo de retención y por su patrón de fragmentación iónica.

50

Ejemplo 3:

Se pueden generar los precursores de aldehído graso y las aminas grasas correspondientes *in vivo* expresando conjuntamente una tioesterasa (*TesA*) y una ácido carboxílico reductasa (*CarB*) con una GABA aminotransferasa (*PuuE*) complementando con una fuente de nitrógeno (glutamato). Los precursores de aldehído graso se pueden convertir en las aminas correspondientes. El gen *puuE* puede clonarse a partir de una cepa de *E. coli* mediante PCR con un cebador directo e inverso adecuado (de forma similar a como se muestra en los Ejemplos 1 y 2, anteriormente citados). El gen *puuE* se puede ligar a un vector de expresión (por ejemplo, pACYC, anteriormente citado), para generar el plásmido pACYC-*puuE*. Se puede generar un segundo plásmido y denominarse pCL1920-*CarB*-18-*cTesA*-13C05, que es un segundo vector de expresión que contiene el gen *carB* de *Mycobacterium smegmatis* y una variante del gen tioesterasa (*tesA*) de *E. coli* (véase el Ejemplo 1, anteriormente citado). Los dos plásmidos pueden transformarse conjuntamente en la cepa de *E. coli* que no produce aminas grasas (anteriormente citado) dando la cepa F18-PU. Las células hospedadoras también se pueden transformar con cada uno de los plásmidos por separado para su uso como controles, dando la cepa de control F18 (pCL1920-*CarB*-18-*cTesA*-13C05) y la cepa de control PU (pACYC-*puuE*).

60

65

Las células se pueden cultivar a 32 °C en medio M9 mínimo complementado con glucosa al 3 % (p/v), TRITON X-100 al 0,5 % (v/v), bis-tris 0,1 M, pH 7,0, e inducido a $DO_{600} \sim 1,0$ con isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida 1 mM (IPTG). En el momento de la inducción, se pueden añadir 5 g/l de L-glutamato como fuente de nitrógeno. Las cepas que contienen pACYC-puuE se pueden cultivar en presencia del antibiótico carbenicilina (0,05 mg/ml), y las cepas que

5 contienen pCL1920-CarB-18-cTesA2-13C05 se pueden cultivar en presencia de 0,1 mg/ml de espectinomicina para seleccionar los respectivos plásmidos. Tras el crecimiento nocturno, los cultivos de las tres cepas pueden complementarse con otros 10 g/l de glucosa y 5 g/l de L-glutamato. Se pueden congelar alícuotas de 1 ml de cultivo a las 24 horas después de la inducción.

10 Para preparar muestras para el análisis, se pueden añadir 0,5 ml de acetato de etilo a cada parte alícuota de cultivo. Las muestras se pueden agitar luego con formación de vórtice a velocidad máxima durante aproximadamente 15 minutos y centrifugarse durante 5 minutos si es necesario. La fase orgánica se puede analizar con una espectrometría de masas por cromatografía de gases (GCMS de Agilent 6890) en modo EI (es decir, método: alcano 1 CTC sin división). La cepa F18-PU, en la que *puuE*, *carB* y/o *tesA* se expresan exógenamente, se espera que produzcan uno o más máximos únicos que no se observan en ninguno de los controles negativos de PU o F18. El

15 máximo único esperado en la muestra del cultivo de F18-PU se puede identificar según el banco de compuestos químicos NIST 05. Se puede procesar un patrón de referencia analítico de Sigma/Aldrich (Producto n.º 325163) de forma consecutiva con la muestra de F18-PU, para confirmar la identidad de un nuevo compuesto de amina grasa.

20 **Ejemplo 4:**

Se pueden generar los precursores de aldehído graso y las aminas grasas correspondientes *in vivo* expresando conjuntamente una AAR con una GABA aminotransferasa (PuuE) complementando con una fuente de nitrógeno (glutamato). Los precursores de aldehído graso se pueden convertir en las aminas correspondientes.

25 El gen *puuE* puede clonarse a partir de una cepa de *E. coli* mediante PCR con un cebador directo e inverso adecuado (de forma similar a como se muestra en el Ejemplos 1, anteriormente citado). El gen *puuE* se puede ligar a un vector de expresión (por ejemplo, pACYC, anteriormente citado), para generar el plásmido pACYC-puuE. Se puede generar un segundo plásmido y denominarse pCL1920-aar, que es otro vector de expresión que contiene el gen para AAR de

30 *Synechococcus elongatus* PCC7942 (*aar*). Los dos plásmidos pueden transformarse conjuntamente en la cepa de *E. coli* que no produce aminas grasas (anteriormente citado) dando la cepa F19-PU. Las células hospedadoras también se pueden transformar con cada uno de los plásmidos por separado para su uso como controles, dando la cepa de control F19 (pCL1920-aar) y la cepa de control PU (pACYC-puuE).

35 Las células se pueden cultivar a 32 °C en medio M9 mínimo complementado con glucosa al 3 % (p/v), TRITON X-100 al 0,5 % (v/v), bis-tris 0,1 M, pH 7,0, e inducido a $DO_{600} \sim 1,0$ con isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida 1 mM (IPTG). En el momento de la inducción, se pueden añadir 5 g/l de L-glutamato como fuente de nitrógeno. Las cepas que contienen pACYC-puuE se pueden cultivar en presencia del antibiótico carbenicilina (0,05 mg/ml), y las cepas que

40 contienen pCL1920-aar se pueden cultivar en presencia de 0,1 mg/ml de espectinomicina, para seleccionar los respectivos plásmidos. Tras el crecimiento nocturno, los cultivos de las tres cepas pueden complementarse con otros 10 g/l de glucosa y 5 g/l de L-glutamato. Se pueden congelar alícuotas de 1 ml de cultivo a las 24 horas después de la inducción.

45 Para preparar muestras para el análisis, se pueden añadir 0,5 ml de acetato de etilo a cada parte alícuota de cultivo. Las muestras se pueden agitar luego con formación de vórtice a velocidad máxima durante aproximadamente 15 minutos y centrifugarse durante aproximadamente 5 minutos si es necesario. La fase orgánica se puede analizar con una espectrometría de masas por cromatografía de gases (GCMS de Agilent 6890) en modo EI (es decir, método: alcano 1 CTC sin división). La cepa F19-PU, en la que *puuE* y/o *aar* se expresan exógenamente, se espera que produzcan uno o más máximos únicos que no se observan en ninguno de los controles negativos de PU o F19. El

50 máximo único esperado en la muestra del cultivo de F19-PU se puede identificar según el banco de compuestos químicos NIST 05. Se puede procesar un patrón de referencia analítico de Sigma/Aldrich (Producto n.º 325163) de forma consecutiva con la muestra de F19-PU, para confirmar la identidad de un nuevo compuesto de amina grasa.

55 **Ejemplo 5**

Se pueden generar los precursores de aldehído graso y las aminas grasas correspondientes *in vivo* expresando conjuntamente una tioesterasa (TesA) y una ácido carboxílico reductasa (CarB) con una amina deshidrogenasa (por ejemplo, metilamina deshidrogenasa de *Paracoccus denitrificans* o quinohemoproteína amina deshidrogenasa de *Pseudomonas* sp.), complementando con una fuente de nitrógeno (amoníaco). Los precursores de aldehído graso se

60 pueden convertir en las aminas correspondientes.

El gen de la amina deshidrogenasa (AD) de *Paracoccus denitrificans* o *Pseudomonas* sp. puede clonarse mediante PCR con un cebador directo e inverso adecuado (de forma similar a como se muestra en el Ejemplo 1, anteriormente citado). El gen AD se puede ligar a un vector de expresión (por ejemplo, pACYC, anteriormente citado) para generar el plásmido pACYC-AD. Se puede generar un segundo plásmido y denominarse pCL1920-CarB-18-cTesA2-13C05, que es otro vector de expresión que contiene el gen *carB* de *Mycobacterium smegmatis* y una variante del gen

65

tioesterasa (*tesA*) de *E. coli* (véase el Ejemplo 1, anteriormente citado). Los dos plásmidos pueden transformarse conjuntamente en la cepa de *E. coli* que no produce aminas grasas (anteriormente citado) dando la cepa F20-AD. Las células hospedadoras también se pueden transformar con cada uno de los plásmidos por separado para su uso como controles, dando la cepa de control F20 (pCL1920-CarB-18-cTesA2-13C05) y la cepa de control AD (pACYC-AD).

5 Las células se pueden cultivar a 32 °C en medio M9 mínimo complementado con glucosa al 3 % (p/v), TRITON X-100 al 0,5 % (v/v), bis-tris 0,1 M, pH 7,0, e inducido a $DO_{600} \sim 1,0$ con isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida 1 mM (IPTG). En el momento de la inducción, se pueden añadir aproximadamente 0,5-1 g/l de amoníaco como fuente de nitrógeno. Las cepas que contienen pACYC-AD se pueden cultivar en presencia del antibiótico carbenicilina (0,05 mg/ml), y las cepas que contienen pCL1920-CarB-18-cTesA2-13C05 se pueden cultivar en presencia de 0,1 mg/ml de espectinomocina, para seleccionar los respectivos plásmidos. Tras el crecimiento nocturno, los cultivos de las tres cepas pueden complementarse con otros 10 g/l de glucosa y 0,5-1 g/l de amoníaco. Se pueden congelar alícuotas de 1 ml de cultivo a las 24 horas después de la inducción.

15 Para preparar muestras para el análisis, se pueden añadir 0,5 ml de acetato de etilo a cada parte alícuota de cultivo. Las muestras se pueden agitar luego con formación de vórtice a velocidad máxima durante aproximadamente 15 minutos y centrifugarse durante 5 minutos si es necesario. La fase orgánica se puede analizar con una espectrometría de masas por cromatografía de gases (GCMS de Agilent 6890) en modo EI (es decir, método: alcanos 1 sin división CTC). La cepa F20-AD, en la que *AD*, *carB* y/o *tesA* se expresan exógenamente, se espera que produzcan uno o más máximos únicos que no se observan en ninguno de los controles negativos de PU o F20. El máximo único esperado en la muestra del cultivo de F20-AD se puede identificar según el banco de compuestos químicos NIST 05. Se puede procesar un patrón de referencia analítico de Sigma/Aldrich (Producto n.º 325163) de forma consecutiva con la muestra de F20-AD, para confirmar la identidad de un nuevo compuesto de amina grasa.

25 **Ejemplo 6:**

Se pueden generar los precursores de aldehído graso y las aminas grasas correspondientes *in vivo* expresando conjuntamente una AAR con una amina deshidrogenasa (por ejemplo, metilamina deshidrogenasa de *Paracoccus denitrificans* o quinoxemoproteína amina deshidrogenasa de *Pseudomonas* sp.), complementando con una fuente de nitrógeno (amoníaco). Los precursores de aldehído graso se pueden convertir en las aminas correspondientes.

El gen de la amina deshidrogenasa (*AD*) puede clonarse a partir de una cepa de *E. coli* mediante PCR con un cebador directo e inverso adecuado (de forma similar a como se muestra en el Ejemplos 1, anteriormente citado). El gen *AD* se puede ligar a un vector de expresión (por ejemplo, pACYC, anteriormente citado) para generar el plásmido pACYC-AD. Se puede generar un segundo plásmido y denominarse pCL1920-aar, que es otro vector que contiene el gen para AAR de *Synechococcus elongatus* PCC7942 (*aar*). Los dos plásmidos pueden transformarse conjuntamente en la cepa de *E. coli* que no produce aminas grasas (anteriormente citado) dando la cepa F21-AD. Las células hospedadoras también se pueden transformar con cada uno de los plásmidos por separado para su uso como controles, dando la cepa de control F21 (pCL1920-aar) y la cepa de control AD (pACYC-AD).

40 Las células se pueden cultivar a 32 °C en medio M9 mínimo complementado con glucosa al 3 % (p/v), TRITON X-100 al 0,5 % (v/v), bis-tris 0,1 M, pH 7,0, e inducido a $DO_{600} \sim 1,0$ con isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida 1 mM (IPTG). En el momento de la inducción, se pueden añadir aproximadamente 0,5-1 g/l de amoníaco como fuente de nitrógeno. Las cepas que contienen pACYC-AD se pueden cultivar en presencia del antibiótico carbenicilina (0,05 mg/ml), y las cepas que contienen pCL1920-aar se pueden cultivar en presencia de 0,1 mg/ml de espectinomocina, para seleccionar los respectivos plásmidos. Tras el crecimiento nocturno, los cultivos de las tres cepas pueden complementarse con otros 10 g/l de glucosa y 0,5-1 g/l de amoníaco. Se pueden congelar alícuotas de 1 ml de cultivo a las 24 horas después de la inducción.

50 Para preparar muestras para el análisis, se pueden añadir 0,5 ml de acetato de etilo a cada parte alícuota de cultivo. Las muestras se pueden agitar luego con formación de vórtice a velocidad máxima durante aproximadamente 15 minutos y centrifugarse durante aproximadamente 5 minutos si es necesario. La fase orgánica se puede analizar con una espectrometría de masas por cromatografía de gases (GCMS de Agilent 6890) en modo EI (es decir, método: alcanos 1 CTC sin división). La cepa F21-AD, en la que *AD* y/o *aar* se expresan exógenamente, se espera que produzcan uno o más máximos únicos que no se observan en ninguno de los controles negativos de AD o F21. El máximo único esperado en la muestra del cultivo de F21-AD se puede identificar según el banco de compuestos químicos NIST 05. Se puede procesar un patrón de referencia analítico de Sigma/Aldrich (Producto n.º 325163) de forma consecutiva con la muestra de F21-AD, para confirmar la identidad de un nuevo compuesto de amina grasa.

REIVINDICACIONES

1. Una célula bacteriana recombinante para la producción de una amina grasa, que comprende:
- 5 (i) uno o más genes expresados que codifican una enzima biosintética exógena que tiene actividad tioesterasa;
(ii) uno o más genes expresados que codifican una enzima biosintética exógena que tiene actividad ácido
carboxílico reductasa; e
10 (iii) uno o más genes expresados que codifican una enzima biosintética exógena que tiene actividad
aminotransferasa o amina deshidrogenasa, en donde dicha célula bacteriana recombinante produce la amina grasa
in vivo,
- en donde dicha enzima biosintética exógena que tiene actividad aminotransferasa es una putrescina o GABA
aminotransferasa.
- 15 2. La célula bacteriana recombinante de la reivindicación 1, en donde dicha enzima biosintética exógena que tiene
actividad tioesterasa convierte una acil-ACP o acil-CoA en un ácido graso.
3. La célula bacteriana recombinante de la reivindicación 2, en donde dicha enzima biosintética exógena que tiene
actividad ácido carboxílico reductasa convierte dicho ácido graso en un aldehído graso.
- 20 4. La célula bacteriana recombinante de la reivindicación 3, en donde dicha enzima biosintética exógena que tiene
actividad aminotransferasa o amina deshidrogenasa convierte dicho aldehído graso en una amina grasa.
5. La célula bacteriana recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha enzima biosintética
exógena que tiene actividad tioesterasa está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *tesA*.
- 25 6. La célula bacteriana recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha enzima biosintética
exógena que tiene actividad ácido carboxílico reductasa está codificada por una secuencia de ácido nucleico que
codifica un gen *carB*.
- 30 7. La célula bacteriana recombinante de la reivindicación 1, en donde la putrescina aminotransferasa es YgjG,
preferentemente, en donde dicha YgjG está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *ygjG*.
8. La célula bacteriana recombinante de la reivindicación 1, en donde la GABA aminotransferasa es P_{uuE},
35 preferentemente, en donde dicha P_{uuE} está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen *puuE*.
9. La célula bacteriana recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha enzima biosintética
exógena que tiene actividad amina deshidrogenasa es una metilamina deshidrogenasa, preferentemente, en donde
dicha metilamina deshidrogenasa es de *Paracoccus denitrificans*.
- 40 10. La célula bacteriana recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicha célula bacteriana
recombinante se selecciona del grupo que consiste en *Escherichia*, *Bacillus*, *Cyanophyta*, *Lactobacillus*, *Zymomonas*,
Rhodococcus y *Pseudomonas*, preferentemente, en donde dicha *Escherichia* es *Escherichia coli*.
- 45 11. La célula bacteriana recombinante de la reivindicación 10, en donde dicha *Cyanophyta* se selecciona del grupo
que consiste en: (a) *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Cyanothece* y *Nostoc punctiforme*; o (b)
Synechococcus elongatus PCC7942, *Synechocystis sp.* PCC6803 y *Synechococcus sp.* PCC7001.
- 50 12. Un cultivo celular que comprende la célula bacteriana recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-
11.
13. Un método de producción de una amina grasa, que comprende cultivar la célula bacteriana de una cualquiera de
las reivindicaciones 1-11 en un caldo de fermentación que contiene una fuente de carbono.
- 55 14. El método de la reivindicación 13, que comprende además recoger aminas grasas que se acumulan en el caldo
de fermentación.

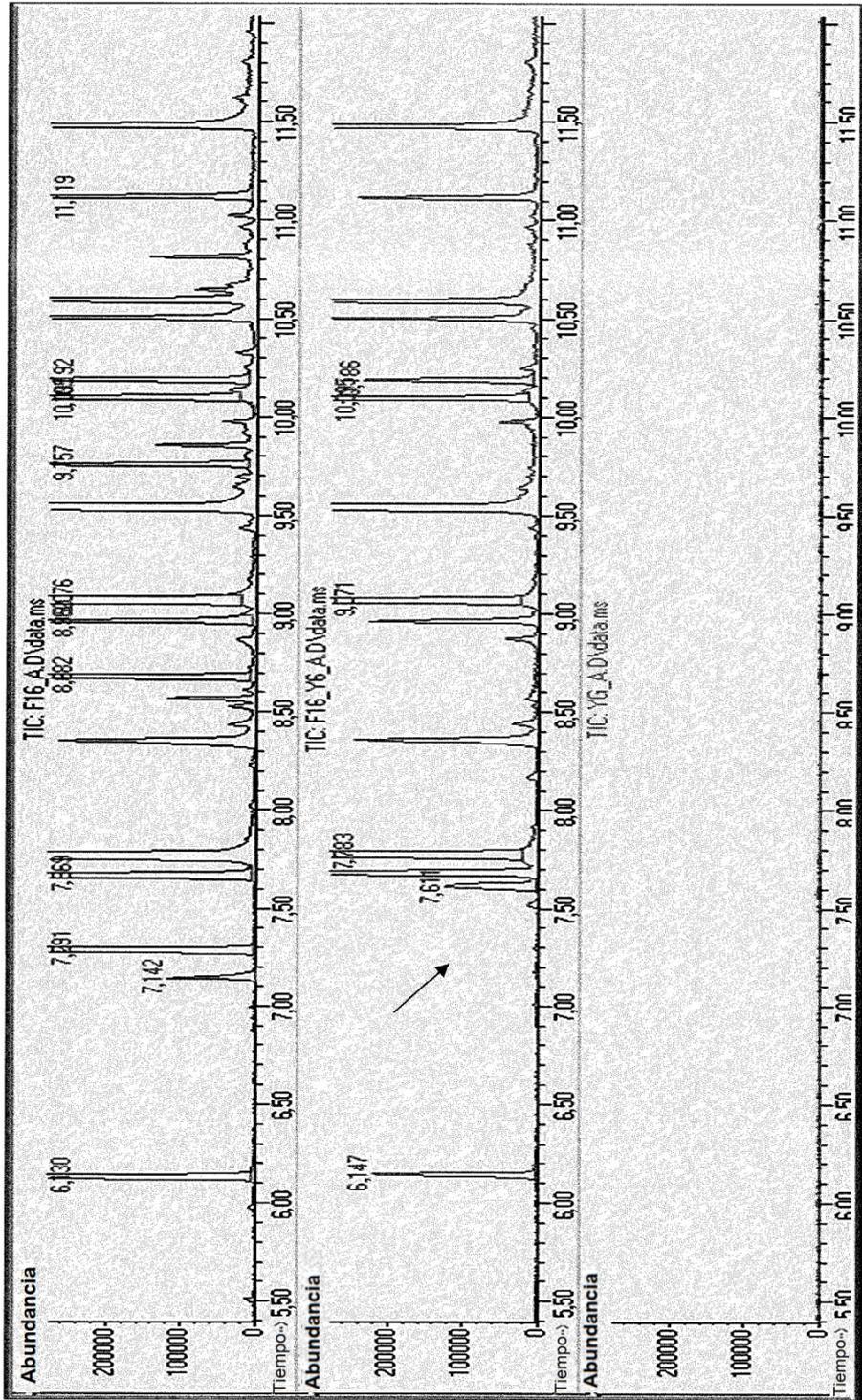


FIGURA 1

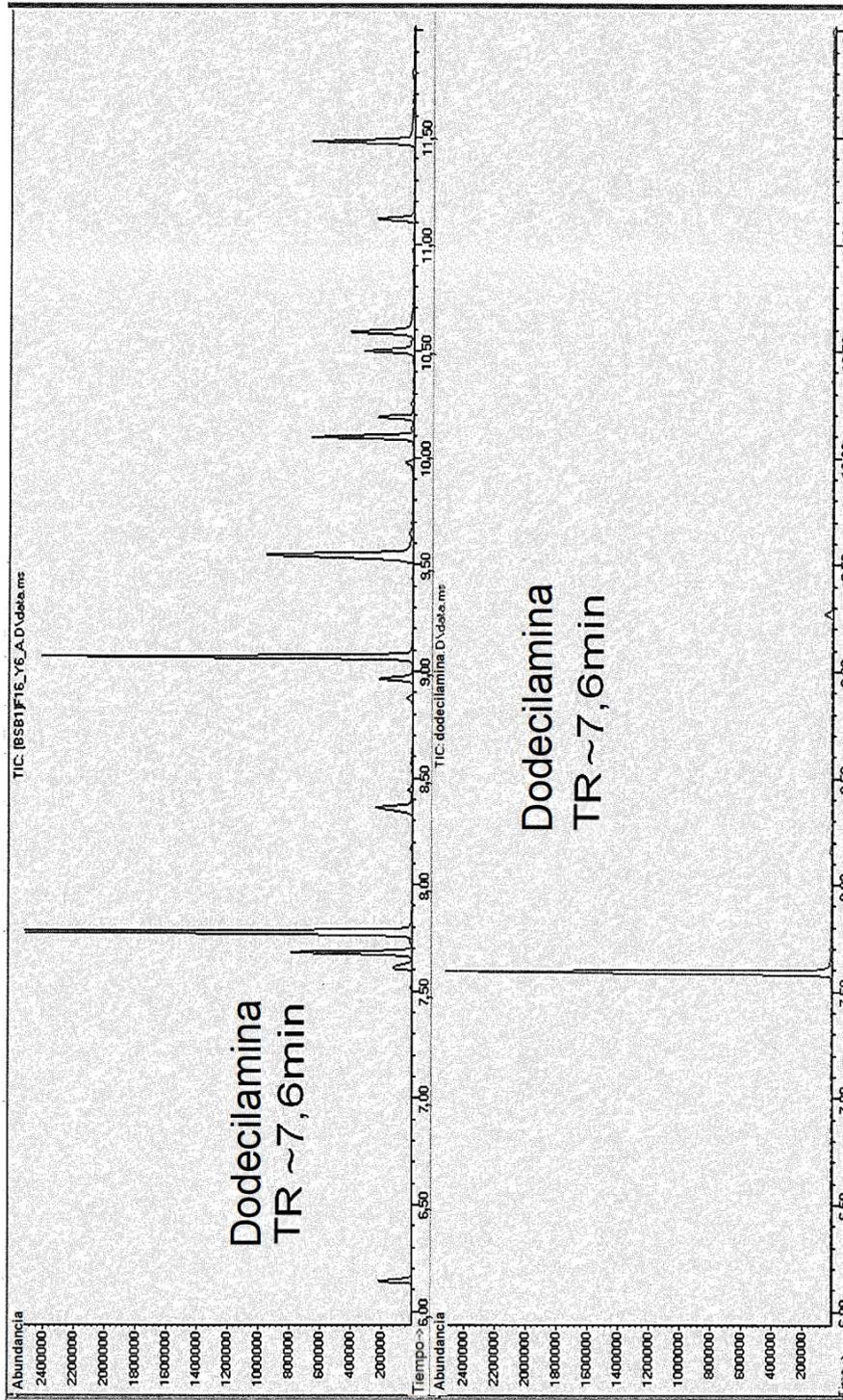


FIGURA 2

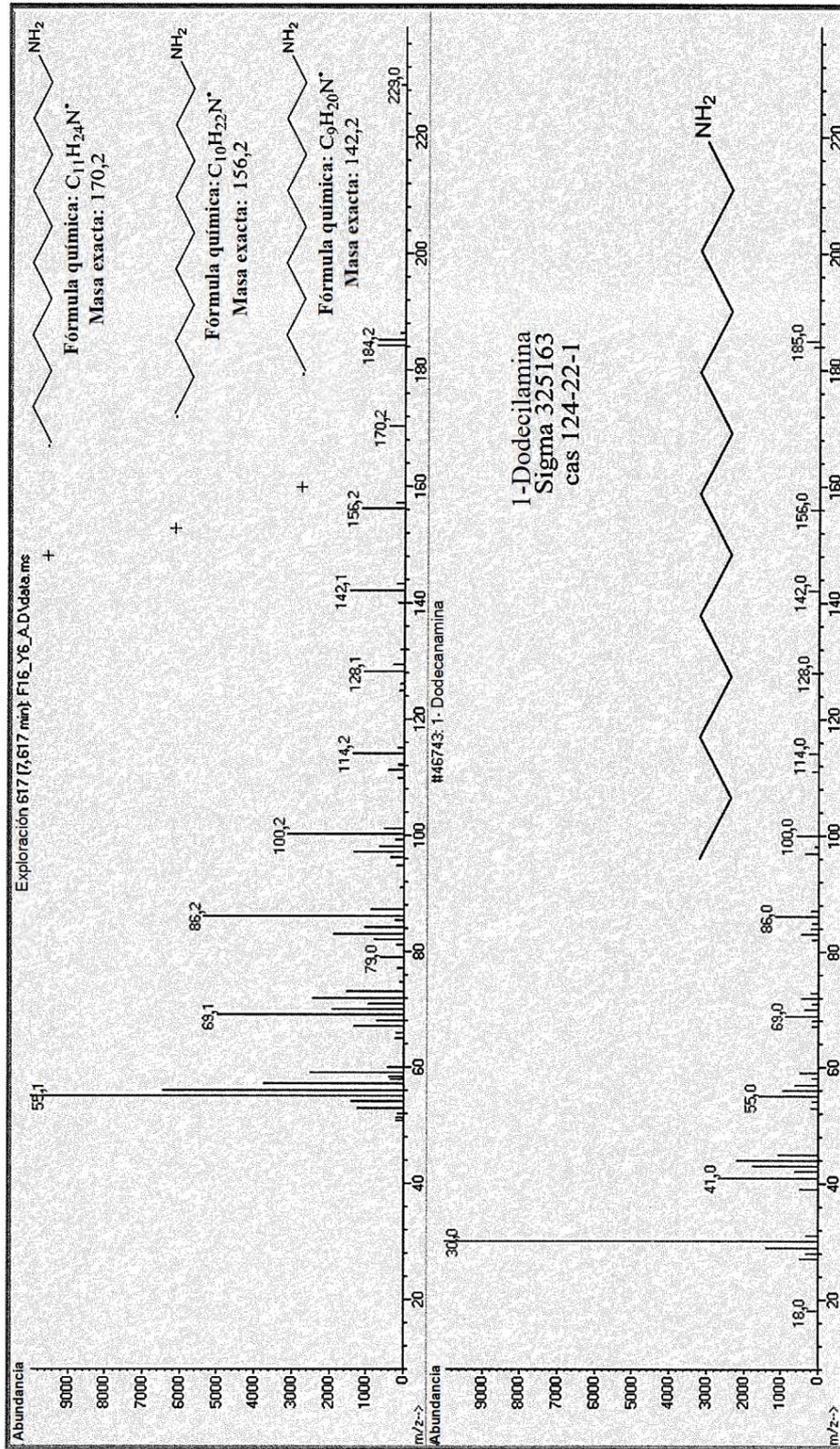


FIGURA 3