

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 083**

51 Int. Cl.:

C12P 7/42	(2006.01)
C12P 7/44	(2006.01)
C07C 45/45	(2006.01)
C07C 45/62	(2006.01)
C07C 45/65	(2006.01)
C12P 17/04	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2015 PCT/US2015/025452**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2015 WO15157719**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2015 E 15718726 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3129492**

54 Título: **Proceso quimioenzimático para la preparación de lactonas y cetonas macrocíclicas**

30 Prioridad:

10.04.2014 US 201461978176 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DEL CARDAYRE, STEPHEN, B.;
SCHIRMER, ANDREAS, W.;
KO, MYONG y
WANG, HAIBO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 811 083 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

Proceso quimioenzimático para la preparación de lactonas y cetonas macrocíclicas

5 **Campo**

La divulgación se refiere a métodos quimioenzimáticos para preparar lactonas o cetonas macrocíclicas que abarcan una gran variedad de ingredientes de fragancia naturales a través de derivados de ácidos grasos derivados de microbios a partir de materias primas basadas en carbono.

10

Antecedentes

Los derivados de ácidos grasos tienen muchos usos comerciales como componentes de agentes industriales. Sin embargo, los métodos puramente químicos para producirlos pueden requerir el uso de reactivos peligrosos y/o pueden ser intensivos en energía o bien no respetuosos con el medio ambiente. En cambio, las vías puramente fermentativas existentes de materias primas petroquímicas u oleoquímicas pueden ser demasiado costosas en comparación con los métodos químicos de producción y están limitadas en los tipos de productos que se pueden fabricar.

15

El suministro actual de ingredientes de fragancia se basa en tres vías: (i) extracción de plantas o animales, (ii) síntesis química total a partir de productos petroquímicos y (iii) biotransformación fúngica de productos oleoquímicos. Una fragancia obtenida de una planta o animal se considera una fragancia natural y, como tal, tiene una gran demanda por parte de los consumidores y tiene precios superiores. Sin embargo, el suministro es limitado ya que estos compuestos para fragancias generalmente existen solo en pequeñas cantidades en, algunas veces, plantas raras o animales salvajes y también dependen en gran medida de factores que son difíciles de controlar, por ejemplo, la influencia del clima y el riesgo de enfermedades de las plantas. Con mucho, la vía más frecuente para los ingredientes de fragancia es la síntesis química total a partir de precursores petroquímicos y la extracción y refinamiento de materiales naturales. Aunque tales fragancias evitan el problema del suministro de las fragancias naturales, son sintéticas y el consumidor no las considera naturales y, además, no son idénticas en estructura a las fragancias naturales en la mayoría de los casos, p.ej., ambretolida natural frente a isoambretolida sintética. Los compuestos para fragancias derivados de la biotransformación fúngica pueden considerarse naturales, pero son bastante marginales ya que utilizan materias primas oleoquímicas costosas y el número de compuestos para fragancias accesibles por este método es limitado.

20

25

30

En cambio, el presente método quimioenzimático a través de derivados de ácidos grasos derivados de microbios a partir de materias primas basadas en carbono puede producir una gran variedad de lactonas o cetonas macrocíclicas que son ingredientes de fragancia naturales en cantidades significativas usando un proceso controlado y rentable. Tales ingredientes de fragancia son naturales, porque derivan de organismos vivos, es decir, microbios, utilizando materias primas basadas en carbono.

35

El documento WO 2008/119735 A1 se refiere a métodos para producir ácidos grasos hidroxilados y describe una hidratación de ácidos grasos de *Streptococcus pyogenes*. Se describe además que las lactonas se producen a partir de los ácidos grasos hidroxilados por oxidación β .

40

El documento US 5.215.901 se refiere a un proceso para producir δ -lactonas y describe el cultivo de un microorganismo no recombinante en un medio nutriente que contiene un ácido graso 11-hidroxi que se convierte en un ácido δ -hidroxi-aikanoico mediante la explotación de la vía de oxidación β de degradación de ácidos grasos del microorganismo.

45

El documento US 3.963.571 se refiere a un método para producir una cetona macrocíclica y describe la oxidación microbiana de una n-parafina para producir un hidroxiácido, que se oxida para producir un diácido, que posteriormente se convierte para producir una cetona macrocíclica.

50

El documento WO 2013/019647 A1 se refiere a la producción de ácidos grasos y derivados de los mismos que tienen una longitud de la cadena alifática y características de saturación mejoradas.

El documento US 8.372.610 B2 se refiere a células microbianas recombinantes diseñadas para producir derivados de ácidos grasos que tienen cadenas lineales que contienen un número impar de átomos de carbono por la vía biosintética de los ácidos grasos.

55

El documento WO 2014/201474 A1 se refiere a métodos para producir derivados de ácidos grasos Ω -hidroxilados y a métodos para producirlos.

60

Sumario

La presente divulgación se refiere a procesos quimioenzimáticos para crear un ingrediente de fragancia, seleccionado de lactonas o cetonas macrocíclicas, incluyendo el cultivo de un microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética de ácidos grasos modificada que comprende una ω -hidroxilasa u oxigenasa de EC 1.14.15.3,

65

produciendo el microorganismo al menos un tipo de derivado de ácido graso *in vivo*, en donde el cultivo se realiza con una materia prima basada en carbono y poniendo en contacto el derivado de ácido graso *ex vivo* con un reactivo en condiciones suficientes para producir una lactona o una cetona macrocíclica, en donde dicho derivado de ácido graso se selecciona del grupo que consiste en un ácido graso insaturado, un éster de ácido graso insaturado, un ácido graso omega-hidroxi (ω -OH FA, por sus siglas en inglés), un ácido graso omega-hidroxi insaturado (ω -OH FA insaturado), un éster de ácido graso omega-hidroxi (éster de ácido graso ω -OH), un éster de ácido graso omega-hidroxi insaturado (éster de ácido graso ω -OH insaturado), un ácido graso 3-hidroxi (3-OH FA, por sus siglas en inglés), un ácido graso 3-hidroxi insaturado (3-OH FA insaturado), un éster de ácido graso 3-hidroxi (éster de ácido graso 3-OH), un éster de ácido graso 3-hidroxi insaturado (éster de ácido graso 3-OH insaturado), un alfa-omega-diácido (α,ω -diácido), un alfa-omega-diácido insaturado (α,ω -diácido insaturado), un éster de alfa-omega-diácido (éster de α,ω -diácido), un éster de alfa-omega-diácido insaturado (éster de α,ω -diácido insaturado). En un aspecto, la materia prima basada en carbono abarca una fuente de carbono simple. En otro aspecto, la materia prima basada en carbono abarca una fuente de carbono renovable.

La divulgación se refiere a un proceso quimioenzimático para preparar una lactona o una cetona macrocíclica que incluye cultivar un microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética de ácidos grasos modificada que comprende una ω -hidroxilasa u oxigenasa de EC 1.14.15.3, produciendo el microorganismo al menos un tipo de derivado de ácido graso *in vivo*, en donde el cultivo se realiza con una materia prima basada en carbono; y poner en contacto el derivado de ácido graso *ex vivo* con un reactivo en condiciones suficientes para producir una lactona o una cetona macrocíclica. La modificación metabólica comprende una vía biosintética de ácidos grasos modificada que comprende una ω -hidroxilasa u oxigenasa de EC 1.14.15.3. En un aspecto, la funcionalidad enzimática alterada incluye una ω -hidroxilasa y una tioesterasa de EC 3.1.2-o EC 2.1.1.5. En otro, aspecto el microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética de ácidos grasos modificada que comprende una ω -hidroxilasa u oxigenasa de EC 1.14.15.3 incluye tanto una tioesterasa de EC 3.1.2.- o EC 2.1.1.5 como una éster sintasa de EC 2.3.1.20. El microorganismo recombinante comprende una vía biosintética de ácidos grasos modificada que comprende una ω -hidroxilasa u oxigenasa de EC 1.14.15.3. El microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética de ácidos grasos modificada comprende una omega-hidroxilasa u oxigenasa de EC 1.14.15.3. En otro aspecto más, el microorganismo recombinante comprende una vía biosintética de ácidos grasos modificada que comprende una ω -hidroxilasa u oxigenasa de EC 1.14.15.3. En otro aspecto, el microorganismo recombinante incluye tanto una omega-hidroxilasa u oxigenasa de EC 1.14.15.3 como una oxidasa o deshidrogenasa de EC 1.1.1.1/2, EC 1.1.3.13, EC 1.1.3.20, EC 1.2.1.3/4/5 o EC 1.2.3.1. En otro aspecto, la vía de ácidos grasos modificados aumenta la cantidad de derivados de ácidos grasos insaturados dentro del microorganismo. En otro aspecto, el derivado de ácido graso tiene una cadena de carbono de número impar, ramificación de metilo o combinaciones de las mismas. El ingrediente de fragancia es una lactona o una cetona macrocíclica. En otro aspecto, el ingrediente de fragancia es una gamma-lactona (γ -lactona), una delta-lactona (δ -lactona) o combinaciones de las mismas. En otro aspecto más, el ingrediente de fragancia es una C_8 a C_{18} macrolactona.

La divulgación se refiere además a un proceso quimioenzimático (*supra*) que incluye además aislar el derivado de ácido graso antes de la etapa de contacto. En un aspecto, la etapa de contacto incluye deshidratación, lactonización o combinaciones de las mismas. En otro aspecto, al menos un tipo de derivado de ácido graso se secreta del microorganismo recombinante y la etapa de contacto se realiza sin aislar el derivado de ácido graso de la etapa de cultivo. En un aspecto, el reactivo incluye un ácido prótico que incluye, pero sin limitación, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y ácidos de resina recuperables. En otro aspecto, el agente es un ácido de Lewis que incluye, pero sin limitación, un catalizador de transesterificación de organostanano, sales de cobre o zinc, triflato de plata y zeolitas. En otro aspecto más, el reactivo es un agente de acoplamiento de péptidos.

La divulgación se refiere a un proceso quimioenzimático. (*supra*), en donde el derivado de ácido graso se selecciona de un ácido graso omega-hidroxilado (ω -OH FA), un ácido graso omega-hidroxi insaturado (ω -OH FA insaturado), un éster de ácido graso omega-hidroxi (éster de ácido graso ω -OH), un éster de ácido graso omega-hidroxi insaturado (éster de ácido graso ω -OH insaturado), un ácido graso 3-hidroxi (3-OH FA, por sus siglas en inglés), un ácido graso 3-hidroxi insaturado (3-OH FA insaturado), un éster de ácido graso 3-hidroxi (éster de ácido graso 3-OH), un éster de ácido graso 3-hidroxi insaturado (éster de ácido graso 3-OH insaturado), un alfa-omega-diácido (α,ω -diácido), un alfa-omega-diácido insaturado (α,ω -diácido insaturado), un éster de alfa-omega-diácido (Descripción α,ω -éster diácido), un éster de alfa-omega-diácido insaturado (éster de α,ω -diácido insaturado) y combinaciones de los mismos. En un aspecto, el ácido graso insaturado es monoinsaturado. En otro aspecto, el éster de ácido graso insaturado es monoinsaturado. En otro aspecto, el éster de ácido graso insaturado incluye un metil éster metílico de ácido graso insaturado (FAME, por sus siglas en inglés) y un éster etílico de ácido graso insaturado (FAEE, por sus siglas en inglés). En otro aspecto, el FAME o FAEE insaturado es monoinsaturado. En otro aspecto, el ácido graso omega-hidroxi insaturado (ω -OH FA insaturado) es monoinsaturado. En otro aspecto, el éster de ácido graso insaturado incluye un metil éster metílico de ácido graso insaturado (FAME, por sus siglas en inglés) y un éster etílico de ácido graso insaturado (FAEE, por sus siglas en inglés). En otro aspecto, el éster de ácido graso 3-hidroxi (éster de ácido graso 3-OH) es un éster metílico de ácido graso 3-hidroxi (3-OH FAME) o un éster etílico de ácido graso 3-hidroxi (3-OH FAEE). En otro aspecto, el éster de ácido graso omega-hidroxi (éster de ácido graso ω -OH) es un éster metílico de ácido graso omega-hidroxi (ω -OH FAME) o un éster etílico de ácido graso omega-hidroxi (ω -OH FAEE). En otro aspecto, el éster de ácido graso omega-hidroxi insaturado (éster de ω -OH ácido graso insaturado) es monoinsaturado. En otro aspecto, el éster de ácido graso omega-hidroxi monoinsaturado (éster de ácido graso ω -OH monoinsaturado)

es un éster metílico de ácido graso omega-hidroxi monoinsaturado (ω -OH FAME monoinsaturado) y un éster etílico de ácido graso omega-hidroxi monoinsaturado (ω - OH FAEE monoinsaturado). En otro aspecto, el ácido graso 3-hidroxi insaturado (3-OH FA insaturado) es monoinsaturado. En otro aspecto, el éster de ácido graso 3-hidroxi (éster de ácido graso 3-OH) es un éster metílico de ácido graso 3-hidroxi (3-OH FAME) o un éster etílico de ácido graso 3-hidroxi (3-OH FAEE). En otro aspecto, el éster de ácido graso 3-hidroxi insaturado (éster de ácido graso 3-OH insaturado) es monoinsaturado. En otro aspecto, el éster de ácido graso 3-hidroxi monoinsaturado (éster de ácido graso 3-OH) es un éster metílico de ácido graso 3-hidroxi monoinsaturado (3-OH FAME monoinsaturado) o un éster etílico de ácido graso 3-hidroxi monoinsaturado (3-OH FAEE monoinsaturado). En otro aspecto, el alfa-omega-diácido insaturado (α,ω -diácido insaturado) o el éster de alfa-omega-diácido insaturado (éster de α,ω -diácido insaturado) es monoinsaturado. En otro aspecto, el éster de alfa-omega-diácido monoinsaturado (éster de α,ω -diácido monoinsaturado) es un éster de semiácido. En otro aspecto, el éster de semiácido es un éster metílico o etílico. En otro aspecto, el éster de alfa-omega-diácido monoinsaturado (éster de α,ω -diácido monoinsaturado) es un diéster. En otro aspecto más, el diéster es un diéster de metilo o un diéster de etilo.

15 Descripción detallada

Las realizaciones divulgadas en el presente documento están dirigidas, a procesos que combinan el cultivo de microorganismos recombinantes capaces de sintetizar derivados de ácidos grasos utilizando una vía biosintética de ácidos grasos modificada que comprende una ω -hidroxilasa u oxigenasa de EC 1.14.15.3 con transformaciones de química orgánica sintética para proporcionar una preparación eficaz de delta (δ) y gamma (γ) lactonas o productos de lactonas y cetonas macrocíclica. En particular, los procesos prevén la producción de lactonas y cetonas macrocíclicas a partir de materiales derivados de biomasa renovable (es decir, materia prima renovable), tal como los carbohidratos de maíz, caña o biomasa lignocelulósica; o productos de desecho tal como el glicerol, gas de combustión, gas de síntesis; o la reformación de materiales orgánicos tal como biomasa o el gas natural o el dióxido de carbono. Esto proporciona fuentes alternativas rentables y renovables para la producción de estos importantes productos químicos. Debido a que los procesos proporcionan lactonas y cetonas macrocíclicas con buena selectividad a partir de materia prima renovable simple, existen ventajas económicas en términos de coste, simplicidad de operación y beneficio ambiental, en comparación con la síntesis química sintética multietapa convencional.

Los microorganismos recombinantes divulgados en el presente documento se pueden modificar por ingeniería para producir cantidades comerciales de una variedad de diferentes derivados de ácidos grasos que tienen diferentes longitudes de cadena entre C_8 y C_{18} años o más átomos de carbono, incluyendo incluso, cadenas impares o cadenas ramificadas con metilo y con una variada funcionalidad derivada que incluye, insaturación, hidroxilación y esterificación. Los microorganismos recombinantes utilizados en el proceso son capaces de secretar los derivados de ácidos grasos resultantes en los medios de cultivo o caldo de fermentación para facilitar la manipulación sintética *in situ* sin aislamiento del cultivo o para simplificar el aislamiento del producto. La producción de derivados de ácidos grasos a través de las vías de modificación por ingeniería en los microorganismos recombinantes divulgados en el presente documento es útil porque puede dar como resultado rendimientos de producto más altos que a través de vías biosintéticas naturales o mediante técnicas convencionales de química orgánica sintética.

40 Definiciones

Como se utilizan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una/o" y "el" o "la" incluyen los referentes en plural salvo que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a "una célula hospedadora" incluye dos o más de dichas células hospedadoras, la referencia a "un ácido graso" incluye uno o más ácidos grasos o mezclas de ácidos grasos, la referencia a "una secuencia de un ácido nucleico" incluye una o más secuencias de un ácido nucleico, la referencia a "una enzima" incluye una o más enzimas y similares.

La expresión "ingrediente de fragancia" significa, para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, un material que puede usarse solo o añadirse a una mezcla o composición de aceites esenciales y/o compuestos aromáticos y/o fijadores y/o disolventes para crear una fragancia o perfume. La fragancia o perfume se usa para añadir un aroma agradable al cuerpo humano, un animal, un grupo de alimentos, un objeto y/o un espacio habitable. Las lactonas (incluida una macrolactona) y las cetonas macrocíclicas son los ingredientes de fragancia. Otros ingredientes de fragancia se enumeran en el sitio web de la International Fragrance Association (IFRA) en la World Wide Web en ifraorg.org.

Una "macrolactona" es cualquier lactona macrocíclica. En una realización, una macrolactona es una lactona con > 10 átomos en el anillo.

Un "éster de semiácido" se usa indistintamente con "un semiéster de un ácido dicarboxílico", que es un ácido dicarboxílico que tiene uno de sus grupos carboxílicos esterificados.

Como se usa en el presente documento, los términos "microbiano" "organismo microbiano" o "microorganismo" pretende significar cualquier organismo que existe como una célula microscópica o un organismo unicelular que se incluye dentro de los dominios de las arqueas, bacterias o eucariotas. Por lo tanto, el término pretende abarcar células

u organismos procariotas o eucariotas que tienen un tamaño microscópico e incluye bacterias, arqueas y eubacterias de todas las especies, así como microorganismos eucariotas tales como levaduras y hongos. El término también incluye cultivos celulares de cualquier especie que se pueda cultivar para la producción de un producto bioquímico.

5 La expresión "microorganismo recombinante" se refiere a una célula hospedadora que se ha modificado genéticamente de manera que, por ejemplo, determinadas actividades enzimáticas dentro de la célula hospedadora se han alterado, añadido y/o eliminado en relación con la célula parental o la célula hospedadora natural. Una célula hospedadora modificada genéticamente es un ejemplo de microorganismo recombinante. Como tal, un "nivel de actividad de una proteína modificado o alterado", por ejemplo, una enzima, en una célula hospedadora recombinante se refiere a una diferencia en una o más características en la actividad determinada en relación con la célula hospedadora parental o natural en la que está ausente esa misma modificación. Por lo general, las diferencias en la actividad se determinan entre una célula hospedadora recombinante, que tiene actividad modificada y la célula hospedadora de tipo silvestre correspondiente (por ejemplo, comparación de un cultivo de una célula hospedadora recombinante con respecto a la célula hospedadora de tipo silvestre correspondiente), que no tiene esa actividad modificada. Las actividades modificadas pueden ser el resultado de, por ejemplo, cantidades modificadas de proteína expresadas por una célula hospedadora recombinante (por ejemplo, como resultado del aumento o de la disminución del número de copias de secuencias de ADN que codifican la proteína, aumento o disminución del número de transcritos 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, tal como, cambios en la secuencia codificante de la proteína que dan como resultado 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 algunas realizaciones, el polipéptido es un mutante o una variante de cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento. En determinados casos, las secuencias codificantes 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 uno o más codones (véase, p.ej., Grosjean et al. (1982) Gene 18:199-209).

La expresión "ácido graso" significa un ácido carboxílico que tiene la fórmula RCOOH. R representa un grupo alifático, preferentemente, un grupo alquilo. R puede comprender entre 4 y 22 átomos de carbono. Los ácidos grasos pueden tener una cadena ramificada o una cadena lineal y pueden ser saturados, monoinsaturados o poliinsaturados.

Un "derivado de ácido graso" es un producto creado en parte a partir de la vía biosintética de ácidos grasos del organismo hospedador de producción y en parte a partir de Acil-ACP o acil-CoA. El término pretende abarcar cualquier ácido graso (C₆ a C₂₄ que tiene funcionalidad química adicional y puede incluir derivados C₆-C₃₅) en el sentido de la reivindicación 1. Un derivado de ácido graso puede poseer una o más de una insaturación, hidroxilación, beta y omega hidroxilación y/o esterificación. Derivados de ácidos grasos ejemplares incluyen ácidos grasos saturados o monoinsaturados o los ésteres, ácidos grasos omega hidroxilados o los ésteres. Derivados de ácidos grasos ejemplares adicionales incluyen, acil-CoA, ácidos grasos, aldehídos grasos, alcoholes de cadena corta y larga, alcoholes grasos, hidrocarburos, ésteres (por ejemplo, ceras, ésteres de ácidos grasos o ésteres grasos), olefinas terminales, olefinas internas y cetonas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "modificación metabólica" pretende referirse a un cambio en una vía metabólica o biosintética para que difiera de su estado de origen natural. Las modificaciones metabólicas pueden incluir, por ejemplo, eliminación o atenuación de una actividad de reacción bioquímica por alteraciones funcionales de uno o más genes que codifican una enzima que participa en la reacción. También puede incluir un aumento de la actividad de reacción bioquímica al regular o sobreexpresar uno o más genes que codifican una enzima que participa en la reacción. También puede incluir la introducción de una actividad de reacción bioquímica mediante la expresión exógena de uno o más genes que codifican una enzima que participa en la reacción. Dichas modificaciones se pueden lograr a través de la manipulación genética, física o química de un microorganismo o su entorno.

La expresión "funcionalidad enzimática alterada" se refiere a una actividad enzimática que no está naturalmente presente en la célula. Un ejemplo de una funcionalidad enzimática alterada es un gen expresado de manera exógena que codifica una proteína con actividad enzimática que no se encuentra naturalmente en la célula. Otro ejemplo de una funcionalidad enzimática alterada es un gen sobreexpresado que codifica una proteína con actividad enzimática que no se encuentra naturalmente en la célula en el nivel de expresión incrementado.

La expresión "producir un derivado de ácido graso *in vivo*", como se usa en el presente documento, significa producir un derivado de ácido graso en células hospedadoras viables y/o modificadas genéticamente a partir de una materia prima renovable tal como un carbohidrato u otros, en donde la materia prima renovable se añade a un caldo de fermentación como fuente de carbono para que las células hospedadoras puedan captar y metabolizar la fuente de carbono durante la fermentación. Esto difiere de los métodos donde se producen derivados de ácidos grasos *in vitro*, en donde se utilizan enzimas purificadas o lisados celulares y el sustrato directo para la conversión enzimática, p.ej., un ácido graso o derivado de ácido graso, se añade a la enzima purificada o a las soluciones de lisados celulares. Esto también difiere de los métodos en los que se producen derivados de ácidos grasos en biotransformaciones, en donde se usan células en reposo y el sustrato directo para la conversión enzimática, p.ej., un ácido graso o derivado de ácido graso, se añade de manera exógena a las células en reposo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vía biosintética de los ácidos grasos" significa una vía biosintética que produce ácidos grasos y derivados de ácidos grasos. Ejemplos de tales derivados de ácidos grasos incluyen derivados de ácidos grasos ω -hidroxilado y de los ésteres, derivados de ácidos grasos ω -insaturados y de los ésteres y derivados de 3-hidroxiácidos grasos y de los ésteres. La vía biosintética de ácidos grasos puede incluir enzimas o polipéptidos adicionales con actividades enzimáticas además de las analizadas en el presente documento para producir derivados de ácidos grasos tales como derivados de ácidos grasos ω -hidroxilados y de los ésteres, derivados de ácidos grasos ω -insaturados y de los ésteres y derivados de 3-hidroxiácidos grasos y de los ésteres que tienen las características deseadas.

Los números de clasificación enzimática (EC, por sus siglas en inglés) se establecen por el Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), cuya descripción se encuentra disponible en el sitio web de la Nomenclatura de enzimas del IUBMB en la World Wide Web. Los números EC 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 con el mismo número EC. Además, a través de la evolución convergente, diferentes pliegues de proteínas pueden catalizar reacciones idénticas y, por lo tanto, se asignan números EC 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 EC difieren de, por ejemplo, los identificadores UniProt, que especifican una proteína por su secuencia de aminoácidos.

La expresión "número de registro" o "número de registro NCBI" o "número de registro GenBank" se refiere a un número que denota una secuencia específica de un ácido nucleico. Los números de registro de secuencias analizados en esta descripción se obtuvieron de las bases de datos proporcionadas por el NCBI (National Center for Biotechnology Information) mantenido por los National Institutes of Health, EE. UU. y de las bases de datos UniProt Knowledgebase (UniProtKB) y Swiss-Prot proporcionadas por el Swiss Institute of Bioinformatics (también denominado número de registro UniProtKB).

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 derivan de purina o pirimidina, aunque debe entenderse que también se incluyen análogos de bases de origen natural y de origen no natural. El azúcar de origen 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 de origen natural y de origen no natural. Los ácidos nucleicos generalmente 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).

Como se usa en el presente documento, 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 alterados. Los términos "polinucleótido", "secuencia de un ácido nucleico", y "secuencia de nucleótidos" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, bien ARN o ADN. 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, 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, el ADN o ARN que codifica la proteína expresada se inserta en un vector de expresión adecuado que, a su vez, se usa para transformar una célula hospedadora para producir el polipéptido.

Como se usa en el presente documento, los términos "homología" y "homólogo" se refiere a un polinucleótido o un polipéptido que comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 50 % 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 "homología" de secuencia 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 la alineación óptima 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, 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 un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 100 % de la longitud de una segunda secuencia. Después 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 la alineación óptima 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 hueco 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 NWSgapdnaCMP y un peso de hueco 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 debe utilizarse si existe incertidumbre sobre los parámetros que 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 lectura de 5. Se conocen métodos adicionales de alineación de secuencias en las técnicas de biotecnología (véase, p.ej., Rosenberg (2005) BMC Bioinformatics 6:278); Altschul et al. (2005) FEBS J. 272(20): 5101-5109).

Un "ortólogo" es un gen o genes que están relacionados por descendencia vertical y son responsables de sustancialmente las mismas o idénticas funciones en diferentes organismos. Por ejemplo, la epóxido hidrolasa de ratón y la epóxido hidrolasa humana pueden considerarse ortólogos para la función biológica de la hidrólisis de epóxidos. Los genes están relacionados por descendencia vertical cuando, por ejemplo, comparten similitud de secuencia de una cantidad suficiente para indicar que son homólogos o están relacionados por la evolución de un antepasado común. Los genes también pueden considerarse ortólogos si comparten la estructura tridimensional pero no necesariamente una similitud de secuencia, de una cantidad suficiente para indicar que han evolucionado de un antepasado común en la medida en que la similitud de secuencia primaria no es identificable, que son ortólogos pueden codificar proteínas con una similitud de secuencia de aproximadamente el 25 % al 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos. También se puede considerar que los genes que codifican proteínas que comparten una similitud de aminoácidos inferior al 25 % han surgido por descendencia vertical si su estructura tridimensional también muestra similitudes. Los miembros de la familia de enzimas serina proteasa, incluyendo activador de plasminógeno tisular y elastasa, se consideran que han surgido por descendencia vertical de un antepasado común. Los ortólogos incluyen genes o sus productos génicos codificados que a través de, por ejemplo, evolución, han divergido en estructura o actividad general. Por ejemplo, cuando una especie codifica un producto genético que muestra dos funciones y cuando tales funciones se han separado en genes distintos en una segunda especie, los tres genes y sus productos correspondientes se consideran ortólogos. Para la producción acoplada al crecimiento de un producto bioquímico, los expertos en la materia entenderán que el gen ortólogo que alberga la actividad metabólica a interrumpir debe elegirse para la construcción del microorganismo de origen no natural. Un ejemplo de ortólogos que muestran actividades separables es cuando se han separado actividades distintas en productos génicos distintos entre dos o más especies o dentro de una sola especie. Un ejemplo específico es la separación de la proteólisis de elastasa y la proteólisis de plasminógeno, dos tipos de actividad serina proteasa, en moléculas distintas como activador de plasminógeno y elastasa. Un segundo ejemplo es la separación de la 5'-3' exonucleasa de micoplasma y la actividad de la ADN polimerasa III de *Drosophila*. La ADN polimerasa de la primera especie puede considerarse un ortólogo para una o ambas exonucleasas o la polimerasa de la segunda especie y *viceversa*.

Por el contrario, "parálogos" son homólogos relacionados por, por ejemplo, duplicación seguida de divergencia evolutiva y tienen funciones similares o comunes, pero no idénticas. Los parálogos pueden originarse o derivar de, por ejemplo, la misma especie o de una especie diferente. Por ejemplo, la epóxido hidrolasa microsomal (epóxido hidrolasa I) y la epóxido hidrolasa soluble (epóxido hidrolasa II) pueden considerarse parálogos porque representan dos enzimas distintas, coevolucionadas de un antepasado común, que catalizan reacciones distintas y tienen funciones distintas en la misma especie. Los parálogos son proteínas de la misma especie con una similitud de secuencia significativa entre sí, lo que sugiere que son homólogos o están relacionadas a través de la coevolución a partir de un antepasado común. Los grupos de familias de proteínas parálogas incluyen homólogos de HipA, genes de luciferasa, peptidasas y otros.

Un desplazamiento génico no ortólogo es un gen no ortólogo de una especie que puede sustituir a una función génica

de referencia en una especie diferente. La sustitución incluye, por ejemplo, ser capaz de realizar sustancialmente la misma función o una similar en la especie de origen en comparación con la función de referencia en las diferentes especies. Aunque en general, un desplazamiento génico no ortólogo será identificable como estructuralmente relacionado con un gen conocido que codifica la función de referencia, sin embargo, los genes menos relacionados estructuralmente pero funcionalmente similares y sus productos génicos correspondientes seguirán estando comprendidos en el significado de la expresión tal como se usa en el presente documento. La similitud funcional requiere, por ejemplo, al menos alguna similitud estructural en el sitio activo o región de unión de un gen no ortólogo en comparación con un gen que codifica la función que se busca sustituir. Por lo tanto, un gen no ortólogo incluye, por ejemplo, un gen parálogo o no relacionado.

Por lo tanto, al identificar y construir los microorganismos recombinantes de origen no natural que comprenden una vía biosintética de ácidos grasos modificada que comprende una ω -hidroxilasa u oxigenasa de EC 1.14.15.3 utilizada en el proceso quimioenzimático para la producción de derivados de ácidos grasos, los expertos en la materia comprenderán la aplicación de la enseñanza y la orientación proporcionadas en el presente documento a una especie en particular en la que la identificación de modificaciones metabólicas debe incluir la identificación y la alteración de los ortólogos. En la medida en que estén presentes los desplazamientos de genes parálogos y/o no ortólogos en el microorganismo de referencia que codifica una enzima que cataliza una reacción metabólica similar o sustancialmente similar, los expertos en la materia también pueden alterar estos genes relacionados evolutivamente para garantizar que cualquier redundancia funcional en las actividades enzimáticas no provoque un cortocircuito en las modificaciones metabólicas diseñadas. Los desplazamientos de genes ortólogos, parálogos y no ortólogos pueden determinarse por métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la inspección de las secuencias de los ácidos nucleicos o de aminoácidos para dos polipéptidos revelará la identidad y las similitudes de secuencia entre las secuencias comparadas. Basándose en tales similitudes, un experto en la materia puede determinar si la similitud es suficientemente alta para indicar que las proteínas están relacionadas a través de la evolución de un ancestro común. Los algoritmos bien conocidos por los expertos en la materia, tal como Align, BLAST, Clustal W y otros compararon y determinaron una similitud o identidad de secuencia bruta y también determinaron la presencia o significación de huecos en la secuencia a los que se les puede asignar un peso o puntuación. Tales algoritmos también son conocidos en la técnica y son aplicables de manera similar para determinar la similitud o identidad de la secuencia de nucleótidos. Los parámetros para determinar de manera suficientemente similar la relación se calculan basándose en métodos bien conocidos para calcular la similitud estadística o la posibilidad de encontrar una coincidencia similar en un polipéptido aleatorio y se determina la importancia de la coincidencia. Los expertos en la materia, si se desea, también pueden optimizar visualmente una comparación por ordenador de dos o más secuencias. Se puede esperar que los productos génicos o proteínas relacionados tengan una gran similitud, por ejemplo, una identidad de secuencia del 25 % al 100 %. Las proteínas que no están relacionadas pueden tener una identidad que es esencialmente la misma que se esperaría que se produjera por casualidad, si se explora una base de datos de tamaño suficiente (aproximadamente 5 %). Las alineaciones entre el 5 % y el 24 % pueden o no representar una homología suficiente para concluir que las secuencias comparadas están relacionadas. Se puede llevar a cabo un análisis estadístico adicional para determinar la significación de tales coincidencias dado el tamaño del conjunto de datos para determinar la relevancia de estas secuencias. Parámetros ejemplares para determinar la relación de dos o más secuencias usando el algoritmo BLAST, por ejemplo, pueden ser como se establecen a continuación. En resumen, las alineaciones de secuencias de aminoácidos se pueden realizar utilizando BLASTP versión 2.0.8 (5 de enero de 1999) y los siguientes parámetros: Matriz: 0 BLOSUM62; hueco abierto: 11; extensión de hueco: 1; x_dropoff: 50; esperado: 10,0; tamaño de palabra: 3; filtro: on. Las alineaciones de secuencias de los ácidos nucleicos se pueden realizar utilizando BLASTN versión 2.0.6 (16 de septiembre de 1998) y los siguientes parámetros: Coincidencia: 1; falta de coincidencia: -2; hueco abierto: 5; extensión de hueco: 2; x_dropoff: 50; esperado: 10,0; tamaño de palabra: 11; filtro: off. Los expertos en la materia sabrán qué modificaciones y actualizaciones se pueden hacer a los parámetros anteriores para aumentar o disminuir la rigurosidad de la comparación, por ejemplo y determinar la relación de dos o más secuencias.

El término "heterólogo" generalmente significa derivado de una especie diferente o derivado de un organismo diferente. Como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de nucleótidos o una secuencia de polipéptidos que no está naturalmente presente en un organismo particular. La expresión heterólogo significa que una proteína o polipéptido se añade experimentalmente a una célula que normalmente no expresa esa proteína. Como tal, heterólogo se refiere al hecho de que una proteína transferida derivó inicialmente de un tipo celular diferente o de una especie diferente que el receptor. Por ejemplo, una secuencia polinucleotídica endógena a una célula vegetal puede introducirse en una célula hospedadora bacteriana por métodos recombinantes y el polinucleótido vegetal es entonces un polinucleótido heterólogo en una célula hospedadora bacteriana recombinante.

Un polipéptido "endógeno" se refiere a un polipéptido codificado por el genoma de la célula hospedadora (por ejemplo, célula microbiana parental) a partir de la cual la célula recombinante se modifica genéticamente o deriva. Por lo tanto, el término "endógeno" se refiere a una molécula o actividad de referencia que está naturalmente presente en el hospedador. De manera similar, el término, cuando se usa en referencia a la expresión de un ácido nucleico codificante, se refiere a la expresión de un ácido nucleico codificante contenido dentro del organismo microbiano natural.

Un polipéptido "exógeno" se refiere a un polipéptido que no está codificado por el genoma de la célula microbiana parental. Un polipéptido variante (p. ej. mutante) es un ejemplo de un polipéptido exógeno. Se pretende que "exógeno"

signifique que la molécula de referencia o la actividad de referencia se introduce en el organismo microbiano hospedador. Por lo tanto, el término, tal como se usa en referencia a la expresión de un ácido nucleico codificante, se refiere a la introducción del ácido nucleico codificante en una forma expresable en el organismo microbiano. Cuando se usa en referencia a una actividad biosintética, el término se refiere a una actividad que se introduce en el organismo hospedador de referencia. La fuente puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico codificante homólogo o heterólogo que expresa la actividad de referencia después de la introducción en el organismo microbiano hospedador. Por consiguiente, la expresión exógena de un ácido nucleico codificante de la divulgación puede utilizar uno o ambos ácidos nucleicos heterólogos u homólogos codificantes.

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 cuatro restos de aminoácidos hasta la secuencia de aminoácidos completa menos un resto de aminoácido. En determinadas 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).

Como se usa en el presente documento, 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 un ácido nucleico que codifica una proteína produce una proteína mutante. La mutagénesis también se refiere a cambios en las secuencias de los ácidos nucleicos no codificantes que dan como resultado una actividad proteica modificada.

Como se usa en el presente documento, el término "gen" se refiere a secuencias de un ácido nucleico que codifica un producto de ARN o un producto proteico, así como secuencias de un ácido nucleico unidas operativamente que afectan la expresión del ARN o proteína (por ejemplo, tales secuencias incluyen, pero sin limitación, secuencias promotoras o potenciadoras) o secuencias de un ácido nucleico unidas operativamente que codifican secuencias que afectan la expresión del ARN o proteína (por ejemplo, tales secuencias incluyen, pero sin limitación, sitios de unión a ribosomas o secuencias de control de 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 internos de entrada al ribosoma (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 implicadas en la transcripción (Maniatis et al., (1987) Science 236:1237-1245). Se describen secuencias de control de la expresión ejemplares en, por ejemplo, Goeddel, "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology", Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). En los métodos de la divulgación, una secuencia de control de la expresión está unida operativamente a una secuencia polinucleotídica. Por "unidas operativamente" se entiende que una secuencia polinucleotídica y una secuencia o secuencias 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 o secuencias de control de la expresión. Los promotores unidos operativamente se encuentran cadena arriba de la secuencia polinucleotídica seleccionada en términos de la dirección de transcripción y traducción. Los potenciadores unidos operativamente se pueden ubicar cadena arriba, dentro o cadena abajo 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. Los términos "plásmido" y "vector" se usan indistintamente en el presente documento, en tanto que un plásmido es la forma de vector más utilizada. Sin embargo, también se incluyen otras formas de vectores de expresión que cumplen funciones equivalentes y que se dan a conocer en la técnica a continuación. En algunas realizaciones, un vector recombinante comprende además un promotor unido operativamente a la secuencia polinucleotídica. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor regulado por el desarrollo, específico de órgano, específico de tejido, inducible, constitutivo o específico de célula. El vector recombinante normalmente comprende al menos una secuencia que incluye (a) una secuencia de control de la expresión acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica; (b) un marcador de selección acoplado operativamente a la secuencia polinucleotídica; (c) una secuencia marcadora acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica; (d) un resto de purificación acoplado operativamente a la secuencia polinucleotídica; (e) una secuencia de secreción acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica; y (f) una secuencia de direccionamiento acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica. En determinadas 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 descritos en el presente documento incluyen una secuencia polinucleotídica descrita 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 procariotas, por ejemplo, *E. coli*, se realiza con mayor frecuencia con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de polipéptidos de fusión o no de fusión. Los vectores de fusión añaden una cantidad de aminoácidos a un polipéptido codificado en los mismos, habitualmente al extremo amino o carboxi del polipéptido recombinante. Dichos vectores de fusión normalmente sirven para uno o más de los tres siguientes propósitos: (1) aumentar la expresión del polipéptido recombinante; (2) aumentar la solubilidad del polipéptido recombinante; y (3) ayudar en la purificación del polipéptido recombinante actuando como ligando en la purificación por afinidad. Con frecuencia, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión de la fracción de fusión y el polipéptido recombinante. Esto permite la separación del polipéptido recombinante de la fracción de fusión después de la purificación del polipéptido de fusión. En determinadas realizaciones, una secuencia polinucleotídica de la divulgación puede estar unida operativamente a un promotor derivado del bacteriófago T5. En determinadas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de levadura y el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Ejemplos de vectores para expresión en levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari et al. (1987) EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan et al. (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corp., San Diego, CA) y picZ (Invitrogen Corp., San Diego, CA). En otras realizaciones, la célula hospedadora es una célula de insecto y el vector de expresión es un vector de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (p. ej., células Sf9) incluyen, por ejemplo, la serie pAc (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow et al. (1989) Virology 170:31-39). En otra realización más, las secuencias polinucleotídicas descritas en el presente documento pueden expresarse en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero. Otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procariotas como eucariotas son bien conocidos en la técnica; véase, p.ej., Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989).

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

Como se usa en el presente documento, "acil-ACP" se refiere a un acil tioéster formado entre el carbono carbonílico de una cadena de alquilo y el grupo sulfhidrilo de la fracción fosfopanteteinilo de una proteína portadora de acilo (ACP, por sus siglas en inglés). 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, por sus siglas en inglés), 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.

Como se usa en el presente documento, 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.

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. Ejemplos de secuencias reguladoras incluyen, pero sin limitación, secuencias promotoras de ARN, secuencias de unión a factores 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, secuencias de Shine-Dalgarno en procariotas o secuencias de Kozak en eucariotas), codones de inicio, codones de terminación).

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 incluye 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 seleccionada. "Cultivar" o "cultivo" se refiere al crecimiento de una población de células hospedadoras recombinantes en condiciones adecuadas en un medio líquido o sólido. En realizaciones particulares, cultivar se refiere a la bioconversión fermentativa de un sustrato en un producto final. Los medios de cultivo son bien conocidos y los componentes individuales de dichos medios de cultivo están disponibles en fuentes comerciales, p.ej., bajo las marcas registradas DIFCO™ y BBL™. En un ejemplo no limitante, el medio de nutrientes acuoso es un medio rico que comprende fuentes complejas de nitrógeno, sales y carbono, tales como el medio YP, que comprende 10 g/l de peptona y 10 g/l de extracto de levadura de dicho medio. La célula hospedadora de un cultivo puede modificarse por ingeniería adicionalmente para asimilar carbono de manera eficaz y utilizar materiales celulósicos como fuentes de carbono de acuerdo con los métodos descritos en las patentes de EE.UU. 5.000.000; 5.028.539; 5.424.202; 5.482.846; 5.602.030; documento WO 2010127318. Además, en algunas

realizaciones, la célula hospedadora se modifica por ingeniería para expresar una invertasa para que la sacarosa pueda usarse como fuente de carbono.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "en condiciones eficaces para expresar una secuencia de polinucleótidos modificados por ingeniería genética" significa cualquier condición que permita que una célula hospedadora produzca los derivados de ácidos grasos deseados. Los ejemplos son ácido graso ω -hidroxilado y derivados de éster, derivados de ácidos grasos ω -insaturados y de los ésteres y derivados de 3-hidroxiácidos grasos y de los ésteres. Las condiciones adecuadas incluyen, por ejemplo, las condiciones de fermentación.

10 La expresión "nivel de expresión alterado" y "nivel de expresión modificado" se usan indistintamente y significan que un polinucleótido, polipéptido, metabolito o producto (p. ej., derivados de ácidos grasos, derivado de ω -hidroxiácido graso) está presente a una concentración diferente en una célula hospedadora modificada por ingeniería en comparación con su concentración en una célula de tipo silvestre correspondiente en las mismas condiciones.

15 Como se usa en el presente documento, el término "título" se refiere a la cantidad de derivado de ácido graso producido por unidad de volumen de cultivo de células hospedadoras. Ejemplos de derivados de ácidos grasos son los derivados de ácidos grasos ω y los derivados de 3-hidroxiácidos grasos. De este modo, el título puede referirse a un derivado de ácido graso ω (omega) particular o una combinación de derivados de ácido graso ω producido por un cultivo de células hospedadoras recombinantes dado. De manera similar, el título puede referirse a un derivado de ácido graso 3-hidroxi particular o una combinación de derivados de ácido graso 3-hidroxi producidos por un cultivo de células hospedadoras recombinantes dado.

25 Como se usa en el presente documento, el término "productividad" se refiere a la cantidad de un derivado o unos derivados de ácidos grasos producidos por unidad de volumen de cultivo de células hospedadoras por unidad de tiempo. Ejemplos de derivados de ácidos grasos son los derivados de ácidos grasos ω y los derivados de 3-hidroxiácidos grasos. La productividad puede referirse a un derivado de ácido graso ω -hidroxilado o éster particular, el derivado de ácido graso o éster ω -insaturado o el derivado de ácido graso o éster 3-hidroxi o una combinación de dichos derivados de ácidos grasos producidos por un cultivo de células hospedadoras recombinantes dado.

30 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).

la expresión "basada en carbono" cuando se usa solo o en referencia a una "fuente" se refiere a derivar de una fuente de carbono. La fuente de carbono incluye cualquier material biológico (incluidas las materias primas renovables y/o biomasa) del que deriva el carbono, excepto los productos oleoquímicos (es decir, aceites refinados de plantas y animales tales como ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, TAG, hidroxiácidos grasos y similares) y productos petroquímicos (es decir, productos químicos derivados del petróleo tal como alcanos, alquenos y similares). De este modo, la expresión "basadas en carbono", como se usa en el presente documento, excluye el carbono derivado de oleoquímicos y petroquímicos. En una realización, la fuente de carbono es una fuente de carbono simple. En algunas realizaciones, la fuente de carbono incluye azúcares o carbohidratos (p. ej., monosacáridos, disacáridos o polisacáridos). En algunas realizaciones, la fuente de carbono es glucosa y/o sacarosa. En otras realizaciones, la fuente de carbono deriva de una materia prima renovable, como los carbohidratos del maíz, caña de azúcar o biomasa lignocelulósica; o productos de desecho tal como el glicerol, gas de combustión, gas de síntesis; o la reformación de materiales orgánicos tal como la biomasa o el gas natural; o es dióxido de carbono que se fija fotosintéticamente. En otras realizaciones, una biomasa se procesa en una fuente de carbono, que es adecuada para la bioconversión. En otras realizaciones más, la biomasa no requiere procesamiento adicional en una fuente de carbono, pero puede usarse directamente como fuente de carbono. Una fuente ejemplar de dicha biomasa es materia vegetal o vegetación, como pasto varilla. Otra fuente de carbono ejemplar incluye productos de desecho metabólico, tales como materia animal (por ejemplo, estiércol de vaca). Fuentes ejemplares adicionales de biomasa incluyen algas y otras plantas marinas. Otra fuente de carbono (incluida la biomasa) incluye los productos de desecho de la industria, agricultura, silvicultura y hogares, incluyendo, pero sin limitación, residuos de fermentación, biomasa de fermentación, glicerol/glicerina, ensilado, paja, madera no procesada, aguas residuales, basura, manipulación de residuos sólidos, residuos urbanos celulósicos y restos de comida.

55 Como se usa en el presente documento, el término "aislado", con respecto a productos (tales como derivados de ácidos grasos) se refiere a productos que están separados de los componentes celulares, medios de cultivo celular o precursores químicos o sintéticos. Por ejemplo, el derivado de ácido graso o éster ω -hidroxilado, el derivado de ácido graso o éster ω -insaturado o el derivado de ácido graso o éster 3-hidroxi producido por los organismos divulgados en el presente documento puede ser relativamente inmisible en el caldo de fermentación, así como en el citoplasma. Por lo tanto, los derivados de ácidos grasos se recogerán en una fase orgánica intracelular o extracelularmente. En algunas realizaciones, los derivados de ácidos grasos ω se acumulan extracelularmente, es decir, se secretan. Como se usa en el presente documento, el término "aislado" cuando se usa en referencia a un organismo microbiano pretende significar un organismo que está sustancialmente libre de al menos un componente a medida que el organismo microbiano de referencia se encuentra en la naturaleza. El término incluye un organismo microbiano que se elimina de algunos o de todos los componentes tal como se encuentra en su entorno natural. El término también incluye un organismo microbiano que se elimina de algunos o de todos los componentes ya que el organismo

microbiano se encuentra en entornos no naturales. Por lo tanto, un organismo microbiano aislado se separa parcial o completamente de otras sustancias como se encuentra en la naturaleza o como se cultiva, almacenado o subsistido en ambientes no naturales. Ejemplos específicos de organismos microbianos aislados incluyen microbios parcialmente puros, microbios sustancialmente puros y microbios cultivados en un medio que es de origen no natural.

5 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 "sustancialmente 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, al menos aproximadamente un 99 % libres) de otros componentes con los que están asociados. 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 dar como resultado un aumento del porcentaje de derivados de ácidos grasos en una muestra. Por ejemplo, cuando se produce un derivado de ácido graso en una célula hospedadora recombinante, el derivado de ácido graso puede purificarse mediante la eliminación de proteínas de la célula hospedadora. Después de la purificación, el porcentaje de derivado de ácido graso en la muestra aumenta. Los términos "purificar", "purificado/a" y "purificación" son términos relativos que no requieren una pureza absoluta. De este modo, por ejemplo, cuando se produce un derivado de ácido graso en células hospedadoras recombinantes, un derivado de ácido graso purificado es un derivado de ácido graso que está sustancialmente separado de otros componentes celulares (por ejemplo, ácidos nucleicos, polipéptidos, lípidos, carbohidratos u otros hidrocarburos).

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "de origen no natural" cuando se usa en referencia a un organismo microbiano o microorganismo divulgado en el presente documento pretende significar que el organismo tiene al menos una alteración genética que normalmente no se encuentra en una cepa de origen natural de la especie de referencia, incluidas las cepas de tipo silvestre de las especies de referencia. Las alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, modificaciones que introducen ácidos nucleicos expresables que codifican polipéptidos metabólicos, otras adiciones de ácidos nucleicos, eliminaciones de ácidos nucleicos y/u otra alteración funcional del material genético microbiano. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, regiones codificantes y fragmentos funcionales de las mismas, de polipéptidos heterólogos, homólogos o tanto heterólogos como homólogos para las especies de referencia. Las modificaciones adicionales incluyen, por ejemplo, regiones reguladoras no codificantes en las que las modificaciones alteran la expresión de un gen u operón. Polipéptidos metabólicos ejemplares incluyen enzimas dentro de una vía biosintética de derivados de ácidos grasos que incluyen, sin limitación, tioesterasas, éster sintasas, omega hidroxilasas y oxidasas o deshidrogenasas.

35 Como se usa en el presente documento, el término "CoA" o "coenzima A" pretende significar un cofactor o grupo prostético orgánico (parte no proteica de una enzima) cuya presencia se requiere para la actividad de muchas enzimas para formar un sistema enzimático activo. La coenzima A funciona, por ejemplo, en determinadas enzimas de condensación, actúa en la transferencia de acetilo u otro grupo acilo y en la síntesis y oxidación de ácidos grasos.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente anaeróbico" cuando se usa en referencia a una condición de cultivo o crecimiento pretende significar que la cantidad de oxígeno es menos de aproximadamente el 10 % de saturación para oxígeno disuelto en medios líquidos. La expresión también pretende incluir cámaras selladas de medio líquido o sólido mantenidas con una atmósfera de menos de aproximadamente un 1 % de oxígeno.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "alteración génica", o equivalentes gramaticales de la misma, pretende significar una alteración genética que deja el producto génico codificado inactivo. La alteración genética puede ser, por ejemplo, la eliminación de todo el gen, la eliminación de una secuencia reguladora requerida para la transcripción o traducción, la eliminación de una parte del gen con resultados en un producto génico truncado o por cualquiera de las diversas estrategias de mutación que inactivan el producto génico codificado. Un método particularmente útil de alteración génica es la eliminación génica completa porque reduce o elimina la aparición de reversiones genéticas en los microorganismos de origen no natural de la invención. La expresión "alteración génica" también pretende significar una transformación genética que disminuye la actividad de un producto génico dado en relación con su actividad en un organismo de tipo silvestre. Esta atenuación de la actividad puede deberse a, por ejemplo, una eliminación en una parte del gen que da como resultado un producto génico truncado o cualquiera de las diversas estrategias de mutación que hacen que el producto génico codificado sea menos activo que su forma natural, reemplazo o mutación de la secuencia promotora que conduce a una expresión más baja o menos eficaz del gen, cultivo del organismo en una condición en la que el gen se expresa menos altamente que en condiciones normales de cultivo o introducción de moléculas de ARN antisentido que interactúan con moléculas de ARNm complementarias del gen y alteran su expresión.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "organismo eucariota" se refiere a cualquier organismo que tenga un tipo de célula que tenga orgánulos especializados en el citoplasma y un núcleo unido a la membrana que encierra material genético organizado en cromosomas. La expresión pretende abarcar todos los organismos eucariotas, incluidos los organismos microbianos eucariotas, tal como levaduras y hongos. La expresión también incluye cultivos celulares de cualquier especie eucariota que se pueda cultivar para la producción de un producto

bioquímico donde la especie eucariota no necesita ser un organismo microbiano. Un "organismo microbiano eucariota" "organismo microbiano eucariota" o "microorganismo eucariota" pretende significar cualquier organismo eucariota que exista como una célula microscópica que esté incluido dentro del dominio eucariota.

5 Visión general

El desarrollo de un nuevo proceso quimioenzimático respetuoso con el medio ambiente para la producción de lactonas y cetonas macrocíclicas que son adecuadas como ingredientes de fragancia a partir de derivados de ácidos grasos derivados de microbios indica una mejora significativa para la industria. En particular, el método prevé la producción de estos compuestos químicos a partir de materias primas basadas en carbono, tal como los carbohidratos a partir del maíz, caña o biomasa lignocelulósica; productos de desecho tal como el glicerol, gas de combustión, gas de síntesis; o la reformación de materiales orgánicos tal como biomasa o el gas natural o el dióxido de carbono. Esto proporciona un proceso limpio y ambientalmente sostenible para la producción de productos químicos como ingredientes de fragancia. Debido a que el proceso permite que los compuestos se produzcan a partir de una materia prima renovable simple, también hay ventajas económicas distintas con respecto al coste y a la simplicidad de la operación.

Por ejemplo, el proceso quimioenzimático incluye un método de dos etapas que produce un derivado de ácido graso por microbios a partir de una materia prima basada en carbono renovable y después convierte sintéticamente el derivado de ácido graso en una lactona o cetona macrocíclica, como un ingrediente de fragancia. Las ventajas de este proceso son que es un método de producción más simple y rentable, porque emplea como primera etapa una fermentación microbiana en lugar de costosos (y a menudo múltiples) procesos químicos y/o biocatalíticos. Otra ventaja es que el proceso es más limpio porque se generan menos productos de desecho. Otra ventaja es que el proceso es más sostenible debido al uso de materia prima renovable como material de origen en bruto, esto incluso puede incluir productos de desecho tal como el glicerol. Otra ventaja es la fabricación selectiva de nuevas lactonas o cetonas macrocíclicas específicas, es decir, nuevas composiciones adecuadas como fragancias. Aun así, otra ventaja es el acceso repentino a diversas composiciones químicas que proporcionan la base para nuevas fragancias.

Los ingredientes de fragancia tienen características olfativas específicas y su producción hasta ahora ha sido limitada mediante el uso de compuestos de origen natural o precursores petroquímicos u oleoquímicos. La divulgación proporciona un proceso quimioenzimático que permite la síntesis de nuevas estructuras químicas mediante el uso de derivados de ácidos grasos como sustratos. En particular, la fermentación puede alterar la posición y la configuración de los dobles enlaces, introducir ramificaciones de metilo y variar las longitudes de las cadenas de carbono en los derivados de ácidos grasos. Los derivados de ácidos grasos se usan después como precursores para elaborar los ingredientes de fragancia. Esto permite la síntesis de nuevas estructuras químicas con características olfativas potencialmente más potentes o alteradas. Con este fin, es bien sabido en la técnica que la adición de un doble enlace y/o la alteración de su configuración o posición tiene un impacto en la volatilidad de un compuesto. Esto puede dar a un compuesto una fragancia intensificada o alterada.

Un ejemplo es globalide (también conocido como habanolide), que es un almizcle de olor metálico, fresco y radiante. Globalide es una mezcla no natural (es decir, sintética) de C₁₅ macrólidos cíclicos con un doble enlace, en la posición C₁₁ o C₁₂ y como cis (z-) o trans (e-) isómeros (una mezcla de e-11 ciclopentadecenolida, z-11 ciclopentadecenolida, e-12 ciclopentadecenolida y z-12 ciclopentadecenolida). La configuración y posición de su doble enlace no es por diseño, sino que está determinada por las materias primas químicas disponibles utilizadas para su síntesis, ciclododecanona y butadieno. El proceso quimioenzimático permite la síntesis de habanólidos isoméricamente puros con un doble enlace en una posición definida, por ejemplo z-11 ciclopentadecenolida, z-12 ciclopentadecenolida, z-7 ciclopentadecenolida y z-8 ciclopentadecenolida), que son compuestos novedosos con características olfativas potencialmente superiores en comparación con el globalide sintético.

Otro ejemplo es la familia de la ambretolida. Ambretolida es un almizcle de olor ligeramente dulce. Se produce de manera natural en semillas de hibisco y es un C₁₆ macrólido con un doble enlace (z-7 ciclohexadecenolida). Debido al suministro limitado de las semillas de hibisco, por lo general, se sintetiza químicamente. Sin embargo, la estructura natural no es accesible a través de la síntesis química. La síntesis química se limita a su análogo saturado, dihidroambretolida (ciclohexadecanolida), que tiene características olfativas inferiores o el isómero trans-9, isoambretolida (e-9 ciclohexadecenolida). La configuración y posición del doble enlace del último compuesto no es por diseño, sino que está determinada por la materia prima química, que en este caso es el ácido aleurítico. El presente proceso quimioenzimático permite la síntesis de z-9 ciclohexadecenolida, una isoambretolida con la misma configuración de doble enlace que la ambretolida natural, que es un compuesto novedoso con características olfativas potencialmente superiores en comparación con la isoambretolida sintética.

Otro ejemplo es la familia de cetonas macrocíclicas insaturadas. Solo unas pocas cetonas macrocíclicas son de origen natural, por ejemplo, muscona ((-) - (R) -3-metilciclopentadecanona) del ciervo almizclero o rata almizclera y su suministro es limitado. Las cetonas macrocíclicas generalmente se sintetizan químicamente a partir de ciclododecanona por extensión de anillo o por metátesis olefínica. Por lo general, están completamente saturadas, p.ej., romanona (también conocida como exaltona) (ciclopentadecanona). El presente proceso quimioenzimático permite la síntesis de cetonas macrocíclicas insaturadas, p.ej., ciclopentadecenona o ciclohexadecenona, cuando un ácido dicarboxílico insaturado, p.ej., ácido 1,15 pentadecenodioico o ácido 1,16 hexadecenodioico, se utiliza como

precursor de derivados de ácidos grasos. Estos son compuestos novedosos con características olfativas potencialmente superiores en comparación con el producto sintético correspondiente, cetonas macrocíclicas saturadas.

- 5 Otro ejemplo es la familia de gamma o delta lactona (γ - o δ -lactona), por ejemplo, la C_{12} γ -lactona y γ -dodecalactona. Las γ -lactonas insaturadas no son accesibles mediante síntesis química. La biotransformación utilizando costosas materias primas oleoquímicas tal como el aceite de ricino o el ácido ricinoleico solo permite un doble enlace en la posición C_2 , p.ej., γ -dodec-2-enolactona. El último proceso también es difícil de controlar y la γ -dodec-2-enolactona es solo una fracción menor de la dodecalactona saturada. El presente proceso quimioenzimático permite la síntesis de
- 10 γ -dodec-5-enolactona cuando un éster de ácido graso 3-hidroxi o un éster de ácido graso 3-hidroxi insaturado, p.ej., ácido 3-hidroxi dodec-5-enoico o éster metílico del ácido 3-hidroxi dodec-5-enoico, se utiliza como precursor de derivados de ácidos grasos. El proceso quimioenzimático también permite la síntesis de γ -lactonas ramificadas con metilo, p.ej., 9-metil- γ -dodecalactona, 10-metil- γ -dodecalactona y 10-metil- γ -undecalactona, cuando los ácidos grasos o los ésteres de ácidos grasos insaturados ramificados con metilo se utilizan como precursores de derivados de ácidos
- 15 grasos. Estos son compuestos novedosos con características olfativas potencialmente superiores en comparación con las γ -lactonas sintéticas o semisintéticas.

Los microorganismos

- 20 La presente divulgación se refiere a un proceso que comprende el cultivo de microorganismos recombinantes que se han modificado por ingeniería para convertir materias primas basadas en carbono renovables, tales como carbohidratos, productos de desecho o biomasa selectivamente a derivados de ácidos grasos específicos que sirven como precursores derivados de microbios para la producción de ingredientes de fragancia. Como tal, la divulgación contempla microorganismos que abarcan modificaciones metabólicas, incluidas funcionalidades enzimáticas alteradas
- 25 a través de metabolismos de ácidos grasos microbianos modificados por ingeniería para la conversión de intermedios en derivados de ácidos grasos específicos, p.ej., ácidos grasos y ésteres grasos que a su vez sirven como precursores derivados de microbios para la producción de lactonas y cetonas macrocíclicas, es decir, ingredientes de fragancia. Los microorganismos recombinantes permiten procesos de fermentación a gran escala y alto rendimiento que hacen que la producción de ingredientes de fragancia sea más rentable.
- 30

- La síntesis de ácidos grasos es uno de los sistemas más conservados de la maquinaria biosintética bacteriana. El complejo de múltiples enzimas de la ácido graso sintasa (FAS, por sus siglas en inglés) está presente en todas las bacterias y organismos eucariotas. La mayoría de los genes relacionados con la FAS son indispensables para el crecimiento y la supervivencia de las células. Las FAS eucariota y bacteriana conducen esencialmente el mismo tipo
- 35 de transformación bioquímica. En eucariotas, la FAS se conoce como FASI y la mayoría de sus dominios catalíticos están codificados por una cadena polipeptídica (no disociable). En procariotas tales como las bacterias, la FAS se conoce como FASII y sus enzimas individuales y proteínas portadoras están codificadas por genes separados que codifican proteínas diferenciadas (disociables).

- 40 La proteína portadora de acilo (ACP) junto con las enzimas en una vía de FAS controlan la longitud, el grado de saturación y de ramificación de los ácidos grasos producidos en un organismo natural. Las etapas de esta vía son catalizadas por enzimas de las familias de genes de biosíntesis de ácidos grasos (FAB, por sus siglas en inglés) y acetil-CoA carboxilasa (ACC, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, las enzimas que pueden incluirse en una vía FAS incluyen AccABCD, FabD, FabH, FabG, FabA, FabZ, FabI, FabK, FabL, FabM, FabB y FabF. Dependiendo del
- 45 producto derivado de ácidos grasos deseado, uno o más de estos genes pueden atenuarse o sobreexpresarse. Como tal, se han modificado por ingeniería microorganismos para aumentar la producción de derivados de ácidos grasos a partir de materias primas renovables tales como glucosa u otras fuentes de carbono. En el presente documento, el objetivo principal es aumentar la actividad de las enzimas de control clave que regulan la producción de derivados de ácidos grasos para convertir la cepa bacteriana en una fábrica de microbios para la producción de derivados de ácidos
- 50 grasos, incluyendo ácidos grasos, ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) (véase, p.ej., la Patente de EE. UU. N.º 8.283.143).

- Los microorganismos o células microbianas expresan polinucleótidos que codifican polipéptidos de función enzimática para modificar las vías enzimáticas para la producción de derivados de ácidos grasos deseables que sirven como
- 55 precursores microbianos. Estos polipéptidos, que se identifican en el presente documento por los Números de Registro de Enzimas (números EC), son útiles para modificar por ingeniería las vías de ácidos grasos que conducen a la producción de derivados de ácidos grasos. La tabla 1 a continuación muestra los números EC de enzimas que son útiles en la modificación por ingeniería de tales vías de ácidos grasos.

60

Tabla 1: Actividades enzimáticas

Designación del gen	Organismo Fuente	Nombre de la Enzima	N.º de Registro	Número de EC	Uso Ejemplar
Aumento de la Producción de Ácidos Grasos					
accA	<i>E. coli, 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, Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad B (BCCP: proteína portadora de carboxilo de biotina)	NP_417721	6.4.1.2	aumento de la producción de Malonil-CoA
accC	<i>E. coli, 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, Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad D (carboxiltransferasa beta)	NP_416819	6.4.1.2	aumento de la producción de Malonil-CoA
fadD	<i>E. coli W3110</i>	acil-CoA sintasa	AP_002424	2.3.1.86, 6.2.1.3	Aumento de la producción de ácidos grasos
fabA	<i>E. coli K12</i>	β -hidroxidecanoil tioéster deshidratasa/isomerasa	NP 415474	4.2.1.60	aumento de la producción de acil-ACP/CoA grasa
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 grasa
fabd	<i>E. coli K12</i>	[acil-proteína portadora] S-maloniltransferasa	AAC74176	2.3.1.39	aumento de la producción de acil-ACP/CoA grasa
fabF	<i>E. coli K12</i>	3-oxoacil-[acil-proteína portadora] sintasa II	AAC74179	2.3.1.179	aumento de la producción de acil-ACP/CoA grasa
fabG	<i>E. coli K72</i>	3-oxoacil-[acil-proteína portadora] reductasa	AAC74177	1.1.1.100	aumento de la producción de acil-ACP/CoA grasa
fabH	<i>E. coli K12</i>	3-oxoacil-[acil-proteína portadora] sintasa III	AAC74175	2.3.1.180	aumento de la producción de acil-ACP/CoA grasa
fabI	<i>E. coli K12</i>	enoil-[acil-proteína portadora] reductasa	NP_415804	1.3.1.9	aumento de la producción de acil-ACP/CoA grasa
fabR	<i>E. coli K12</i>	Represor de la transcripción	NP_418398	ninguno	modulación de la producción de ácidos grasos insaturados

(continuación)

Designación del gen	Organismo Fuente	Nombre de la Enzima	N.º de Registro	Número de EC	Uso Ejemplar
Aumento de la Producción de Ácidos Grasos					
fabV	<i>Vibrio cholerae</i>	enoil-[acil-proteína portadora] reductasa	YP_001217283	1.3.1.9	aumento de la producción de acil-ACP/CoA grasa
fabZ	<i>E. coli K12</i>	(3R)-hidroximiristol acil proteína portadora deshidratasa	NP_414722	4.2.1.-	aumento de la producción de acil-ACP/CoA grasa
fadE	<i>E. coli K13</i>	acil-CoA deshidrogenasa	AAC73325	1.3.99.3, 1.3.99.-	reducción de la degradación de ácidos grasos
fadD	<i>E. coli K72</i>	acil-CoA sintetasa	NP_416319	6.2.1.3	reducción de la degradación de ácidos grasos
fadA	<i>E. coli K12</i>	3-cetoacil-CoA tiolasa	YP_02627	2.3.1.16	reducción de la degradación de ácidos grasos
fabb	<i>E. coli K12</i>	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
Control de la Longitud de Cadena					
tesA (con o sin secuencia de líder)	<i>E. coli</i>	Tioesterasa - la secuencia líder es la de los aminoácidos 1-26	P0ADA1	3.1.2.-, 3.1.1.5	Longitud de cadena de C18
tesA (sin secuencia líder)	<i>E. coli</i>	tioesterasa	AAC73596, NP_415027	3.1.2.-, 3.1.1.5	Longitud de la cadena de C18:1
tesA (mutante de tioesterasa I de <i>E. coli</i> complejada con ácido octanoico)	<i>E. coli</i>	tioesterasa	L109P	3.1.2.-, 3.1.1.5	Longitud de cadena <C18
fatB1	<i>Umbellularia californica</i>	tioesterasa	Q41635	3.1.2.14	Longitud de la cadena de C12:0
fatB2	<i>Cuphea hookeriana</i>	tioesterasa	AAC49269	3.1.2.14	Longitud de cadena de C8:0-C10:0
fatB3	<i>Cuphea hookeriana</i>	tioesterasa	AAC72881	3.1.2.14	Longitud de cadena de C14:0-C16:0
fatB	<i>Cinnamomum camphora</i>	tioesterasa	Q39473	3.1.2.14	Longitud de la cadena de C14:0
fatB	<i>Arabidopsis thaliana</i>	tioesterasa	CAA85388	3.1.2.14	Longitud de la cadena de C16:1

(continuación)

Designación del gen	Organismo Fuente	Nombre de la Enzima	N.º de Registro	Número de EC	Uso Ejemplar
Control de la Longitud de Cadena					
fatB1	<i>Unebellularia californica</i> .	tioesterasa	Q41635	3.1.2.14	Longitud de la cadena de C12:0
fatA1	<i>Helianthus annuus</i>	tioesterasa	AAL79361	3.1.2.14	Longitud de la cadena de C18:1
fatA3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	tioesterasa	NP_189147, NP_193041	3.1.2.14	Longitud de la cadena de C18:1
fatA	<i>Brassica juncea</i>	tioesterasa	CAC39106	3.1.2.14	Longitud de la cadena de C18:1
fatA	<i>Cuphea hookeriana</i>	tioesterasa	AAC72883	3.1.2.14	Longitud de la cadena de C18:1
tes	<i>Photobacterium profundum</i>	tioesterasa	YP_130990	3.1.2.14	Longitud de Cadena
tesB	<i>E. coli</i>	tioesterasa	NP_414986	3.1.2.14	Longitud de Cadena
fadM	<i>E. coli</i>	tioesterasa	NP_414977	3.1.2.14	Longitud de Cadena
yciA	<i>E. coli</i>	tioesterasa	NP_415769	3.1.2.14	Longitud de Cadena
ybgC	<i>E. coli</i>	tioesterasa	NP_415264	3.1.2.14	Longitud de Cadena
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 K12</i>	β -hidroxidecanoil tioéster deshidratasa/isomerasa	NP_415474	4.2.1.60	Producción de ácidos grasos insaturados
GnsA	<i>E. coli</i>	supresores de la mutación nula secG	ABD18647.1	ninguno	aumento ésteres de ácidos grasos insaturados
GnsB	<i>E. coli</i>	supresores de la mutación nula secG	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)

Designación del gen	Organismo Fuente	Nombre de la Enzima	N.º de Registro	Número de EC	Uso Ejemplar
Producción de Ésteres					
AT3G51970	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O-grasa-aciltransferasa de alcohol de cadena larga	NP_190765	2.3.1.26	producción de ésteres
ELO1	<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>	alcohol de cera acil-CoA aciltransferasa	AAX48018	2.3.1.20	producción de ésteres
aft1	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	éster de cera bifuncional sintasa/acil-CoA: diacilglicerol aciltransferasa	AAO17391	2.3.1.20	producción de ésteres
ES9	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasti CUS</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					
		tioesterasas (véase lo anterior)			aumento de la producción de ácidos grasos/alcoholes grasos
BmFAR	<i>Bombyxmori</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
alrA	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	Alcohol deshidrogenasa	CAG70252	1.1.-.-	reducción de aldehídos grasos en alcoholes grasos
BmFAR	<i>Bombyxmori</i>	FAR (acil-CoA reductasa formadora de alcoholes grasos)	BAC79425	1.1.1.-	reducción de acil-CoA graso en alcohol graso

(continuación)

Designación del gen	Organismo Fuente	Nombre de la Enzima	N.º de Registro	Número de EC	Uso Ejemplar
Producción de Alcoholes Grasos					
GTNG_1865	<i>Geobacillus thermocentrificans</i> NG80-2	aldehído deshidrogenasa de cadena larga	YP_001125970	1.2.1.3	reducción de aldehídos grasos en alcoholes grasos
AAR	<i>Synechococcus elongatus</i>	Acyl-ACP reductasa	YP 400611	1.2.1.42	reducción de acil-ACP/CoA graso 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</i> K12	acil-CoA sintetasa	NP_416319	6.2.1.3	activación de los ácidos grasos a acil-CoA grasos
atoB	<i>Erwinia carotovora</i>	acetil-CoA acetiltransferasa	YP_049388	2.3.1.9	producción de butanol
hbd	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Beta-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa	BAD51424	1.1.1.157	producción de butanol
CPE0095	<i>Clostridium perfringens</i>	crotonasabutiril-CoA deshidrogenasa	BAB79801	4.2.1.55	producción de butanol
bcd	<i>Clostridium beijerinckii</i>	butiril-CoA deshidrogenasa	AAM14583	1.3.99.2	producción de butanol
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	tioesterasas de aldehído-alcohol deshidrogenasa (véase lo anterior)	AAN80172	1.1.1.1 1.2.1.10	la producción de butanol modificación de la producción
Producción de Acetil Éster de Alcohol Graso					
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 x ananassa</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

(continuación)

Designación del gen	Organismo Fuente	Nombre de la Enzima	N.º de Registro	Número de EC	Uso Ejemplar
Exportación de Productos					
AtMRP5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabidopsis thaliana asociada a la resistencia a múltiples fármacos	NP_171908	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
AmiS2	<i>Rhodococcus sp.</i>	Transportador de ABC AmiS2	JC5491	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
AtPGP1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	p glucoproteína 1 de Arabidopsis thaliana	NP_181228	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
AcrA	<i>CandidatusProtoch amydiaamoebophila UWE25</i>	supuesta proteína de transporte de salida de múltiples fármacos, acrA	CAF23274	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
AcrB	<i>CandidatusProtoch amydiaamoebophila UWE25</i>	probable proteína de transporte de salida de múltiples fármacos, acrB	CAF23275	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
ToIC	<i>Francisellatularens s subsp. novicida</i>	Proteína de membrana externa [biogénesis de la envoltura celular,	ABD59001	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
AcrE	<i>Shigellasonnei SsO46</i>	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 Acriflavina	P24181	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
tII1619	<i>Thermosynechococcus elongatus [BP-1]</i>	transportador de salida de múltiples fármacos	NP_682409.1	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
tII0139	<i>Thermosynechococcus elongatus [BP-1]</i>	transportador de salida de múltiples fármacos	NP_680930.1	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
Fermentación					
Genes de puntos de control de la replicación					aumento de la eficacia de la producción
umuD	<i>Shigellasonnei SsO46</i>	ADN polimerasa V, subunidad	YP_310132	3.4.21,-	aumento de la eficacia de la producción
umuC	<i>E. coli</i>	ADN polimerasa V, subunidad	ABC42261	2.7.7.7	aumento de la eficacia de la producción

(continuación)

Designación del gen	Organismo Fuente	Nombre de la Enzima	N.º de Registro	Número de EC	Uso Ejemplar
Fermentación					
pntA, pntB	<i>Shigella flexneri</i>	NADH:NADPH transhidrogenasa (subunidades alfa y beta)	P07001, P0AB70	1.6.1.2	aumento de la eficacia de la producción
Otras					
fabK	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	trans-2-enoil-ACP reductasa II	AAF98273	1.3.1.9	Contribución a la biosíntesis de ácidos grasos
fabL	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	enoil-(acil proteína portadora) reductasa	AAU39821	1.3.1.9	Contribución a la biosíntesis de ácidos grasos
fabM	<i>Streptococcus mutans</i>	trans-2, cis-3-decenoil-ACP isomerasa	DAA05501	4.2.1.17	Contribución a la biosíntesis de ácidos grasos

A continuación se analizan ejemplos de derivados de ácidos grasos deseables que servirán como precursores microbianos para el proceso quimioenzimático. Estos derivados de ácidos grasos son producidos por los microorganismos recombinantes que comprenden una vía biosintética de ácidos grasos modificada que comprende una ω -hidroxilasa u oxigenasa de EC 1.14.15.3 utilizada en el proceso de la presente divulgación. Las funcionalidades enzimáticas y las vías bioquímicas analizadas a continuación son ejemplos ilustrativos de cómo se pueden manipular los microorganismos. Un experto reconocerá que hay realizaciones alternativas de determinadas funcionalidades enzimáticas que se pueden combinar para lograr la producción de derivados de ácidos grasos.

Derivados de Ácidos Grasos de Cadena Impar y Par

Las células de *E. coli* sintetizan naturalmente incluso, ácidos grasos de cadena lineal para la biosíntesis de membrana. Sin embargo, se pueden modificar por ingeniería microorganismos recombinantes (p. ej. *E. coli*) para producir derivados de ácidos grasos de cadena impar a partir de materias primas basadas en carbono. Además, las cepas con determinadas modificaciones se pueden combinar para producir derivados de ácidos grasos de cadena lineal impar. En una realización, las cepas de *E. coli* recombinantes que sintetizan predominantemente ácidos grasos de cadena lineal impar a partir de materias primas basadas en carbono tienen la actividad de una 3-oxoacil-[acil-proteína-portadora] sintasa III (FabH) endógena específica de acetil-CoA atenuada (EC 2.3.1.180) y la actividad de una 3-oxoacil-[acil-proteína-portadora] sintasa III con amplia especificidad de sustrato aumentada, p.ej., FabH1 de *Bacillus subtilis* puede sobreexpresarse. En otras realizaciones, las cepas modificadas pueden tener una actividad modificada adicional de enzimas de la vía de biosíntesis de treonina, p.ej., aspartato cinasa I homoserina deshidrogenasa I (ThrA), homoserina cinasa (ThrB) y treonina sintasa (ThrC) y/o una actividad modificada de enzimas de la vía de biosíntesis de leucina, p.ej., 3-isopropilmalato deshidrogenasa (LeuB), isopropilmalato (IPM) isomerasa e isopropilmalato (IPM) isomerasa (LeuD) y/o una actividad modificada de treonina desaminasa (IlvA) o treonina deshidratasa (TdcB). Dichas cepas también pueden tener una citramalato sintasa (CimA) sobreexpresada, p.ej., de *Methanococcus jannaschii* (véase, p. ej., la Patente de EE. UU. N.º 8.372.610).

Derivados de Ácidos Grasos de Cadena Ramificada

Se pueden modificar por ingeniería microorganismos recombinantes (p. ej. *E. coli*) para producir derivados de ácidos grasos de cadena ramificada a partir de materias primas basadas en carbono. Por ejemplo, cepas de *E. coli* que sintetizan ácidos grasos ramificados con metilo de cadena par e impar, a partir de materias primas basadas en carbono pueden tener modificaciones además de las que permiten a *E. coli* sintetizar ácidos grasos de cadena impar. En una realización, tales cepas sobreexpresan un complejo de enzimas deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada (Bkd) y una lipoamida deshidrogenasa (lpd), p.ej., de *Pseudomonas putida*. En otra realización, tales cepas también tienen una actividad modificada de enzimas de la vía de biosíntesis de isoleucina, p.ej., acetohidroxiácido isómero-orreductasa (IlvC), dihidroxiácido deshidratasa (ilvD) y acetohidroxiácido sintasa II (IlvGM) (véase, p.ej., la Patente de EE. UU. N.º 8.530.221). En otras realizaciones, las cepas expresan funcionalidades enzimáticas de tipo Bkd y de tipo lpd similares y/o combinaciones de las mismas para producir derivados de ácidos grasos de cadena ramificada.

Derivados de Ácidos Grasos Insaturados

La mayoría de los microorganismos (p. ej. *E. coli*) sintetiza naturalmente ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Pueden modificarse por ingeniería microorganismos recombinantes (p. ej. cepas de *E. coli*) para sobreproducir o subproducir derivados de ácidos grasos insaturados a partir de materias primas basadas en carbono. En una realización, la relación de ácidos grasos saturados a monoinsaturados saturados puede alterarse modificando la actividad de determinadas proteínas reguladoras de la transcripción, p.ej., FadR y FabR y/o modificando directamente la actividad enzimática de la (3R)-hidroximiristoil acil proteína portadora deshidratasa (FabZ) (EC 4.2.1.-), β -hidroxidecanoil tioéster deshidratasa/isomerasa (FabA) (EC 4.2.1.60) y 3-oxoacil-[acil-proteína portadora] sintasa I (FabB) (EC 2.3.1.41). En otra realización, el nivel de insaturación puede incrementarse aún más por la sobreexpresión de desaturasas (EC 1.14.19). Dichas cepas pueden sintetizar ácidos grasos mono o doblemente insaturados. En otra realización más, tales cepas también sobreexpresan determinadas ferredoxinas y/o ferredoxinas reductasas. De este modo, cuando se combinan cepas que tienen modificación específica (*supra*), se pueden producir cantidades aumentadas o disminuidas de derivados de ácidos grasos insaturados (véase, p.ej., la Publicación internacional PCT N.º WO2013/019647).

Ácidos Grasos

Se pueden modificar por ingeniería microorganismos recombinantes (p. ej. cepas de *E. coli*) para sobreproducir ácidos grasos a partir de materias primas basadas en carbono. En una realización, un microorganismo recombinante tiene una actividad enzimática de tioesterasa modificada (EC 3.1.2.14). Por ejemplo, la producción de ácidos grasos se puede aumentar desregulando o modificando determinadas tioesterasas endógenas (por ejemplo, TesA) o sobreexpresando tioesterasas exógenas (por ejemplo, FatB1 de *Umbellularia California*) (véase, p. ej., la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2010/0154293). En otra realización, la cepa incluirá una funcionalidad enzimática similar (p. ej., similar de tipo tioesterasa) para producir mayores cantidades de ácidos grasos.

Ésteres de Ácidos Grasos

Se pueden modificar por ingeniería microorganismos recombinantes (p. ej. cepas de *E. coli*) para sobreproducir ésteres de ácidos grasos a partir de materias primas basadas en carbono. En una realización, los microorganismos recombinantes (p. ej. cepas de *E. coli*) que producen ésteres grasos como el éster metílico de ácido graso (FAME) o el éster etílico de ácido graso (FAEE) a partir de materias primas basadas en carbono y metanol o etanol, respectivamente, sobreexpresan una éster sintasa (ES) (EC 2.3.1.20), p. ej., de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. En otras realizaciones, tales cepas también tienen una actividad enzimática tioesterasa modificada (TE) (EC 3.1.2.14) y una actividad de acil-CoA sintetasa modificada (FadD) (EC 6.2.1.3). Se puede lograr una actividad enzimática de tioesterasa modificada desregulando o modificando determinados genes endógenos de tioesterasa (p. ej., TesA) o sobreexpresando tioesterasas exógenas (p. ej., FatB1 de *Umbellularia California* o FatA3 de *Arabidopsis thaliana*) (véase, p.ej., la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2010/0242345 y 2011/0072714). En otra realización más, las cepas tienen una actividad enzimática de tioesterasa modificada y una actividad de éster sintasa modificada mediante la modificación por ingeniería de un microorganismo para sobreexpresar una enzima única como una tioesterasa capaz de producir mayores cantidades tanto de ácidos grasos como de ésteres grasos (véase, p.ej., la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 2010/0154293).

Ácidos Grasos 3-Hidroxi

Microorganismos recombinantes (p. ej. cepas de *E. coli*) pueden producir ácidos grasos 3-hidroxi a partir de materias primas basadas en carbono. En una realización, los microorganismos recombinantes que producen ácidos grasos 3-hidroxi tienen una actividad enzimática de tioesterasa modificada (EC 3.1.2.14). Esta actividad enzimática modificada se puede lograr desregulando o modificando determinados genes de tioesterasa endógenos (por ejemplo, TesB) o sobreexpresando tioesterasas exógenas (por ejemplo, FatB1 de *Umbellularia californica* o PhaG de *Pseudomonas putida*). En otra realización, la cepa incluirá una otra funcionalidad enzimática (p. ej., de tipo tioesterasa) para producir mayores cantidades de ácidos grasos 3-hidroxi.

Ésteres de Ácidos Grasos 3-Hidroxi

Microorganismos recombinantes (p. ej. cepas de *E. coli*) pueden producir ésteres de ácidos grasos 3-hidroxi a partir de materias primas basadas en carbono. En una realización, cepas de *E. coli* recombinantes que producen ésteres grasos 3-hidroxi tal como el éster metílico de ácido graso 3-hidroxi (3-OH FAME) o el éster etílico de ácido graso 3-hidroxi (3-OH FAEE) a partir de materias primas basadas en carbono y metanol o etanol, respectivamente, sobreexpresan una éster sintasa (ES) (EC 2.3.1.20), p. ej., de *Marinobacter hydro-carbonoclasticus*. Tales cepas también pueden tener actividad tioesterasa (TE) modificada (EC 3.1.2.14) y actividad acil-CoA sintetasa modificada (FadD) (EC 6.2.1.3). Una actividad enzimática tioesterasa modificada se puede lograr desregulando o modificando determinados genes de tioesterasa endógenos (por ejemplo, TesB) o sobreexpresando tioesterasas exógenas (p. ej., FatB1 de *Umbellularia californica* o PhaG de *Pseudomonas putida*). En otra realización, la cepa incluirá otras funcionalidades enzimáticas (p. ej., de tipo tioesterasa y/o de tipo éster sintasa) para producir mayores cantidades de ésteres grasos 3-hidroxi.

Ácidos Grasos ω-Hidroxi

Microorganismos recombinantes (p. ej. cepas de *E. coli*) pueden producir ácidos grasos ω-hidroxi a partir de materias primas basadas en carbono. En una realización, cepas de *E. coli* recombinantes que producen ácidos grasos ω-hidroxi tienen una actividad enzimática de tioesterasa modificada (EC 3.1.2.14) y sobreexpresan una ω-hidroxilasa/ω-oxigenasa, (EC 1.14.15.3) (véase Tabla 2A-2C a continuación), p.ej., una oxigenasa cyp153A híbrida (quimérica) autosuficiente. Se puede lograr una actividad enzimática de tioesterasa modificada desregulando o modificando determinados genes endógenos de tioesterasa (p. ej., TesA) o sobreexpresando tioesterasas exógenas (p. ej., FatB1 de *Umbellularia California* o FatA3 de *Arabidopsis thaliana*). En otras realizaciones, la cepa incluirá otras funcionalidades enzimáticas (p. ej., de tipo tioesterasa y/o de tipo ω-hidroxilasa/ω-oxigenasa) para producir mayores cantidades de ácidos grasos ω-hidroxi (véase, p.ej., la Publicación Internacional PCT N.º WO2014/201474A1).

Ésteres de Ácidos Grasos ω-Hidroxi

Microorganismos recombinantes (p. ej. cepas de *E. coli*) pueden producir ésteres de ácidos grasos ω-hidroxi a partir de materias primas basadas en carbono. En una realización, cepas de *E. coli* recombinantes que producen ésteres grasos ω-hidroxi tal como el éster metílico de ácido graso ω-hidroxi (ω-OH FAME) o el éster etílico de ácido graso ω-hidroxi (ω-OH FAEE) a partir de materias primas basadas en carbono y metanol o etanol, respectivamente, sobreexpresan una éster sintasa (ES) (EC 2.3.1.20), p. ej., de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* y una ω-hidroxilasa/ω-oxigenasa, (EC 1.14.15.3) (véase Tabla 2A-2C a continuación), p.ej., una oxigenasa cyp153A híbrida (quimérica) autosuficiente. tales cepas también pueden tener actividad tioesterasa (TE) modificada (EC 3.1.2.14) y una actividad acil-CoA sintetasa modificada (FadD) (EC 6.2.1.3). Se puede lograr una actividad enzimática de tioesterasa modificada desregulando o modificando determinados genes endógenos de tioesterasa (p. ej., TesA) o sobreexpresando tioesterasas exógenas (p. ej., FatB1 de *Umbellularia californica* o FatA3 de *Arabidopsis thaliana*). En otras realizaciones, la cepa incluirá otras funcionalidades enzimáticas (p. ej., de tipo tioesterasa y/o de tipo éster sintasa y/o de tipo ω-hidroxilasa/ω-oxigenasa) para producir mayores cantidades de ácidos grasos ω-hidroxi (véase, p.ej., la Publicación Internacional PCT N.º WO2014/201474 A1, *supra*).

Ácidos α,ω-Dicarboxílicos

Microorganismos recombinantes (p. ej. cepas de *E. coli*) pueden producir ácidos α,ω-dicarboxílicos a partir de materias primas basadas en carbono. En una realización, cepas de *E. coli* recombinantes que producen ácidos α,ω-dicarboxílicos tienen una actividad enzimática de tioesterasa modificada (EC 3.1.2.14) y sobreexpresan una ω-hidroxilasa/ω-oxigenasa, (EC 1.14.15.3) (véase Tabla 2A-2C a continuación), p.ej., una oxigenasa cyp153A híbrida (quimérica) autosuficiente. En otra realización, tales cepas abarcan oxidasas o deshidrogenasas adicionales, p.ej., alcohol oxidasa, alkJ y aldehído deshidrogenasa, alkH, de *Pseudomonas putida* (véase la Tabla 3A-3B a continuación) o versiones modificadas o sobreexpresadas de las mismas. Se puede lograr una actividad enzimática de tioesterasa modificada desregulando o modificando determinados genes endógenos de tioesterasa (p. ej., TesA) o sobreexpresando tioesterasas exógenas (p. ej., FatB1 de *Umbellularia californica* o FatA3 de *Arabidopsis thaliana*). En otras realizaciones, la cepa incluirá otras funcionalidades enzimáticas (p. ej., de tipo tioesterasa y/o de tipo ω-hidroxilasa/ω-oxigenasa y/o de tipo deshidrogenasa y/o de tipo oxidasa) para producir mayores cantidades de ácidos α,ω-dicarboxílicos (véase, p.ej., la Publicación Internacional PCT N.º WO2014/201474 A1, *supra*).

Esteres α,ω-Dicarboxílicos

Microorganismos recombinantes (p. ej. cepas de *E. coli*) pueden producir ésteres de ácidos α,ω-dicarboxílicos a partir de materias primas basadas en carbono. En una realización, cepas de *E. coli* recombinantes que producen ésteres α,ω-dicarboxílicos tal como el éster metílico de ácido graso ω-hidroxi (ω-OH FAME) o el éster etílico de ácido graso ω-hidroxi (ω-OH FAEE) a partir de materias primas basadas en carbono y metanol o etanol, respectivamente, sobreexpresan una éster sintasa (ES) (EC 2.3.1.20), p. ej., de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* y una ω-hidroxilasa/ω-oxigenasa, (EC 1.14.15.3) (véase Tabla 2A-2C a continuación), p.ej., una oxigenasa cyp153A híbrida (quimérica) autosuficiente y oxidasas o deshidrogenasas adicionales, p.ej., alcohol oxidasa, alkJ y aldehído deshidrogenasa, alkH, de *Pseudomonas putida* (véase la Tabla 3A-3B a continuación). En otra realización, tales cepas también tienen actividad tioesterasa (TE) modificada (EC 3.1.2.14) y actividad acil-CoA sintetasa modificada (FadD) (EC 6.2.1.3). Se puede lograr una actividad enzimática de tioesterasa modificada desregulando o modificando determinados genes endógenos de tioesterasa (p. ej., TesA) o sobreexpresando tioesterasas exógenas (p. ej., FatB1 de *Umbellularia californica* o FatA3 de *Arabidopsis thaliana*). En otras realizaciones, la cepa incluirá otras funcionalidades enzimáticas (p. ej., de tipo tioesterasa y/o de tipo éster sintasa y/o de tipo ω-hidroxilasa/ω-oxigenasa y/o de tipo deshidrogenasa y/o de tipo oxidasa) para producir mayores cantidades de ésteres α,ω-dicarboxílicos (véase, p.ej., la Publicación Internacional PCT N.º WO2014/201474 A1, *supra*).

Tabla 2A: Ejemplos de (ω -Hidroxilasa/ ω -Oxigenasa (EC 1.14.15.3/

Designación del gen	Organismo Fuente	N.º de registro	Sistema Rédox	Posición de hidroxilación
cyp153A (aciA)	<i>Acinetobacter</i> sp. OC4	BAE78452	operón con ferredoxina y ferredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
cyp153A16	<i>Mycobacterium marinum</i> M	YP_001851443	operón con ferredoxina y ferredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
cyp153A6	<i>Mycobacterium</i> sp. HXN-1500	AJ833989	operón con ferredoxina y ferredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
cyp153A	<i>Marinobacter aquaeoli</i> VT8	YP_957888	operón con ferredoxina y ferredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
alkB	<i>Pseudomonas putida</i> GPO1	CAB54050	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
alkB	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHAO	CAB51045	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
alkM	<i>Acinetobacter baylyi</i>	YP_046098	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
alkB	<i>Gordonia</i> sp. SoGc	ADT82701	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
alkW1	<i>Dietzia</i> sp. DQ12-45-1b	HQ850582	fusión de rubredoxina c-terminal, requiere rubredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
alkB	<i>Pseudomonas putida</i> Gpo1	CAB54050	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω -hidroxilasa
alkB	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHAO	CAB51045	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω -hidroxilasa

Tabla 2B: Ejemplos de Compañeros Redox para ω -Hidroxilasa/ ω -Oxigenasa (EC 1.14.15.3)

Designación/Nombre	Organismo	N.º de Registro
ferredoxina, ferredoxina reductasa	<i>Acinetobacter</i> sp. OC4	BAE78451, BAE78453
ferredoxina, ferredoxina reductasa	<i>Mycobacterium marinum</i> M	YP_001851444, YP_001851442
ferredoxina, ferredoxina reductasa	<i>Marinobacter aquaeoli</i> VT8	YP_957887, YP_957889
alkG, alkT	<i>Pseudomonas putida</i> Gpo1	CAB54052, CAB54063
rubA, rub	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	CAA86925, CAA86926

Tabla 2C: Ejemplos de ω -1, ω -2, ω -3-Hidroxilasa/Oxigenasa (EC 1.14.14.1) Autosuficientes

Designación del gen	Organismo Fuente	N.º de registro	Sistema Rédox	Posición de hidroxilación
P450-BM3 (cyp102A1)	<i>Bacillus megaterium</i>	AAA87602	proteína de fusión con dominio reductasa	ω -1.-2.-3 hidroxilación
yrhJ (cyp102A3)	<i>Bacillus subtilis</i>	NP_390594	proteína de fusión con dominio reductasa	ω -1.-2.-3 hidroxilación
yrhJ (cyp102A7)	<i>Bacillus licheniformis</i>	AAU41718	proteína de fusión con dominio reductasa	ω -1.-2.-3 hidroxilación

Tabla 3A: Ejemplos de Alcohol Deshidrogenasa (EC 1.1.1.1/2) o Alcohol Oxidasa (EC 1.1.3.13, EC 1.1.3.20)

Designación/Nombre	Organismo	N.º de Registro
alkJ	<i>Pseudomonas putida</i> GPo1	CAB54054
alkJ	<i>Alcanivorax borkumensis</i> AP1	CAC38030
cddC	<i>Rhodococcus ruber</i> SC1	AAL14237

Tabla 3B: Ejemplos de Aldehído Deshidrogenasa (EC 1.2.1.3/4/5) o Aldehído Oxidasa (EC 1.2.3.1)

Designación/Nombre	Organismo	N.º de Registro
alkH	<i>Pseudomonas putida</i> Gpo1	CAB51050
alkH	<i>Alcanivorax borkumensis</i> AP1	CAC38029
cddD	<i>Rhodococcus ruber</i> SC1	AAL14238

5 Modificaciones Metabólicas a través de Funcionalidades Enzimáticas Alteradas

FadR (véase la Tabla 1, *supra*) es un factor regulador clave implicado en la degradación de los ácidos grasos y las vías biosintéticas de los ácidos grasos (Cronan et al., (1998) Mol. Microbiol., 29(4): 937-943). La enzima FadD de *E. coli* (véase la Tabla 1, *supra*) y la proteína transportadora de ácidos grasos FadI son componentes de un sistema de captación de ácidos grasos. FadL media el transporte de los ácidos grasos a la célula bacteriana y FadD media la formación de acil-CoA ésteres. Cuando no hay otra fuente de carbono disponible, los ácidos grasos exógenos son captados por bacterias y convertidos en acil-CoA ésteres, que puede unirse al factor de transcripción FadR y deprimir la expresión de los genes *fad* que codifican las proteínas responsables del transporte (FadL), activación (FadD) y oxidación β (FadA, FadB y FadE,) de los ácidos grasos. Cuando hay fuentes alternativas de carbono disponibles, las bacterias sintetizan ácidos grasos como acil-ACP, que se usan para la síntesis de fosfolípidos, pero no son sustratos para la β -oxidación. De este modo, la acil-CoA y acil-ACP son fuentes independientes de ácidos grasos que pueden dar como resultado diferentes productos finales (Caviglia et al. (2004) J. Biol. Chem., 279(12): 1163-1169).

En una realización ilustrativa, las vías utilizan una materia prima renovable tal como la glucosa para producir derivados de ácidos grasos ω -hidroxi. La glucosa se convierte en un acil-ACP por el organismo natural. Los polinucleótidos que codifican polipéptidos con actividad enzimática de degradación de ácidos grasos pueden atenuarse opcionalmente dependiendo del producto deseado. Ejemplos no limitantes de dichos polipéptidos la acil-CoA sintetasa (FadD) y la acil-CoA deshidrogenasa (FadE). La Tabla 1 proporciona una lista completa de la actividad enzimática (*supra*) dentro de la vía metabólica, incluyendo distintas enzimas de degradación de ácidos grasos que pueden atenuarse opcionalmente de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

En otra realización ilustrativa, las vías utilizan una materia prima renovable tal como la glucosa para producir α,ω -diácidos. En una realización particular, un acil-ACP puede convertirse en un α,ω -diácido a través de dos vías similares, empleando un ácido graso sin C₁₂ como un precursor intermedio o un C₁₂ éster metílico de ácido graso (FAME) como intermedio.

Otra realización ilustrativa contempla la producción de varios compuestos químicos, incluidos los ácidos grasos ω -hidroxi, ácidos grasos ω -oxo y α,ω -diácidos. Para realizar esto, se emplea una tioesterasa para convertir acil-ACP en un ácido graso libre. En el presente documento, el gen que codifica la tioesterasa puede ser *tesA*, *'tesA*, *tesB*, *fatB1*, *fatB2*, *fatB3*, *fatA1*, o *fata* (véase también la Tabla 1, *supra*). Una ω -hidroxilasa también conocida como ω -oxigenasa puede usarse para generar ácidos grasos ω -hidroxi. Ejemplos de ω -hidroxilasas/ ω -oxigenasas adecuadas (EC 1.14.15.3) y sus compañeros redox se enumeran en las Tablas 2A y 2B (*supra*). Estas son determinadas dioxigenasas de hierro no hemo (p. ej. AlkB de *Pseudomonas putida* GPo1) o determinadas oxigenasas P450 de tipo hemo (p. ej., Cyp153A de *Marinobacter aquaeolei*) también conocido como citocromo P450s. Los citocromos P450 son enzimas distribuidas de manera generalizada, que poseen una alta complejidad y muestran un amplio campo de actividad. Son hemoproteínas codificadas por una superfamilia de genes que convierte una amplia variedad de sustratos y que catalizan una variedad de reacciones químicas interesantes. Cyp153A es una subfamilia de citocromo P450s bacteriano soluble que hidroxilan cadenas de hidrocarburos con alta selectividad por la posición ω (van Beilen et al. (2006) Appl. Environ. Microbiol. 72:59-65). Se ha demostrado *in vitro* que los miembros de la familia *cyp153A* hidroxilan selectivamente la posición ω de alcanos, ácidos grasos o alcoholes grasos, por ejemplo, *cyp153A6* de *Mycobacterium* sp. HXN-1500 (Funhoff et al. (2006) J. Bacteriol. 188:5220-5227), *cyp153A16* de *Mycobacterium marinum* y *cyp153A* de *Polaromonas* sp. JS666 (Scheps et al. (2011) Org. Biomol. Chem. 9:6727-6733), así como *cyp153A* de *Marinobacter aquaeoli* (Honda-Malca et al. (2012) Chem. Commun. 48:5115-5117).

De este modo, la presente divulgación proporciona procesos que usan microorganismos recombinantes que pueden producir de manera eficaz y selectiva derivados de ácido graso ω -hidroxi que incluyen derivados de ácidos grasos α,ω -bifuncionales *in vivo*. La vía de α,ω -diácidos a través de un éster metílico de ácido graso ω -hidroxi o una vía de

α,ω -diácidos a través de un dimetil éster de α,ω -ácido graso puede ser ventajosa, porque los ésteres metílicos no están cargados, lo que proporciona ventajas para la producción y recuperación a gran escala. Además, una alcohol deshidrogenasa u oxidasa puede convertir adicionalmente el ácido graso ω -hidroxi en un ácido graso ω -oxo (Tabla 3A, *supra*, muestra polipéptidos que tienen la actividad enzimática de una alcohol deshidrogenasa u oxidasa que puede usarse para catalizar esta etapa). Por ejemplo, enzimas adecuadas que pueden oxidar el ácido 12-hidroxi dodecanoico o el éster metílico del ácido 12-hidroxi dodecanoico a ácido 12-oxo dodecanoico o el éster metílico del ácido 12-oxo dodecanoico son alcohol oxidasas (flavoproteínas, p.ej., alkJ de *Pseudomonas putida*) (EC 1.1.3.13, EC 1.1.3.20) o alcohol deshidrogenasas dependientes de NA (P) (p. ej., CddC de *Rhodococcus ruber*) (EC 1.1.1.1) (véase la Tabla 3A, *supra*).

10 Microorganismos Recombinantes y Fermentación

Para producir derivados de ácidos grasos a través de una célula hospedadora, se pueden hacer varias modificaciones en las células hospedadoras de producción o en los microorganismos. (*supra*). De este modo, la divulgación proporciona procesos que usan células hospedadoras recombinantes que se han modificado por ingeniería para proporcionar vías de biosíntesis de ácidos grasos en relación con las células hospedadoras no modificadas por ingeniería o naturales (por ejemplo, células hospedadoras de tipo silvestre que funcionan como células de control), que se logra, por ejemplo, a través de mejoras de cepas específicas. Pueden usarse microorganismos tales como bacterias, cianobacterias, levadura, algas u hongos filamentosos como hospedadores de producción. Ejemplos no limitantes de microorganismos que pueden usarse como hospedadores de producción incluyen *E. coli*, *S. cerevisiae*, y otros (*infra*).

Las cepas microbianas convierten eficazmente la glucosa u otra materia prima renovable en ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos, tales como los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) y otros derivados de ácidos grasos (*supra*). Para lograr eso, las cepas están cuidadosamente modificadas por ingeniería para expresar enzimas clave, incluidas las tioesterasas (por ejemplo, TesA de *E. coli*) para la producción de ácidos grasos o éster sintasas (p. ej., ES9 de *M. hydrocarbonoclasticus*) para la producción de FAME o FAEE. Se han establecido protocolos y procedimientos para fermentaciones de alta densidad para la producción de diversos compuestos (véanse las Patentes de Estados Unidos N.º 8,372,610; 8,323,924; 8,313,934; 8,283,143; 8,268,599; 8,183,028; 8,110,670; 8,110,093; y 8,097,439).

Mediante el uso de técnicas de ingeniería genética, las etapas enzimáticas analizadas en el presente documento se pueden añadir a las células hospedadoras microbianas que pueden funcionar como biocatalizadores. En una realización, los productos de fermentación se secretan fuera de las células, permitiendo una fácil conversión a ingredientes de fragancia a través de métodos sintéticos. Determinadas etapas enzimáticas recombinantes se pueden combinar en una célula microbiana para la producción directa de derivados de ácidos grasos específicos. Cabe destacar que, no existían hasta ahora métodos para producir directa y eficazmente derivados de ácidos grasos ω -hidroxi tales como, por ejemplo, los bifuncionales, incluidos los α,ω -diácidos a partir de glucosa u otras materias primas renovables que no sean ácidos grasos exógenos o parafinas. Estos derivados de ácidos grasos bifuncionales son precursores adecuados para crear ingredientes de fragancia. El método basado en la fermentación para la producción de derivados de ácidos grasos, incluyendo derivados de ácidos grasos ω -hidroxi proporciona una alternativa rápida y respetuosa con el medio ambiente a los métodos químicos empleados en la técnica.

El presente método prevé la producción directa de derivados de ácidos grasos a partir de materiales derivados de biomasa renovable (es decir, materias primas renovables), tal como los carbohidratos de maíz, caña o biomasa lignocelulósica; o productos de desecho tal como el glicerol, gas de combustión, gas de síntesis; o la reformación de materiales orgánicos tal como biomasa o el gas natural o el dióxido de carbono. En eso, el método proporciona fuentes alternativas renovables para la producción de estos intermedios importantes. Debido a que el método permite que los compuestos se produzcan directa y selectivamente a partir de una materia prima renovable simple, existen ventajas definitivas desde la perspectiva del coste y la seguridad ambiental. El método incluye la producción de derivados de ácidos grasos proporcionando un microorganismo recombinante (por ejemplo, célula hospedadora) en un caldo de fermentación; añadiendo una materia prima renovable a un caldo de fermentación; y opcionalmente aislando el derivado de ácido graso del caldo de fermentación para convertirlos sintéticamente en productos químicos tales como lactonas y/o cetonas macrocíclicas, que proporcionan los componentes básicos para los ingredientes de fragancia. En una realización ilustrativa, la célula hospedadora de un microorganismo particular incluye una vía que se modificó por ingeniería para expresar al menos dos secuencias de un ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye una tioesterasa o una éster sintasa y una ω -hidroxilasa.

En algunas realizaciones, La célula hospedadora se cultiva en un medio de cultivo que comprende una concentración inicial de una fuente de carbono tal como una materia prima renovable de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 100 g/l. En otras realizaciones, el medio de cultivo comprende una concentración inicial de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 10 g/l de una fuente de carbono, de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 20 g/l de una fuente de carbono, de aproximadamente 20 g/l a aproximadamente 30 g/l de una fuente de carbono, de aproximadamente 30 g/l a aproximadamente 40 g/l de una fuente de carbono o de aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 50 g/l de una fuente de carbono. En algunas realizaciones, la fermentación puede monitorizarse por el nivel de fuente de carbono en el medio de cultivo. En algunas realizaciones, el método incluye además añadir una

fente de carbono complementaria al medio de cultivo cuando el nivel de la fuente de carbono en el medio es menos de aproximadamente 0,5 g/l. En algunas realizaciones, la fuente de carbono complementaria se añade al medio de cultivo cuando el nivel de la fuente de carbono en el medio es menos de aproximadamente 0,4 g/l, es menos de aproximadamente 0,3 g/l, menos de aproximadamente 0,2 g/l o menos de aproximadamente 0,1 g/l. En algunas realizaciones, la fuente de carbono suplementaria se añade para mantener un nivel de fuente de carbono de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 25 g/l. En algunas realizaciones, la fuente de carbono complementaria se añade para mantener un nivel de fuente de carbono de aproximadamente 2 g/l o más (por ejemplo, aproximadamente 2 g/l o más, aproximadamente 3 g/l o más, aproximadamente 4 g/l o más). En determinadas realizaciones, la fuente de carbono complementaria se añade para mantener un nivel de fuente de carbono de aproximadamente 5 g/l o menos (por ejemplo, aproximadamente 5 g/l o menos, aproximadamente 4 g/l o menos, aproximadamente 3 g/l o menos). En algunas realizaciones, la fuente de carbono suplementaria se añade para mantener un nivel de fuente de carbono de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 5 g/l, de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 10 g/l o de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 25 g/l. En algunas realizaciones, la fuente de carbono es glucosa u otro tipo de materia prima renovable tal como el glicerol.

En algunas realizaciones, el derivado de ácido graso se produce a una concentración de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 200 g/l. En algunas realizaciones, el derivado de ácido graso se produce a una concentración de aproximadamente 1 g/l o más (por ejemplo, aproximadamente 1 g/l o más, aproximadamente 10 g/l o más, aproximadamente 20 g/l o más, aproximadamente 50 g/l o más, aproximadamente 100 g/l o más). En algunas realizaciones, el derivado de ácido graso se produce a una concentración de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 170 g/l, de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 10 g/l, de aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 170 g/l, de aproximadamente 100 g/l a aproximadamente 170 g/l, de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 100 g/l, de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 40 g/l, de aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 100 g/l o de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 100 g/l.

En algunas realizaciones, el derivado de ácido graso se produce a un título de aproximadamente 25 mg/l, aproximadamente 50 mg/l, aproximadamente 75 mg/l, aproximadamente 100 mg/l, aproximadamente 125 mg/l, aproximadamente 150 mg/l, aproximadamente 175 mg/l, aproximadamente 200 mg/l, aproximadamente 225 mg/l, aproximadamente 250 mg/l, aproximadamente 275 mg/l, aproximadamente 300 mg/l, aproximadamente 325 mg/l, aproximadamente 350 mg/l, aproximadamente 375 mg/l, aproximadamente 400 mg/l, aproximadamente 425 mg/l, aproximadamente 450 mg/l, aproximadamente 475 mg/l, aproximadamente 500 mg/l, aproximadamente 525 mg/l, aproximadamente 550 mg/l, aproximadamente 575 mg/l, aproximadamente 600 mg/l, aproximadamente 625 mg/l, aproximadamente 650 mg/l, aproximadamente 675 mg/l, aproximadamente 700 mg/l, aproximadamente 725 mg/l, aproximadamente 750 mg/l, aproximadamente 775 mg/l, aproximadamente 800 mg/l, aproximadamente 825 mg/l, aproximadamente 850 mg/l, aproximadamente 875 mg/l, aproximadamente 900 mg/l, aproximadamente 925 mg/l, aproximadamente 950 mg/l, aproximadamente 975 mg/l, aproximadamente 1000 mg/l, aproximadamente 1050 mg/l, aproximadamente 1075 mg/l, aproximadamente 1100 mg/l, aproximadamente 1125 mg/l, aproximadamente 1150 mg/l, aproximadamente 1175 mg/l, aproximadamente 1200 mg/l, aproximadamente 1225 mg/l, aproximadamente 1250 mg/l, aproximadamente 1275 mg/l, aproximadamente 1300 mg/l, aproximadamente 1325 mg/l, aproximadamente 1350 mg/l, aproximadamente 1375 mg/l, aproximadamente 1400 mg/l, aproximadamente 1425 mg/l, aproximadamente 1450 mg/l, aproximadamente 1475 mg/l, aproximadamente 1500 mg/l, aproximadamente 1525 mg/l, aproximadamente 1550 mg/l, aproximadamente 1575 mg/l, aproximadamente 1600 mg/l, aproximadamente 1625 mg/l, aproximadamente 1650 mg/l, aproximadamente 1675 mg/l, aproximadamente 1700 mg/l, aproximadamente 1725 mg/l, aproximadamente 1750 mg/l, aproximadamente 1775 mg/l, aproximadamente 1800 mg/l, aproximadamente 1825 mg/l, aproximadamente 1850 mg/l, aproximadamente 1875 mg/l, aproximadamente 1900 mg/l, aproximadamente 1925 mg/l, aproximadamente 1950 mg/l, aproximadamente 1975 mg/l, aproximadamente 2000 mg/l (2 g/l), 3 g/l, 5 g/l, 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l o un intervalo limitado por cualquiera de los dos valores anteriores. En otras realizaciones, se produce un derivado de ácido graso ω a un título de más de 100 g/l, más de 200 g/l, más de 300 g/l o superior, tal como 500 g/l, 700 g/l, 1000 g/l, 1200 g/l, 1500 g/l o 2000 g/l. Un título preferido de derivado de ácido graso producido 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. En una realización, el título del derivado de ácido graso ω producido por una célula hospedadora recombinante de acuerdo con los métodos de la divulgación es de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 250 g/l y más particularmente, de 90 g/l a aproximadamente 120 g/l. El título puede referirse a un derivado de ácido graso particular o una combinación de derivados de ácidos grasos producidos por un cultivo de células hospedadoras recombinantes dado.

En otras realizaciones, las células hospedadoras diseñadas para producir derivados de ácidos grasos de acuerdo con los métodos de la divulgación tienen un rendimiento de al menos el 1 %, al menos el 2 %, al menos el 3 %, al menos el 4 %, al menos el 5 %, al menos el 6 %, al menos el 7 %, al menos el 8 %, al menos el 9 %, al menos el 10 %, al menos el 11 %, al menos el 12 %, al menos el 13 %, al menos el 14 %, al menos el 15 %, al menos el 16 %, al menos el 17 %, al menos el 18 %, al menos el 19 %, al menos el 20 %, al menos el 21 %, al menos el 22 %, al menos el 23 %, al menos el 24 %, al menos el 25 %, al menos el 26 %, al menos el 27 %, al menos el 28 %, al menos aproximadamente un 29 % o al menos aproximadamente un 30 % o al menos aproximadamente un 40 % o un intervalo limitado por dos cualquiera de los valores anteriores. En otras realizaciones, un derivado o derivados de ácido graso se produce con un rendimiento de más del 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más. 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. De este modo, el rendimiento puede estar limitado por dos cualquiera de los criterios de valoración anteriores. Por ejemplo, el rendimiento de un derivado o derivados de ácidos grasos producidos por la célula hospedadora recombinante de acuerdo con los métodos de la divulgación puede ser del 5 % al 15 %, del 10 % al 25 %, del 10 % al 22 %, del 15 % al 27 %, del 18 % al 22 %, del 20 % al 28 % o del 20 % al 30 %. En una realización particular, el rendimiento de un derivado o derivados de ácidos grasos producidos por la célula hospedadora recombinante es de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 40 %. En otra realización particular, el rendimiento de un derivado o derivados de ácidos grasos producidos por la célula hospedadora recombinante es de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 30 %. El rendimiento puede referirse a un derivado de ácido graso particular o una combinación de derivados de ácidos grasos producidos por un cultivo de células hospedadoras recombinantes dado. Además, el rendimiento también dependerá de la materia prima utilizada.

En algunas realizaciones, la productividad de un derivado o derivados de ácidos grasos producidos 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 o al menos 2500 mg/l/hora. Por ejemplo, la productividad de un derivado o derivados de ácidos grasos producidos por una célula hospedadora recombinante de acuerdo con los métodos de la divulgación puede ser de 500 mg/l/hora a 2500 mg/l/hora o de 700 mg/l/hora a 2000 mg/l/hora. En una realización, la productividad es de aproximadamente 0,7 mg/l/h a aproximadamente 3 g/l/h. La productividad puede referirse a un derivado de ácido graso particular o una combinación de derivados de ácido graso producidos por un cultivo de células hospedadoras recombinantes dado.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora se selecciona de una célula bacteriana, célula de levadura, célula de hongo y/o célula de hongo filamentoso. En realizaciones particulares, la célula hospedadora se selecciona del género *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Rhodococcus*, *Synechococcus*, *Synechoystis*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Tremella*, *Chrysosporium*, *Saccharomyces*, *Stenolophomonas*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia* o *Streptomyces*.

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 pumilus*, 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 determinadas realizaciones, la célula hospedadora es un *Synechococcus* sp. PCC7002, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Synechoystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus elongatus* PCC6301, *Prochlorococcus marinus* CCMP1986 (MED4), *Anabaena variabilis* ATCC29413, *Nostoc punctiforme* ATCC29133 (PCC73102), *Gloeobacter violaceus* ATCC29082 (PCC7421), *Nostoc* sp. ATCC27893 (PCC7120), *Cyanothece* sp. PCC7425 (29141), *Cyanothece* sp. ATCC51442 o *Synechococcus* sp. ATCC27264 (PCC7002). En otras realizaciones, 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 *Rhizomucormiehei* o una célula de *Mucormiehei*. En otras realizaciones, la célula hospedadora es una célula de *Actinomycetes*. En otras realizaciones más, la célula hospedadora es una célula de *Streptomyces lividans* o una célula de *Streptomyces murinus*. En otras realizaciones, la célula hospedadora es una célula de *Saccharomyces cerevisiae*.

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

Las células o microorganismos hospedadores microbianos de origen no natural pueden contener alteraciones genéticas estables. Estos microorganismos pueden cultivarse durante más de cinco generaciones sin pérdida de la alteración. Por lo general, las alteraciones genéticas estables incluyen modificaciones que persisten por más de 10 generaciones, modificaciones particularmente estables persistirán más de aproximadamente 25 generaciones o más de 50 generaciones, incluyendo indefinidamente.

Los expertos en la materia entenderán que las alteraciones genéticas, incluidas las modificaciones metabólicas ejemplificadas en el presente documento pueden describirse con respecto a un organismo de referencia, tal como *E. coli* y sus correspondientes reacciones metabólicas. Sin embargo, dada la secuenciación completa del genoma de una amplia variedad de organismos y el alto nivel de habilidad en el área de la genómica, los expertos en la materia podrán aplicar fácilmente las enseñanzas y la orientación proporcionadas en el presente documento a muchos otros organismos. Por ejemplo, las alteraciones metabólicas ejemplificadas en el presente documento pueden aplicarse fácilmente a otras especies incorporando el mismo ácido nucleico codificante o análogo de especies distintas de las especies de referencia. Dichas alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, alteraciones genéticas de especies homólogas, en general y en particular, desplazamientos de genes ortólogos parálogos o no ortólogos.

Se proporcionan procesos quimioenzimáticos para preparar uno o más productos de lactonas (por ejemplo, gamma o delta lactona), uno o más productos de macrolactonas o uno o más productos de cetonas macrocíclicas. Estos procesos incluyen (i) cultivar un organismo microbiano de origen no natural que incluye un conjunto de modificaciones metabólicas para la producción de derivados de ácidos grasos, incluyendo el conjunto de modificaciones metabólicas (a) una tioesterasa, (b) una omega hidroxilasa y opcionalmente (c) una éster sintasa, proporcionando el organismo microbiano uno o más derivados de ácidos grasos, en donde la etapa de cultivo se realiza en una materia prima basada en carbono, en donde el al menos un tipo de derivado de ácido graso incluye un ácido graso funcionalizado por hidroxilación, insaturación, esterificación o combinaciones de las mismas y (ii) poner el contacto *ex vivo* los derivados de ácidos grasos con un reactivo no enzimático en condiciones suficientes para producir un producto de lactonas, de macrolactonas o de cetonas macrocíclicas. En algunas realizaciones, los métodos divulgados en el presente documento incluyen además aislar los derivados de ácidos grasos antes de la etapa de contacto. En algunas realizaciones, los productos se secretan y los derivados de ácidos grasos se pueden aislar mediante cualquier combinación de centrifugación, decantación, extracción, filtración y similares. En algunas realizaciones, los derivados de ácidos grasos se secretan por la célula y la etapa de contacto se realiza sin aislar los derivados de ácidos grasos de la etapa de cultivo.

Transformaciones Químicas

I. Materiales de Partida y Precursores

La utilización de los organismos anteriormente mencionados proporciona acceso a numerosos materiales biosintéticos en forma de derivados de ácidos grasos. Los derivados de ácidos grasos se usan como precursores para las transformaciones orgánicas sintéticas posteriores en compuestos valiosos. En algunas realizaciones, el derivado de ácido graso incluye, pero sin limitación, un ácido graso insaturado, un éster de ácido graso insaturado, un ácido graso ω -hidroxi, un ácido graso ω -hidroxi insaturado, un éster de ácido graso ω -hidroxi, un éster de ácido graso ω -hidroxi insaturado, un ácido graso 3-hidroxi, un ácido graso 3-hidroxi insaturado, un éster de ácido graso 3-hidroxi, un éster de ácido graso 3-hidroxi insaturado y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, los derivados de ácidos grasos que son insaturados son monoinsaturados. Por ejemplo, los ésteres de ácidos grasos insaturados pueden ser monoinsaturados. En algunas de tales realizaciones, los ésteres de ácidos grasos insaturados pueden ser ésteres metílicos de ácidos grasos insaturados (FAME) y ésteres etílicos de ácidos grasos insaturados (FAEE). De este modo, pueden proporcionarse FAME insaturados o FAEE insaturados que son monoinsaturados. En algunas realizaciones, puede proporcionarse acceso a ésteres de ácidos grasos insaturados que se seleccionan de FAME insaturados y FAEE insaturados. En algunas realizaciones, se puede proporcionar acceso biosintético a los ácidos grasos ω -hidroxi insaturados que son monoinsaturados.

En algunas realizaciones, puede proporcionarse acceso a ésteres de ácidos grasos 3-hidroxi que son ésteres metílicos de ácidos grasos 3-hidroxi (3-OH FAME) o ésteres etílicos de ácidos grasos 3-hidroxi (3-OH FAEE). En algunas realizaciones, los ésteres de ácidos grasos ω -hidroxi pueden ser ésteres metílicos de ácidos grasos omega-hidroxi (ω -OH FAME) o ésteres etílicos de ácidos grasos omega-hidroxi (ω -OH FAEE). En algunas realizaciones, los ésteres de ácidos grasos omega-hidroxi insaturados pueden ser monoinsaturados. En algunas realizaciones, los ésteres de ácidos grasos omega-hidroxi monoinsaturados pueden incluir, pero sin limitación, ésteres metílicos de ácidos grasos ω -hidroxi monoinsaturados (ω -OH FAME monoinsaturados) y ésteres etílicos de ácidos grasos ω -hidroxi monoinsaturados (ω -OH FAEE monoinsaturados). En algunas realizaciones, un ácido graso 3-hidroxi insaturado también puede ser monoinsaturado. En algunas realizaciones, un éster de ácido graso 3-hidroxi puede ser un éster metílico de ácido graso 3-hidroxi (3-OH FAME) o un éster etílico de ácido graso 3-hidroxi (3-OH FAEE). En algunas realizaciones, un éster de ácido graso insaturado 3-hidroxi puede ser monoinsaturado. En algunas realizaciones, el éster de ácido graso 3-hidroxi monoinsaturado puede ser un 3-OH FAME monoinsaturado o una 3-OH FAEE monoinsaturado. En algunas realizaciones, los α,ω -diácidos insaturados o los ésteres α,ω -diácidos insaturados

pueden ser monoinsaturados. Dichos ésteres de α,ω -diácidos monoinsaturados pueden ser ésteres de semiácidos, tales como ésteres metílicos o etílicos de semiácidos. En otras realizaciones, el éster de α,ω -diácido monoinsaturado puede ser un diéster, tal como un diéster metílico o un diéster etílico. En algunas realizaciones, el derivado de ácido graso puede incluir una cadena de carbono de número impar, ramificación de metilo o combinaciones de las mismas.

5

II. Reactivos

En vista de la variedad de materiales de partida derivados de ácidos grasos proporcionados por los microorganismos recombinantes que comprenden una vía biosintética de ácidos grasos modificada que comprende una ω -hidroxilasa u oxigenasa de EC 1.14.15.3 utilizada en los procesos divulgados, el acceso a productos orgánicos valiosos se puede lograr fácilmente. En general, las transformaciones orgánicas posteriores abarcan una o más manipulaciones posteriores a la biosíntesis. El reactivo puede ser no enzimático. En una realización, el reactivo es un ácido prótico. Ejemplos de un ácido prótico incluyen, pero sin limitación, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico. En otra realización, el reactivo es un ácido de resina recuperable. En otras realizaciones, el reactivo es un ácido de Lewis. En algunas de tales realizaciones, el ácido de Lewis puede ser un catalizador de transesterificación de organostanano, sales de magnesio, cobre o zinc, triflato de plata y zeolitas. Ejemplos de ácidos de Lewis incluyen, sin limitación, LiBr, MgBr₂, CsBr, ZnBr₂, ZnCl₂, CuBr, Cu(CF₃SO₄)₂, BF₃OEt₂, KBr, TiCl₄, SnCl₂, ScCl₃, VC₁₃, AlCl₃, InCl₃, Al₂CO₃, CeCl₃, Ag₂O, ZnClO₄, LiClO₄, Ti{OCH(CH₃)₂}₄ y cualquier complejo y combinación de los mismos. En otras realizaciones más, el reactivo puede ser un agente de acoplamiento de péptidos. En algunas de tales realizaciones, el agente de acoplamiento de péptidos puede ser compatible con sistemas acuosos que facilitan las reacciones directamente en un caldo de cultivo. De este modo, por ejemplo, tales reactivos pueden incluir reactivos de carbodiimida solubles en agua. Los agentes de acoplamiento pueden incluir, sin limitación, carbodiimidas tal como N,N-diciclocarbodiimida (DCC), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbonato (EDC), que puede usarse opcionalmente con un agente activador de acilo tal como hidroxibenzotriazol (HOBT), reactivos de fosfonio y uronio tal como benzotriazol-1-il-oxi-tris (dimetilamino) fosfonio hexafluorofosfato (BOP) o su variante de tris-pirrolidina (PyBOP), O-benzotriazol-1-il-N,N,2-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU) o variante de O-piridotriazolilo (HATU) o reactivos basados en oxima tales como etil ciano(hidroxiimino)acetato-O2-tri-(1-pirrolidinil)-fosfonio hexafluorofosfato(PyOxim) o su variante de dimetilamino-morfolino (COMU).

10

15

20

25

30

III. Lactonas

En algunas realizaciones, la lactona es una gamma-lactona (γ -lactona), una delta-lactona (δ -lactona) o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, el recuento total de carbono de dichos productos puede ser de C₈ a C₁₈. A modo de ejemplo, el triflato de plata se ha utilizado en la activación directa de ácidos grasos insaturados como se indica en el Esquema I a continuación (véase, p.ej., Goossen et al. (2010) Green Chem. 12:197-200).

35

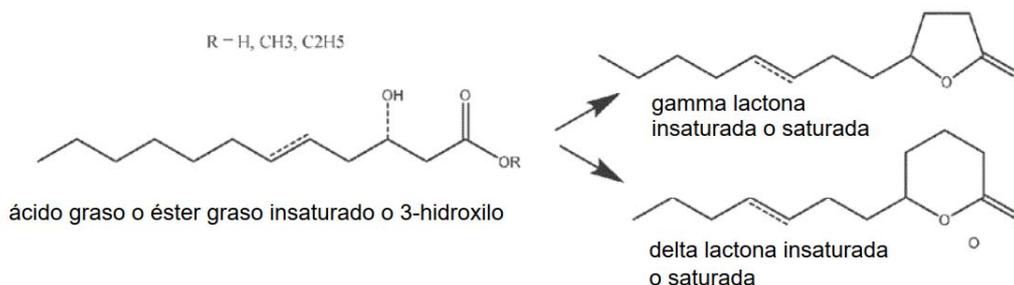
Esquema I



Los ácidos próticos también se han indicado para proporcionar productos de lactonas (véase, p.ej., Isbell et al. (1997) J. Am. Oil Chemists Soc. 74(2):153-158). En algunas realizaciones, el acceso a γ - y δ -lactonas, tanto saturadas como puede ser accesibles insaturadas desde, por ejemplo, derivados de ácidos grasos sustituidos con 3-hidroxi por deshidratación e lactonización desconjugativa, como se indica en el Esquema II a continuación.

40

Esquema II



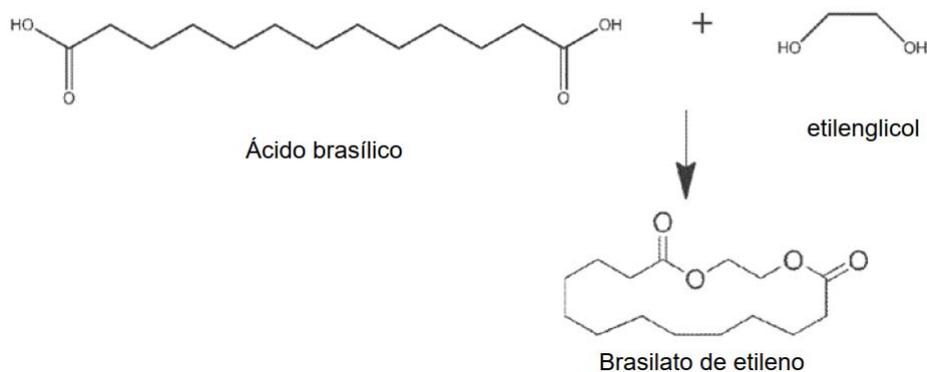
Las gamma lactonas son particularmente accesibles a partir de derivados de ácidos grasos 3-hidroxi saturados e insaturados a través de la expansión del anillo de la beta-lactona correspondiente tras el tratamiento con un ácido de Lewis (véase, p.ej., Mulzer et al. (1979) *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.*, 18:793-794). El acceso a beta lactona a partir de los derivados de ácidos grasos 3-hidroxi se puede lograr mediante el tratamiento del ácido 3-hidroxi con cloruro de arilsulfonilo/piridina. En realizaciones alternativas, se puede incorporar una funcionalidad beta lactona en la secuencia biosintética. En condiciones suaves, tal como el bromuro de magnesio a temperatura ambiente, las beta lactonas pueden sufrir un reordenamiento diotrópico catalizado por ácido de Lewis (impulsado por la liberación de la tensión del anillo) a la gamma lactona correspondiente, como se indica en el Esquema III a continuación.

Esquema III



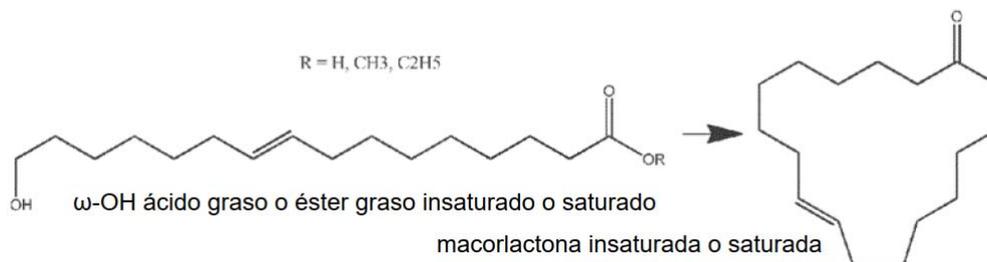
En algunas realizaciones, la lactona es una C₈ a C₁₈ macrolactona. Los productos de macrolactonas pueden incluir productos de dilactonas. De este modo, en algunas realizaciones, el material de partida para los productos de macrolactonas puede incluir ácidos o diácidos omega hidroxi (ω -OH) saturados o monoinsaturados o ésteres de semiácidos. El Esquema IV a continuación muestra un ejemplo de un producto de macrolactonas con dos funcionalidades de éster derivadas de un diácido.

Esquema IV



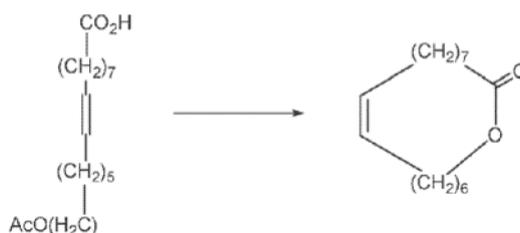
Un desafío en la macrolactonización ha sido la minimización de vías no deseadas de polímeros. Una forma de superar tales reacciones secundarias es realizar una dilución alta. En algunas realizaciones, la bioproducción de derivados de ácidos grasos con secreción del producto puede proporcionar de manera natural condiciones suficientemente diluidas susceptibles de llevar a cabo directamente la macrolactonización mediante la introducción de reactivos directamente en un caldo de cultivo. A modo de ejemplo, los métodos divulgados en el presente documento pueden proporcionar la producción biosintética de un ácido graso ω -hidroxi mediante el cultivo de un microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética de ácidos grasos modificada que comprende una ω -hidroxilasa u oxigenasa de EC 1.14.15.3, seguido de la adición de un agente de acoplamiento de péptido soluble en agua directamente en el caldo de cultivo. El reactivo empleado en la macrolactonización puede ser cualquiera de los reactivos de acoplamiento de péptidos mencionados anteriormente. (*supra*). Otros reactivos para efectuar tales transformaciones incluyen, anhídrido acético, pentafluorofenol, cloruro de 2,4-diclorobenzoilo y cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo, utilizando el llamado método de Yamaguchi (véase, p.ej., Inanaga et al. (1989) *M. Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1979:52). Se han descrito varios enfoques para las macrolactonas a partir de los ácidos grasos ω -hidroxi (véase, p.ej., la Patente de EE. UU. N.º 4.014.902). El esquema V a continuación muestra una macrolactonización ejemplar de un ácido graso (o éster) ω -hidroxi insaturado que puede ser accesible a través de cualquiera de los reactivos y métodos mencionados anteriormente.

Esquema V



En algunas realizaciones, se puede emplear un enfoque de polimerización y/o despolimerización para acceder a las estructuras de macrolactona (véase, p.ej., Spanagel et al. (1935) J. Am. Chem. Soc., 57:929-934). Esta técnica puede proporcionar una alternativa más ecológica a las condiciones de alta dilución intensivas en disolventes generalmente empleadas en las reacciones de macrolactonización. El esquema VI a continuación muestra un proceso conocido en el que el ácido bengaleno se convierte en isoambretolida (mezcla cis/trans) por acción del glicolato de potasio en etilenglicol. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, no se sabe si la eliminación del acetato proporciona una especie monomérica transitoria antes de la formación del polímero. Por otra parte, en las condiciones de reacción, el polímero también es una especie transitoria que se convierte en la estructura de lactona monomérica que se extrae fácilmente de la mezcla de reacción bajo destilación.

Esquema VI



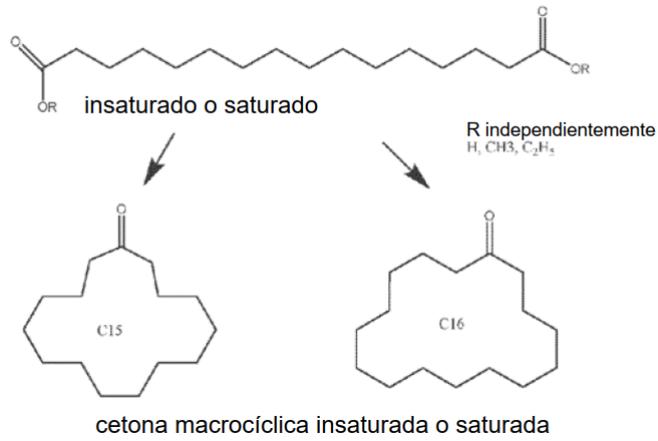
A modo de ejemplo adicional, el ácido cis-9- ω -hidroxi hexadecenoico se puede hacer reaccionar con ácido acético anhidro en exceso para proporcionar el derivado de acetato correspondiente. El derivado de acetato se trata después con metóxido de sodio en un disolvente de glicerol que da como resultado una reacción similar a la indicada en el Esquema VI para proporcionar el isómero cis-9 de ambretolida. El isómero cis-9 de ambretolida puede eliminarse continuamente bajo destilación al vacío con la eliminación concomitante de glicerol. La eliminación de glicerol del destilado a través de la separación de fases da como resultado un isómero cis-9 de ambretolida de alta pureza.

En otras realizaciones adicionales, se puede acceder a las lactonas macrocíclicas a través de sus ésteres de glicerilo (véase, p.ej., la Patente de EE. UU. N.º 2.234.551). De este modo, calentar el éster de glicerilo de un ácido graso ω -hidroxi en glicerol permite la destilación conjunta de un producto de macrolactona y un disolvente de glicerol. El destilado se lava con agua para proporcionar un producto de macrolactona purificado.

IV. Cetonas Macrocíclicas

En algunas realizaciones, pueden convertirse diácido biosintético, ésteres de semiácidos o diésteres, en cetonas macrocíclicas correspondientes. Los diésteres pueden convertirse en un producto cíclico de hidroxicetona mediante condensación de aciloína y, opcionalmente, el grupo hidroxilo puede reducirse para proporcionar una cetona macrocíclica (véase, p.ej., la Patente de EE. UU. N.º 3.963.571). Otro método para producir cetonas macrocíclicas es mediante la condensación de Dieckmann en fase gaseosa (véase, p.ej., la Patente de EE. UU. N.º 7.247.753). En algunas realizaciones, el enfoque de Dieckmann proporciona acceso a tamaños de anillo de número de carbono de cadena impar a partir de derivados de ácidos grasos de cadena par a través de mecanismos de descarboxilación. El esquema VII a continuación muestra la transformación general que puede realizarse con los materiales de partida de diésteres, diácidos o ésteres de semiácidos.

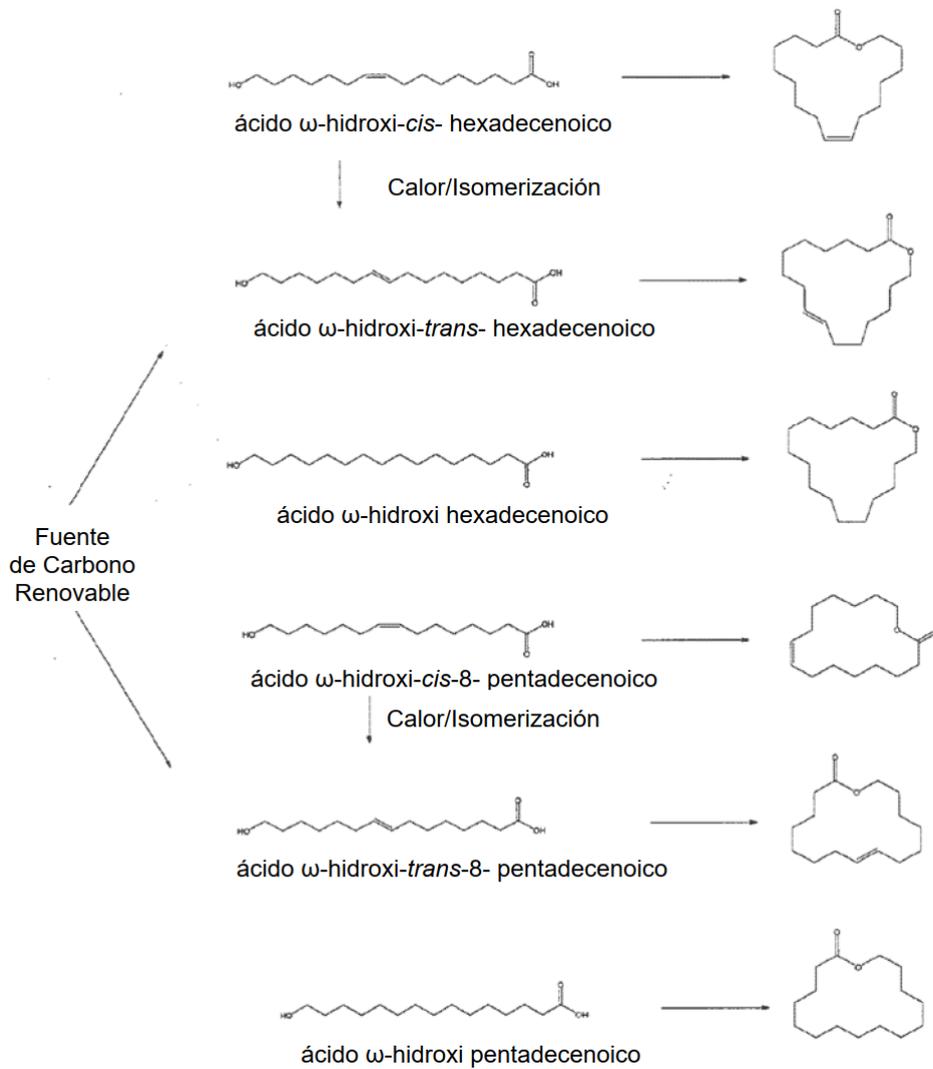
Esquema VII



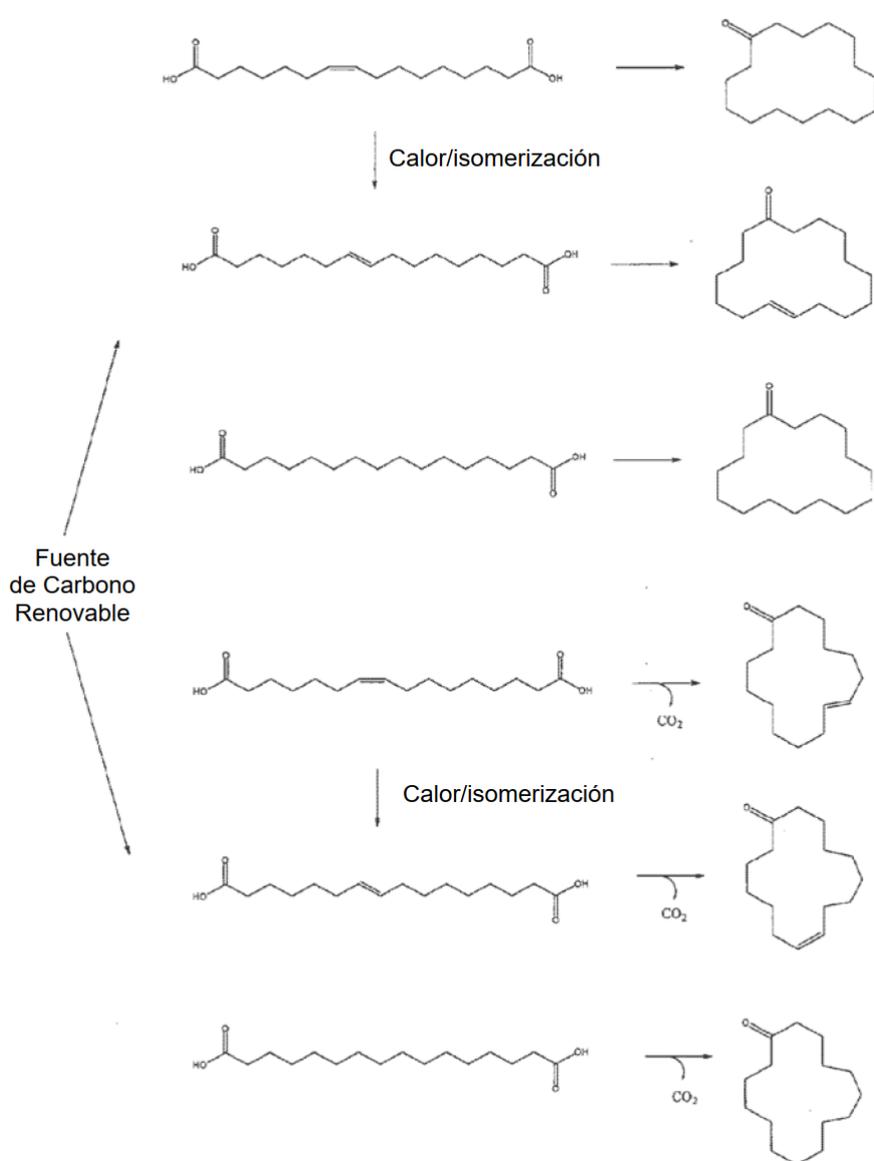
Las reacciones generales que indican la macrolactonización y la producción de cetonas macrocíclicas genéricamente se muestran a continuación en el Esquema VIII y en el Esquema IX.

5

Esquema VIII



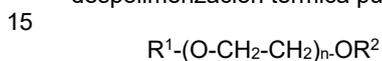
Esquema IX



Los productos diana obtenidos usando los procesos/métodos divulgados en el presente documento pueden incluir lactonas de fragancia, tales como las γ -lactonas (p. ej., γ -dodecalactona, γ -tetradecalactona, γ -undecalactona, γ -decalactona y γ -nonalactona) las δ -lactonas (p. ej., δ -dodecalactona, δ -tetradecalactona, δ -undecalactona, δ -decalactona y δ -nonalactona) y las macrolactonas (p. ej., ambretolida, isoambretolida, dihidroambretolida, habanolida (globalide), exaltolida (tibetolida) (ciclopentadecanolida), etc.) así como otras fragancias de cetonas macrocíclicas, tal como, romanona (exaltone, ciclopentadecanona), muscona, civetona y similares.

10 V. Métodos Adicionales y Complementarios

Los métodos y procesos adicionales y complementarios para la preparación de compuestos macrocíclicos incluyen la condensación de compuestos difuncionales y la posterior despolimerización térmica en presencia de catalizadores. La despolimerización térmica puede llevarse a cabo en un disolvente de la fórmula I:



donde R^1 y R^2 representan radicales hidrocarbonados alifáticos idénticos o diferentes que tienen de 1 a 6 átomos de carbono con o sin grupos funcionales y que tienen pesos moleculares promedio en número (M_n) de 500 a 3.000, de donde se deduce el valor de n , a una presión de menos de 50 hPa y a una temperatura de 200 °C a 300 °C, de 5 a 1.000 partes en peso de disolvente a utilizar por parte en peso del compuesto difuncional condensado (véase, p.ej., la

20

Patente de EE. UU. N.º 5.717.111).

El medio de alto punto de ebullición utilizado para la despolimerización térmica abarca dialquil éteres de polietilenglicol que tienen número promedio de pesos moleculares (Mn) de entre aproximadamente 500 y 3.000. En una realización, los dialquil éteres de polietilenglicol tienen número promedio de pesos moleculares (Mn) de entre aproximadamente 1.000 y 2.000. Los grupos OH terminales de los dialquil éteres de polietilenglicol se esterifican con grupos C₁₋₆ alquilo. Los grupos alquilo R¹ y R² que esterifican el poliglicol pueden ser, por ejemplo, grupos metilo, etilo, isopropilo, n-propilo, n-butilo o sec-butilo. Los grupos alquilo R¹ y R² pueden sustituirse adicionalmente con grupos funcionales, en donde los grupos funcionales pueden no participar en la polimerización. Se pueden usar mezclas de diferentes dialquil éteres de polietilenglicol y de dialquil éteres de polietilenglicol esterificados por diferentes grupos alquilo. Pueden usarse de 5 a 1.000 partes en peso de dialquil éter de polietilenglicol, preferentemente de 10 a 100 partes en peso, por 1 parte en peso del compuesto difuncional condensado.

En la despolimerización y ciclación de los oligómeros lineales, se pueden emplear catalizadores convencionales, tales como metales alcalinos y las sales de los mismos, incluyendo, pero sin limitación, sales de magnesio, sales de manganeso, sales de cadmio, sales de hierro, sales de cobalto, sales de estaño, sales de plomo, sales de aluminio y sales de titanio. La cantidad del catalizador, dependiendo del tipo correspondiente utilizado, está entre aproximadamente el 0,1 y el 20 % en peso. En una realización, la cantidad de catalizador está entre aproximadamente el 0,5 y el 10 % en peso, basándose en el 100 % en peso del compuesto difuncional condensado. En otra realización, el proceso se inicia primero por la condensación de compuestos difuncionales, que puede realizarse de acuerdo con métodos convencionales a temperaturas elevadas con o sin catalizador. En una realización, el ácido α,β -hidroxicarboxílico o el ácido o éster α,β -dicarboxílico se hace reaccionar con un glicol. El alcohol o el agua formados en este proceso pueden eliminarse por destilación o eliminarse usando un dispositivo de arrastre o con la ayuda de un ligero vacío.

Los métodos incluyen la despolimerización de poliésteres lineales acompañados de cierre de anillo para formar compuestos macrocíclicos. Los poliésteres que se pueden usar en este proceso se obtienen por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia y derivan de ácidos dicarboxílicos, dioles y ácidos hidroximonocarboxílicos convencionales. En una realización, los ácidos dicarboxílicos son alifáticos y están saturados o contienen insaturación olefínica y son de cadena ramificada o lineal. En otra realización, los ácidos dicarboxílicos alifáticos contienen de 3 hasta aproximadamente 18 átomos de carbono. En otra realización más, los ácidos dicarboxílicos alifáticos contienen de aproximadamente 8 a 14 átomos de carbono. Los ácidos dicarboxílicos útiles incluyen, pero sin limitación, ácido malónico, ácido maleico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido azelaico, ácido sebáico, ácido undecanodioico, ácido dodecanodioico, ácido brasilico y ácido pentadecanodioico. También se pueden usar mezclas de dos o más ácidos dicarboxílicos. En otra realización, los poliésteres derivan de ácidos dicarboxílicos aromáticos o alicíclicos.

Los poliésteres pueden derivar de dioles que son principalmente dioles alifáticos que tienen de 2 a 12 átomos de carbono. En una realización, los dioles alifáticos tienen de 2 a 6 átomos de carbono. En otra realización, los dioles son saturados y de cadena lineal. En otra realización más, los dioles son saturados y ramificados. Los dioles útiles incluyen, pero sin limitación, etilenglicol; 1,2- o 1,3-propanodiol; 1,2-, 1,3- o 1,4-butanodiol; 1,6-hexanodiol; 3-metil-1,5-pentanodiol; 2,3-dimetil-2,3-butanodiol; 1,8-octanodiol; 2-etilhexanodiol; 1,10-decanodiol; 1,12-dodecanodiol; dietilenglicol; y trietilenglicol. También se pueden usar dioles alicíclicos tales como 1,4-ciclohexadimetanol.

Los poliésteres también pueden derivar de etilenglicol y di-, tri y tetraetilenglicol. Los poliésteres también pueden derivar de los ácidos hidroximonocarboxílicos, que incluyen, pero sin limitación, ácido 15-hidroxipentadecanoico, ácido 16-hidroxihexadecanoico, ácido 10-oxa-16-hidroxihexadecanoico, ácido 11-oxa-16-hidroxihexadecanoico, ácido 12-oxa-16-hidroxihexadecanoico, ácido 10-tia-16-hidroxihexadecanoico, ácido 11-tia-16-hidroxihexadecanoico y ácido 12-tia-16-hidroxihexadecanoico.

Se han descrito algunos compuestos difuncionales condensados que son adecuados para la despolimerización y la ciclación (véase, p.ej., la Patente de Estados Unidos N.º 4.709.058). El compuesto difuncional condensado puede transferirse continuamente a un reactor, en el que se introduce el medio de alto punto de ebullición junto con el componente catalítico. La despolimerización y la ciclación tienen lugar a altas temperaturas. En una realización, la despolimerización y la ciclación tienen lugar de aproximadamente 200 °C a 300 °C y un vacío de menos de 50 hPa. En otra realización, la despolimerización y la ciclación tienen lugar de aproximadamente 220 °C a 265 °C y un vacío de menos de 50 hPa. En estas condiciones, el producto diana destila, el glicol (p. ej., etilenglicol) procedente de la despolimerización o, de lo contrario, un exceso deliberado de glicol que arrastra el componente cíclico. Después de la separación de fases, el glicol separado puede retroalimentarse a la condensación al comienzo de la reacción. Se pueden producir numerosos compuestos macrocíclicos mediante este proceso, que incluyen, pero sin limitación, ésteres, lactonas, lactamas, eterlactonas, dilactonas y eterdilactonas. Este proceso es adecuado para la preparación de ésteres macrocíclicos y lactonas que tienen de 6 a 20 o más particularmente de 8 a 15 átomos de carbono ya que estos compuestos pueden producirse en forma relativamente pura, lo cual es ventajoso para su uso como perfumes.

Ejemplos de compuestos macrocíclicos que pueden producirse mediante el proceso de despolimerización incluyen, pero sin limitación, malonato de 3,6,9-tridecametileno, malonato de dodecametileno, malonato de decametileno,

5 suberato de etileno, azelato de etileno, azelato de 3-oxa-pentametileno, sebacato de 3-metilpentametileno, undecanodioato de etileno, dodecanodioato de etileno, brasilato de etileno, etilen-alfa-metilbrasilato, etilen-alfa-dimetil-brasilato, etilen-alfa-etilbrasilato, pentadecanolida, 12-oxa-pentadecanolida, 12-tia-pentadecanolida, hexadecanolida, 10-oxa-hexadecanolida, 11-oxa-hexadecanolida, 11-tia-hexadecanolida y 12-oxa-hexadecanolida. El proceso puede producir brasilato de etileno por la despolimerización de brasilato de polietileno. De manera similar, el proceso puede producir dodecanodioato de etileno mediante la despolimerización de dodecanodioato de polietileno (véase, p.ej., la Patente de Estados Unidos N° 5.717.111, *supra*).

10 Ejemplos

El siguiente ejemplo ilustra adicionalmente la divulgación pero no debe interpretarse como que de alguna manera limita su alcance.

15 EJEMPLO: Procedimiento Experimental para Macrolactonización

15 Una mezcla (30 g) que contiene ácido 16-hidroxi-hexadecanoico y ácido 16-hidroxi-7(Z)-hexadecenoico (obtenido de la fermentación) y etilenglicol (60 ml) se calienta hasta ebullición y el etilenglicol se destila lentamente durante 4 horas para eliminar el agua. Se añade titanato de tetrabutilo (0,5 g) a la mezcla resultante de ésteres de etilenglicol y ésteres de oligómero de ácido hidroxílico en etilenglicol. Esto se añade después lentamente durante 4 horas a un reactor que
20 contiene dimetiléter de polietilenglicol (50 g, 1500-2000 Mn) a 250 °C y 10 torr de vacío. Las macrolactonas se destilan conjuntamente con el etilenglicol durante esta adición. La extracción del destilado con ciclohexano y el lavado con agua produce una solución de ciclohexano de las macrolactonas. La concentración proporciona las macrolactonas brutas. La destilación al vacío produce una mezcla refinada de 16-hexadecalactona y 16-7(Z)-hexadecelactona.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso quimioenzimático para preparar una lactona o una cetona macrocíclica, que comprende:

5 cultivar un microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética de ácidos grasos modificada que comprende una ω -hidroxilasa u oxigenasa de EC 1.14.15.3 para producir al menos un tipo de derivado de ácido graso *in vivo*, en donde el cultivo se realiza con una materia prima basada en carbono; y poner en contacto el derivado de ácido graso *ex vivo* con un reactivo en condiciones suficientes para producir una lactona o una cetona macrocíclica,
 10 en donde dicho derivado de ácido graso se selecciona del grupo que consiste en un ácido graso omega-hidroxi (ω -OH FA), un ácido graso omega-hidroxi insaturado (ω -OH FA insaturado), un éster de ácido graso omega-hidroxi (éster de ácido graso ω -OH), un éster de ácido graso omega-hidroxi insaturado (éster de ácido graso ω -OH insaturado), un ácido graso 3-hidroxi (3-OH FA), un ácido graso 3-hidroxi insaturado (3-OH FA insaturado), un éster de ácido graso 3-hidroxi (éster de ácido graso 3-OH), un éster de ácido graso 3-hidroxi insaturado (éster de ácido graso 3-OH insaturado), un alfa-omega-diácido (α,ω -diácido), un alfa-omega-diácido insaturado (α,ω -diácido insaturado), un éster de alfa-omega-diácido (éster de α,ω -diácido) y un éster de alfa-omega-diácido insaturado (éster de α,ω -diácido insaturado).

20 2. El proceso quimioenzimático de la reivindicación 1, en donde dicha vía biosintética de ácidos grasos modificada comprende una ω -hidroxilasa y una tioesterasa de EC 3.1.2.- o EC 2.1.1.5 y preferentemente comprende además una éster sintasa de EC 2.3.1.20.

25 3. El proceso quimioenzimático de la reivindicación 1, que comprende además una oxidasa o deshidrogenasa de EC 1.1.1.1/2, EC 1.1.3.13, EC 1.1.3.20, EC 1.2.1.3/4/5 o EC 1.2.3.1.

4. El proceso quimioenzimático de la reivindicación 1, en donde dicha vía biosintética de ácidos grasos modificada aumenta la cantidad de derivados de ácidos grasos insaturados dentro de dicho microorganismo.

30 5. El método de la reivindicación 1, que comprende además aislar el derivado de ácido graso antes de la etapa de contacto.

6. El método de la reivindicación 1, en donde el derivado de ácido graso se secreta de dicho microorganismo recombinante y la etapa de contacto se realiza sin aislar el derivado de ácido graso de la etapa de cultivo.

35 7. El método de la reivindicación 1, en donde el reactivo:

(a) comprende un ácido prótico seleccionado del grupo que consiste en un ácido clorhídrico, un ácido sulfúrico, un ácido fosfórico y un ácido de resina recuperable;

40 (b) comprende un ácido de Lewis, preferentemente en donde el ácido de Lewis se selecciona del grupo que consiste en un catalizador de transesterificación de organostanano, una sal de cobre o zinc, un triflato de plata y una zeolita; o

(c) es un agente de acoplamiento de péptidos.

45 8. El método de la reivindicación 1, en donde la lactona es una gamma-lactona (γ -lactona), una delta-lactona (δ -lactona) o una combinación de las mismas, preferentemente en donde la lactona es una C₈ a C₁₈ macrolactona.

50 9. El método de la reivindicación 1, en donde el ácido graso omega-hidroxi insaturado (ω -OH FA insaturado) o el éster de ácido graso omega-hidroxi insaturado (éster de ácido graso ω -OH insaturado) es monoinsaturado, preferentemente en donde el éster de ácido graso omega-hidroxi monoinsaturado (éster de ácido graso ω -OH monoinsaturado) se selecciona del grupo que consiste en un éster metílico de ácido graso omega-hidroxi monoinsaturado (ω -OH FAME monoinsaturado) y un éster etílico de ácido graso omega-hidroxi monoinsaturado (ω -OH FAEE monoinsaturado).

55 10. El método de la reivindicación 1, en donde el éster de ácido graso 3-hidroxi (éster de ácido graso 3-OH) es un éster metílico de ácido graso 3-hidroxi (3-OH FAME) o un éster etílico de ácido graso 3-hidroxi (3-OH FAEE).

11. El método de la reivindicación 1, en donde dicho éster de ácido graso omega-hidroxi (éster de ácido graso ω -OH) es un éster metílico de ácido graso omega-hidroxi (ω -OH FAME) o un éster etílico de ácido graso omega-hidroxi (ω -OH FAEE).

60 12. El método de la reivindicación 1, en donde el ácido graso 3-hidroxi insaturado (3-OH FA insaturado) o el éster de ácido graso 3-hidroxi insaturado (éster de ácido graso 3-OH insaturado) es monoinsaturado, preferentemente en donde el éster de ácido graso 3-hidroxi monoinsaturado (éster de ácido graso 3-OH) es un éster metílico de ácido graso 3-hidroxi monoinsaturado (3-OH FAME monoinsaturado) o un éster etílico de ácido graso 3-hidroxi monoinsaturado (3-OH FAEE monoinsaturado).

65 13. El método de la reivindicación 1, en donde el alfa-omega-diácido insaturado (α,ω -diácido insaturado) o el éster de

alfa-omega-diácido insaturado (α , éster-diácido insaturado) es monoinsaturado, preferentemente en donde el éster de alfa-omega-diácido monoinsaturado (éster de α,ω -diácido monoinsaturado) es

- 5 (a) un éster de semiácido, más preferentemente un éster metílico o etílico; o
(b) un diéster, más preferentemente un diéster metílico o un diéster etílico.
14. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de contacto comprende deshidratación, lactonización o combinaciones de las mismas.
- 10 15. El método de la reivindicación 1, en donde el derivado de ácido graso comprende una cadena de carbono de número impar, ramificación de metilo o combinaciones de las mismas.
16. El método de la reivindicación 1, en donde dicha materia prima basada en carbono comprende una fuente de carbono simple.