

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 482**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20	(2006.01)
C12N 9/02	(2006.01)
C12N 9/04	(2006.01)
C12N 9/10	(2006.01)
C12P 7/04	(2006.01)
C12P 7/64	(2006.01)
C10L 1/08	(2006.01)
C10L 1/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2007 E 07809099 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2024491**

54 Título: **Producción de ácidos grasos y derivados de los mismos**

30 Prioridad:

19.05.2006 US 802016 P
 19.05.2006 US 801995 P
 13.02.2007 WO PCT/US2007/003736
 28.03.2007 US 908547 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2015

73 Titular/es:

LS9, INC. (100.0%)
600 Gateway Boulevard
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

KEASLING, JAY, D.;
HU, ZHIHAO;
SOMERVILLE, CHRIS;
CHURCH, GEORGE;
BERRY, DAVID;
FRIEDMAN, LISA;
SCHIRMER, ANDREAS;
BRUBAKER, SHANE y
DEL CARDAYRÉ, STEPHEN, B.

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 528 482 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción de ácidos grasos y derivados de los mismos

Campo

5 Se proporcionan microorganismos modificados por ingeniería genética que producen productos de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos (derivados de ácidos grasos), así como métodos de su uso.

Antecedentes

10 Los desarrollos en la tecnología han ido acompañados por un aumento en la dependencia de fuentes de combustible y tales fuentes de combustibles están volviéndose cada vez más limitadas y difíciles de adquirir. Al tener lugar la combustión de combustibles fósiles a una tasa sin precedentes, es probable que la demanda mundial de combustible pronto sea mayor que los suministros de combustible actuales.

15 Como resultado, se han dirigido esfuerzos hacia el aprovechamiento de fuentes de energía renovable, tales como luz solar, agua, viento y biomasa. El uso de biomasa para producir nuevas fuentes de combustible que no se derivan de fuentes de petróleo (es decir, biocombustible) ha surgido como una opción alternativa. El biocombustible (biodiésel) es un combustible inflamable biodegradable, de combustión limpia compuesto por ésteres y alcanos de cadena larga. Puede usarse biodiésel en la mayoría de los motores diésel de combustión interna o bien en una forma pura, que se denomina biodiésel "puro", o bien como una mezcla en cualquier concentración con diésel de petróleo normal. Los métodos actuales de producción de biodiésel implican la transesterificación de triacilglicéridos (principalmente aceite vegetal) que conduce a una mezcla de ésteres de ácidos grasos y el producto secundario no deseado glicerina, proporcionando por tanto un producto que es heterogéneo y un producto de desecho que provoca ineficiencias económicas.

20 El documento DE 10 2004 052115 A1 se refiere a microorganismos que son adecuados para la preparación de ésteres de ácidos grasos, y a procedimientos para la producción microbiana de ácidos grasos esterificados con alcoholes de cadena corta usando estos microorganismos.

25 Kalscheuer *et al.* (Appl. Environ. Microbiol. 2006, 72(2):1373-9) describen la biosíntesis de ésteres de cera en una cepa de *E. coli* recombinante que expresa una acil-CoA reductasa bifuncional que produce alcohol graso y una éster de cera sintasa.

Lardizabal *et al.* (Plant Physiology 2000, 122:645-5) describen la purificación de una cera sintasa de embrión de jojoba, la clonación de su ADNc, y la producción de altos niveles de cera en semillas de *Arabidopsis* transgénica.

30 James y Cronan (J. Biol. Chem. 2004, 279(4):2520-7) describen que el gen de AccA codifica para una subunidad de la acetil-CoA carboxilasa, que cataliza la primera etapa comprometida en el metabolismo de ácidos grasos.

Wu *et al.* (Lipids 1981, 16(12):897-902) se refiere a estudios de biosíntesis de ceras mediante el desarrollo de semilla de jojoba: III. Biosíntesis de ésteres de cera a partir de acil-CoA y alcoholes de cadena larga.

Rock y Jackowski (J. Biol. Chem. 1985, 260(23):12720-4) se refieren a rutas para la incorporación de ácidos grasos exógenos en fosfatidiletanolamina en *E. coli*.

35 Holtzapple y Schmidt-Dannert 2007 (J. Bacteriol. 2007, 189(10):3804-12) describen la identificación y caracterización de una coenzima A isoprenoide sintetasa y éster de cera sintasas en *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798.

Sumario

40 Se dan a conocer en el presente documento microorganismos recombinantes que pueden sintetizar productos derivados de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos (derivados de ácidos grasos), y opcionalmente liberar tales productos al caldo de fermentación. Tales derivados de ácidos grasos son útiles, entre otros, como biocombustibles y productos químicos especializados. Estos biocombustibles y productos químicos especializados pueden usarse para producir productos adicionales, tales como complementos nutricionales, polímeros, sustitutos de parafina y productos para el cuidado personal.

45 Los microorganismos recombinantes dados a conocer en el presente documento pueden modificarse por ingeniería genética para producir diversos derivados de ácidos grasos incluyendo, pero sin limitarse a, alcoholes de cadena corta tales como etanol, propanol, isopropanol y butanol, alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, hidrocarburos y ésteres de ceras.

50 En un ejemplo, se da a conocer en el presente documento un método para modificar un microorganismo de modo que produzca, y opcionalmente libere, derivados de ácidos grasos generados a partir de una fuente de carbono renovable. Tales microorganismos se modifican por ingeniería genética, por ejemplo, introduciendo una secuencia de ADN exógeno que codifica para una o más proteínas que pueden metabolizar una fuente de carbono renovable

para producir, y en algunos ejemplos secretar, un derivado de ácido graso. Los microorganismos modificados pueden usarse entonces en un procedimiento de fermentación para producir derivados de ácidos grasos útiles usando la fuente de carbono renovable (biomasa) como material de partida. En algunos ejemplos, se usa un microorganismo existente que puede tratarse genéticamente debido a la facilidad de modificación por ingeniería genética de sus rutas para controlar el crecimiento, la producción y reducir o eliminar reacciones secundarias que reducen la eficacia de la ruta de biosíntesis. Además, tales microorganismos modificados pueden usarse para consumir fuentes de carbono renovables con el fin de generar combustibles que pueden usarse directamente como biocombustibles, sin la necesidad de métodos especiales para su almacenamiento o transporte. En otros ejemplos, se modifican por ingeniería genética microorganismos que producen de manera natural hidrocarburos para que sobreproduzcan hidrocarburos expresando secuencias de ácido nucleico exógeno que aumentan la producción de ácidos grasos.

Se dan a conocer en el presente documento microorganismos que producen derivados de ácidos grasos que tienen niveles de saturación, ramificación y longitud de la cadena de carbono definidos. En ejemplos particulares, la producción de productos homogéneos disminuye el coste global asociado con la fermentación y separación. En algunos ejemplos se dan a conocer microorganismos que incluyen una o más secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican para al menos una tioesterasa (EC 3.1.2.14) y al menos una cera sintasa (EC 2.3.1.15). En otros ejemplos, se dan a conocer microorganismos que incluyen una o más secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican para al menos una tioesterasa (EC 3.1.2.14) y al menos una alcohol acetiltransferasa (2.3.1.84). En aún otros ejemplos, se dan a conocer microorganismos que incluyen una o más secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican para al menos una tioesterasa (EC 3.1.2.14), al menos una acil-CoA reductasa (EC 1.2.1.50) y al menos una alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1). También se dan a conocer microorganismos que expresan una o más secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican para al menos una tioesterasa (EC 3.1.2.14) y al menos una acil-CoA reductasa que forma alcohol graso (1.1.1.*). Los péptidos de tioesterasa codificados por las secuencias de ácido nucleico exógeno pueden elegirse para proporcionar productos homogéneos.

En algunos ejemplos el microorganismo que se modifica por ingeniería genética para producir el derivado de ácido graso es *E. coli*, *Z. mobilis*, *Rhodococcus opacus*, *Ralstonia eutropha*, *Vibrio furnissii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactococcus lactis*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas* o *Micrococcus leuteus* y sus microorganismos relacionados.

En otros ejemplos pueden modificarse por ingeniería genética microorganismos que producen hidrocarburos de manera endógena para sobreproducir hidrocarburos optimizando la ruta de biosíntesis de ácidos grasos tal como se describe en el presente documento. Los microorganismos a modo de ejemplo que se sabe que producen hidrocarburos y pueden modificarse por ingeniería genética para sobreproducir hidrocarburos usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento incluyen *Arthrobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Botryococcus braunii*, *Chromatium sp.*, *Cladosporium resina* (ATCC22711), *Clostridium pasteurianum* VKM, *Clostridium tenanomorphum*, *Clostridium acidurici*, especies de *Corynebacterium*, especies de cianobacterias (*Nostoc muscorum*, *Anacystis (Synechococcus) nidulans*, *Phormidium luridum*, *Clorogloea fritschii*, *Trichodesmium erythaeum*, *Oscillatoria williamsii*, *Microcoleus chthonoplaseis*, *Coccochloris elabens*, *Agmenellum quadruplicatum*, *Plectonema terebrans*, *M. vaginatus* y *C. scopulorum*), *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC29577), *Kineococcus radiotolerans* (BAA-149), *Micrococcus luteus* (FD533, ATCC 272, 381, 382, ISU, 540, 4698, 7468, 27141), *Micrococcus sp.* (ATCC 146, 398, 401, 533), *Micrococcus roseus* (ATCC 412, 416, 516), *Micrococcus lysodeikticus*, especies de *Mycobacterium*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Trichoderma virida*, *Pullularia pullulans*, *Jeotgalicoccus sp.* (*M. candidans*) (ATCC 8456), *Rhodopseudomonas spheroids*, *Clorobium sp.*, *Rhodospirillum rubrum* (ATCC 11170), *Rhodomicrobium vannielii*, *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 13637, 17444, 17445, 17666, 17668, 17673, 17674, 17679, 17677), *Saccharomyces ludwigii* (ATCC 22711), *Saccharomyces sp.* (*oviformus*, *ludwigii*, *tropicalis*), *Vibrio furnissii* M1, *Vibrio marinus* MP-1, *Vibrio ponticus*, *Serratia marinorubra*, *Ustilago maydis*, *Ustilago nuda*, *Urocystis agropyri*, *Sphacelotheca reiliana* y *Tilletia sp.* (*foetida*, *caries*, *controversa*).

Además de modificarse por ingeniería genética para expresar secuencias de ácido nucleico exógeno que permiten la producción de derivados de ácidos grasos, el microorganismo puede tener adicionalmente uno o más genes endógenos delecionados o atenuados funcionalmente. Por ejemplo, pueden atenuarse *ackA* (EC 2.7.2.1), *ackB* (EC 2.7.2.1), *adhE* (EC 1.1.1.1, 1.2.1.10), *fabF* (EC 2.3.1.179), *fabR* (registro NP_418398), *fadE* (EC 1.3.99.3, 1.3.99.-), *GST* (EC 6.3.2.3), *gpsA* (EC 1.1.1.94), *ldhA* (EC 1.1.1.28), *pflb* (EC 2.3.1.54), *plsB* (EC 2.3.1.15), *poxB* (EC 1.2.2.2), *pta* (EC 2.3.1.8), glutatión sintasa (EC 6.3.2.3) y combinaciones de los mismos.

Además de modificarse por ingeniería genética para expresar secuencias de ácido nucleico exógeno que permiten la producción de derivados de ácidos grasos, el microorganismo puede tener adicionalmente uno o más genes adicionales sobreexpresados. Por ejemplo, *pdh*, *panK*, *aceEF* (que codifica para el componente de deshidrogenasa E1p y el componente de dihidrolipoamida aciltransferasa E2p de los complejos de piruvato y 2-oxoglutarato deshidrogenasa, registros: NP_414656, NP_414657, EC: 1.2.4.1, 2.3.1.61, 2.3.1.12), *accABCD/fabH/fabI/fabG/acpP/fabF* (que codifican para FAS, registros: CAD85557, CAD85558, NP_842277, NP_8841683, NP_415613, EC: 2.3.1.180, 2.3.1.39, 1.1.1.100, 1.6.5.3, 2.3.1.179), genes que codifican para acil graso-coA reductasas (registros: AAC45217, EC 1.2.1.-), *UdhA* o genes similares (que codifican para piridina nucleótido transhidrogenasa, registro: CAA46822, EC: 1.6.1.1) y genes que codifican para acil-graso-coA reductasas (registros: AAC45217, EC 1.2.1.-).

En algunos ejemplos, los microorganismos descritos en el presente documento producen al menos 1 mg de derivado de ácido graso por litro de caldo de fermentación. En otros ejemplos los microorganismos producen al menos 100 mg/l, 500 mg/l, 1 g/l, 5 g/l, 10 g/l, 20 g/l, 25 g/l, 30 g/l, 35 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 100 g/l o 120 g/l de derivado de ácido graso por litro de caldo de fermentación. En algunos ejemplos, el derivado de ácido graso se produce y se libera del microorganismo y en aún otros ejemplos el microorganismo se lisa antes de la separación del producto.

En algunos ejemplos, el derivado de ácido graso incluye una cadena de carbono que tiene al menos 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34 carbonos de longitud. En algunos ejemplos al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90% o el 95% del producto de derivado de ácido graso producido contiene una cadena de carbono que tiene 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ó 34 carbonos de longitud. En aún otros ejemplos, al menos el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90% o el 95% del producto de derivado de ácido graso contiene 1, 2, 3, 4 ó 5, puntos de insaturación

También se dan a conocer métodos de producción de derivados de ácidos grasos. Estos métodos incluyen cultivar los microorganismos descritos en el presente documento y separar el producto del caldo de fermentación.

Estos y otros ejemplos se describen adicionalmente en la siguiente descripción detallada.

15 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la ruta de biosíntesis de FAS.

La figura 2 muestra rutas de biosíntesis que producen ceras. Pueden producirse ceras en una célula huésped usando alcoholes producidos dentro de la célula huésped o pueden producirse añadiendo alcoholes exógenos en el medio. Un microorganismo diseñado para producir ceras producirá enzimas cera sintasa (EC 2.3.1.75) usando secuencias de ácido nucleico exógeno así como secuencias de tioesterasa (EC 3.1.2.14). Otras enzimas que pueden modularse también para aumentar la producción de ceras incluyen enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos (enzimas de FAS EC 2.3.1.85), acil-CoA sintasa (EC 2.3.1.86), acil-CoA reductasa que forma alcohol graso (EC 1.1.1.*), acil-CoA reductasa (1.2.1.50) y alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1).

La figura 3 muestra rutas de biosíntesis que producen alcoholes grasos. Pueden producirse alcoholes grasos que tienen longitudes de cadena de carbono definidas expresando secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican para tioesterasas (EC 3.1.2.14) y combinaciones de acil-CoA reductasas (EC 1.2.1.50), alcohol deshidrogenasas (EC 1.1.1.1) y acil-CoA reductasas que forman alcohol graso (FAR, EC 1.1.1.*). Otras enzimas que también pueden modularse para aumentar la producción de alcoholes grasos incluyen enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos (enzimas de FAS EC 2.3.1.85) y acil-CoA sintasa (EC 2.3.1.86).

La figura 4 muestra rutas de biosíntesis que producen ésteres de ácidos grasos. Pueden producirse ésteres de ácidos grasos que tienen longitudes de cadena de carbono definidas expresando de manera exógena diversas tioesterasas (EC 3.1.2.14), combinaciones de acil-CoA reductasa (1.2.1.50), alcohol deshidrogenasas (EC 1.1.1.1) y Acil-CoA reductasa que forma alcohol graso (FAR, EC 1.1.1.*), así como acetil transferasa (EC 2.3.1.84). Otras enzimas que pueden modularse para aumentar la producción de ésteres de ácidos grasos incluyen enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos (enzimas de FAS EC 2.3.1.85) y acil-CoA sintasa (EC 2.3.1.86).

La figura 5 muestra la producción de alcohol graso por la cepa descrita en el ejemplo 4, cotransformada con pCDFDuet-1-fadD-acr1 y plásmidos que contienen diversos genes de tioesterasa. Se hicieron crecer las cepas de manera aerobia a 25°C en medio mineral M9 con glucosa al 0,4% en frascos de agitación. Se identificaron los alcoholes grasos C10, C12, C14, C16 y C18 saturados. También se detectaron pequeñas cantidades de alcoholes grasos C16:1 y C18:1 en algunas muestras. Se extrajeron alcoholes grasos de sedimentos celulares usando acetato de etilo y se derivatizaron con N-trimetilsililo (TMS) imidazol para aumentar la detección.

La figura 6 muestra la liberación de alcoholes grasos a partir de la cepa de producción. Aproximadamente el 50% del alcohol graso producido se liberaba a partir de las células cuando se hicieron crecer a 37°C.

Las figuras 7A-7D muestran el espectro de GS-EM de octanoato de octilo (C8C8) producido por huéspedes de producción que expresan alcohol acetil transferasa (AAT, EC 2.3.1.84) y huéspedes de producción que expresan cera sintasa (EC 2.3.1.75). La figura 7A muestra el extracto de acetato de acetilo de la cepa C41(DE3, ΔfadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B) en la que el plásmido pHZ1.43 expresaba ADP1 (cera sintasa). La figura 7B muestra el extracto de acetato de acetilo de la cepa C41(DE3, ΔfadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B) en la que el plásmido pHZ1.43 expresaba SAAT. La figura 7C muestra el extracto de acetato de acetilo de la cepa C41(DE3, ΔfadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B) en la que el plásmido pHZ1.43 no contenía ADP1 (cera sintasa) o SAAT. La figura 7D muestra el espectro de masas y el patrón de fragmentación de C8C8 producidos por C41(DE3, ΔfadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B) en la que el plásmido pHZ1.43 expresaba SAAT).

La figura 8 muestra la distribución de ésteres etílicos preparados cuando la cera sintasa de *A. baylyi* ADP1 (WSadp1) se coexpresaba con el gen de tioesterasa de *Cuphea hookeriana* en un huésped de producción.

Las figuras 9A y 9B muestran cromatogramas de análisis de CG/EM. La figura 9A muestra un cromatograma del

extracto de etilo del cultivo de la cepa LS9001 de *E. coli* transformada con los plásmidos pCDFDuet-1-fadD-WSadp1, pETDuet-1-tesA. Se alimentó etanol a las fermentaciones. La figura 9B muestra un cromatograma de hexadecanoato de etilo y oleato de etilo usados como referencia.

5 La figura 10 muestra una tabla que identifica diversos genes que pueden sobreexpresarse o atenuarse para aumentar la producción de derivados de ácidos grasos. La tabla también identifica diversos genes que pueden modularse para alterar la estructura del producto de derivado de ácido graso. Un experto habitual en la técnica apreciará que algunos de los genes que se usan para alterar la estructura del derivado de ácido graso también aumentará la producción de derivados de ácidos grasos.

Abreviaturas y términos

10 Las siguientes explicaciones de términos y métodos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para orientar a los expertos habituales en la técnica en la práctica de la presente divulgación. Tal como se usa en el presente documento, "que comprende" significa "que incluye" y las formas en singular "un" o "una" o "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, la referencia a "que comprende una célula" incluye una o una pluralidad de tales células, y la referencia "que comprende la tioesterasa" incluye la referencia a uno o más péptidos de tioesterasa y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos habituales en la técnica, etc. El término "o" se refiere a un elemento individual de elementos alternativos indicados o una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la frase "actividad tioesterasa o actividad acil-CoA reductasa que forma alcohol graso" se refiere a actividad tioesterasa, actividad acil-CoA reductasa que forma alcohol graso o una combinación tanto de actividad acil-CoA reductasa que forma ácido graso como de actividad tioesterasa.

15 A menos que se explique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la presente divulgación, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitativos. Otras características de la divulgación resultan evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

25 Números de registro: Los números de registro a lo largo de toda esta descripción se derivan a partir de la base de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica, *National Center for Biotechnology Information*) gestionada por el Instituto Nacional de la Salud, (*National Institute of Health*), EE.UU. Los números de registro son tal como se proporcionan en la base de datos el 27 de marzo de 2007.

30 Números de clasificación de enzimas (EC): Los números EC proporcionados a lo largo de toda esta descripción se derivan de la bases de datos KEGG Ligand, gestionada por la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics, patrocinada en parte por la universidad de Tokyo. Los números EC son tal como se proporcionan en la base de datos el 27 de marzo de 2007.

35 Atenuar: Reducir el efecto, la actividad o la fuerza de algo. En un ejemplo, se reduce la sensibilidad de una enzima particular frente a la inhibición por retroalimentación o inhibición provocada por una composición que no es un producto o un reactante (retroalimentación no específica de la ruta) de manera que la actividad de la enzima no se ve afectada por la presencia de un compuesto. Por ejemplo, el gen *fabH* y su secuencia de aminoácidos correspondiente son sensibles a la temperatura y pueden alterarse para disminuir la sensibilidad frente a fluctuaciones de temperatura. La atenuación del gen *fabH* puede usarse cuando se desean aminoácidos ramificados. En otro ejemplo, una enzima que se ha alterado para que sea menos activa puede denominarse atenuada.

40 Puede usarse una delección funcional de una enzima para atenuar una enzima. Una delección funcional es una mutación, delección parcial o completa, inserción u otra variación realizada en una secuencia génica o una secuencia que controla la transcripción de una secuencia génica, que reduce o inhibe la producción del producto génico, o hace que el producto génico sea no funcional (es decir, la mutación descrita en el presente documento para el gen *plsB*). Por ejemplo, la delección funcional de *fabR* en *E. coli* reduce la represión de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos y permite que *E. coli* produzca más ácidos grasos insaturados (UFA). En algunos casos una delección funcional se describe como una mutación de desactivación.

45 Un experto habitual en la técnica apreciará que existen muchos métodos de atenuación de una actividad enzimática. Por ejemplo, la atenuación puede lograrse introduciendo cambios en la secuencia de aminoácidos por medio de la alteración de la secuencia de ácido nucleico, colocando el gen bajo el control de un promotor menos activo, expresando ARN de interferencia, ribozimas o secuencias antisentido que seleccionan como diana el gen de interés, o a través de cualquier otra técnica conocida en la técnica.

50 Fuente de carbono: Generalmente se refiere a un sustrato o compuesto adecuado para usarse como fuente de carbono para el crecimiento de células procariontas o eucariontas sencillas. Las fuentes de carbono pueden ser de diversas formas, incluyendo, pero sin limitarse a polímeros, hidratos de carbono, ácidos, alcoholes, aldehídos,

cetonas, aminoácidos, péptidos, etc. Éstas incluyen, por ejemplo, diversos monosacáridos tales como glucosa, oligosacáridos, polisacáridos, material celulósico, xilosa y arabinosa, disacáridos, tales como sacarosa, ácidos grasos saturados o insaturados, succinato, lactato, acetato, etanol, etc., o mezclas de los mismos. La fuente de carbono puede ser adicionalmente un producto de la fotosíntesis, incluyendo, pero sin limitarse a glucosa.

- 5 **ADNc (ADN complementario):** Un trozo de ADN que carece de segmentos internos, no codificantes (intrones) y secuencias reguladoras que determinan la transcripción. Puede sintetizarse ADNc mediante transcripción inversa a partir de ARN mensajero extraído de células.

Delección: La eliminación de uno o más nucleótidos de una molécula de ácido nucleico o uno o más aminoácidos de una proteína, uniéndose entre sí las regiones en ambos lados.

- 10 **Detectable:** Que puede determinarse su existencia o presencia. Por ejemplo, la producción de un producto a partir de un reactante, por ejemplo, la producción de ácidos grasos C18, es detectable usando el método proporcionado en el ejemplo 11 a continuación.

- 15 **ADN: Ácido desoxirribonucleico.** El ADN es un polímero de cadena larga que incluye el material genético de la mayoría de los organismos vivos (algunos virus tienen genes que incluyen ácido ribonucleico, ARN). Las unidades de repetición en polímeros de ADN son cuatro nucleótidos diferentes, cada uno de los cuales incluye una de las cuatro bases, adenina, guanina, citosina y timina unidas a un azúcar de desoxirribosa al que se une un grupo fosfato. Tripletes de nucleótidos, denominados codones, en moléculas de ADN codifican para un aminoácido en un péptido. El término codón también se usa para las secuencias correspondientes (y complementarias) de tres nucleótidos en el ARNm en el que se transcribe la secuencia de ADN.

- 20 **Endógeno:** Tal como se usa en el presente documento con referencia a una molécula de ácido nucleico y una célula o un microorganismo particular, se refiere a una secuencia de ácido nucleico o péptido que está en la célula y no se introdujo en la célula usando técnicas de ingeniería genética recombinantes. Por ejemplo, un gen que estaba presente en la célula cuando la célula se aisló originalmente de la naturaleza. Un gen todavía se considera endógeno si las secuencias de control, tales como secuencias promotoras o potenciadoras que activan la transcripción o traducción se han alterado mediante técnicas recombinantes.

- 25 **Exógeno:** Tal como se usa en el presente documento con referencia a una molécula de ácido nucleico y una célula particular se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico que no se origina a partir de esa célula particular tal como se encuentra en la naturaleza. Por tanto, una molécula de ácido nucleico que no se produce de manera natural se considera que es exógena con respecto a la célula una vez que se ha introducido en la célula. Una molécula de ácido nucleico que se produce de manera natural también puede ser exógena con respecto a una célula particular. Por ejemplo, una secuencia codificante completa aislada de una célula X es un ácido nucleico exógeno con respecto a la célula Y una vez que la secuencia codificante se introduce en la célula Y, incluso si X e Y son el mismo tipo de célula.

- 30 **Expresión:** El proceso mediante el cual la información codificada en un gen se convierte en las estructuras y funciones de una célula, tales como una proteína, ARN de transferencia o ARN ribosómico. Los genes expresados incluyen los que se transcriben para dar ARNm y luego se traducen para dar la proteína y los que se transcriben para dar ARN pero no se traducen para dar la proteína (por ejemplo, ARN de transferencia y ribosómicos).

- 35 **Éster graso:** Incluye cualquier éster compuesto por un ácido graso. Las cadenas de carbono en ácidos grasos pueden contener cualquier combinación de las modificaciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, la cadena de carbono puede contener uno o más puntos de insaturación, uno o más puntos de ramificación, incluyendo ramificación cíclica, y pueden modificarse por ingeniería genética para que sean cortas o largas. Puede usarse cualquier alcohol para formar ésteres de ácidos grasos, por ejemplo alcoholes derivados de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos, alcoholes producidos mediante el huésped de producción a través de las rutas de biosíntesis de ácidos no grasos y alcoholes que se suministran en el caldo de fermentación.

- 40 **Derivado de ácido graso:** Incluye productos producidos en parte a partir de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos del organismo huésped. La ruta de biosíntesis de ácidos grasos incluye enzimas ácido graso sintasa que pueden modificarse por ingeniería genética tal como se describe en el presente documento para producir derivados de ácidos grasos, y en algunos ejemplos pueden expresarse con enzimas adicionales para producir derivados de ácidos grasos que tienen características de cadena de carbono deseadas. Los derivados de ácidos grasos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, alcoholes de cadena corta y larga, hidrocarburos y ésteres de ácidos grasos incluyendo ceras.

- 45 **Caldo de fermentación:** Incluye cualquier medio que soporta la vida de microorganismos (es decir, un microorganismo que está metabolizando carbono activamente). Un medio de fermentación contiene habitualmente una fuente de carbono. La fuente de carbono puede ser cualquier cosa que pueda utilizarse, con o sin enzimas adicionales, por el microorganismo para obtener energía.

- 50 **Hidrocarburo:** Incluye compuestos químicos que contienen los elementos carbono (C) e hidrógeno (H). Todos los hidrocarburos consisten en una estructura principal de carbono y átomos de hidrógeno unidos a esa estructura

principal. En ocasiones, el término se usa como forma abreviada del término "hidrocarburo alifático". Esencialmente existen tres tipos de hidrocarburos: (1) hidrocarburos aromáticos, que tienen al menos un anillo aromático; (2) hidrocarburos saturados, también conocidos como alcanos, que carecen de enlaces dobles, triples o aromáticos; y (3) hidrocarburos insaturados, que tienen uno o más enlaces dobles o triples entre átomos de carbono, se dividen en: alquenos, alquinos y dienos. Los hidrocarburos líquidos extraídos de manera geológica se denominan petróleo (literalmente "aceite de roca") o aceite mineral, mientras que los hidrocarburos geológicos gaseosos se denominan gas natural. Todos son fuentes significativas de combustible y materiales de partida como materias primas para la producción de productos químicos orgánicos y se encuentran comúnmente bajo la superficie de la Tierra usando las herramientas de la geología del petróleo. Las reservas de petróleo en rocas sedimentarias son la fuente principal de hidrocarburos para la industria energética y de productos químicos. Los hidrocarburos son de gran importancia económica debido a que incluyen los constituyentes de los principales combustibles fósiles (carbón, petróleo, gas natural, etc.) y biocombustibles, así como plásticos, ceras, disolventes y aceites.

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como una molécula de ácido nucleico, proteína o célula) se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos en los que el componente se produce de manera natural, tales como otros ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, y proteínas. Las moléculas de ácido nucleico y proteínas que se han "aislado" incluyen moléculas de ácido nucleico y proteínas purificadas mediante métodos de purificación convencionales. El término también abarca moléculas de ácido nucleico y proteínas preparadas mediante expresión recombinante en una célula huésped así como moléculas de ácido nucleico y proteínas sintetizadas químicamente.

En un ejemplo, aislado se refiere a una molécula de ácido nucleico que se produce de manera natural que no es inmediatamente contigua con ambas secuencias con las que es inmediatamente contigua (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma que se produce de manera natural del organismo a partir del que se deriva.

Microorganismo: Incluye especies microbianas procariotas y eucariotas de los dominios Archaea, Bacteria y Eucarya, incluyendo este último levaduras y hongos filamentosos, protozoos, algas o protistas superiores. Los términos "células microbianas" y "microbios" se usan de manera intercambiable con el término microorganismo.

Molécula de ácido nucleico: Abarca tanto moléculas de ARN como de ADN incluyendo, sin limitación, ADNc, ADN genómico y ARNm. Incluye moléculas de ácido nucleico sintéticas, tales como las que se sintetizan químicamente o se producen de manera recombinante. La molécula de ácido nucleico puede ser bicatenaria o monocatenaria. Cuando es monocatenaria, la molécula de ácido nucleico puede ser la hebra sentido o la hebra antisentido. Además, la molécula de ácido nucleico puede ser circular o lineal.

Operativamente unido: Una primera secuencia de ácido nucleico está operativamente unida con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico está situada en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN operativamente unidas son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteína, están en el mismo marco de lectura. Configuraciones de genes separados que se transcriben en tándem como ARN mensajero individual se denominan operones. Por tanto, la colocación de genes en proximidad cercana, por ejemplo en un vector de plásmido, bajo la regulación transcripcional de un promotor individual, constituye un operón sintético.

ORF (marco de lectura abierto): Una serie de tripletes de nucleótidos (codones) que codifican para aminoácidos sin ningún codón de terminación. Habitualmente estas secuencias pueden traducirse para dar un péptido.

Sobreexpresado: Cuando se provoca que un gen se transcriba a una tasa elevada en comparación con la tasa de transcripción endógena para ese gen. En algunos ejemplos, la sobreexpresión incluye adicionalmente una tasa elevada de traducción del gen en comparación con la tasa de traducción endógena para ese gene. En la técnica se conocen métodos para someter a prueba la sobreexpresión, por ejemplo pueden evaluarse los niveles de ARN transcrito usando rtPCR y pueden evaluarse los niveles de proteínas usando análisis en gel de SDS page.

Purificado: El término purificado no requiere pureza absoluta; más bien, se pretende que sea un término relativo. Por tanto, por ejemplo, una preparación de derivado de ácido graso purificado, tal como una cera, o una preparación de éster de ácido graso, es una en la que el producto está más concentrado de lo que está el producto en su entorno dentro de una célula. Por ejemplo, una cera purificada es una que está sustancialmente separada de componentes celulares (ácidos nucleicos, lípidos, hidratos de carbono y otros péptidos) que pueden acompañarla. En otro ejemplo, una preparación de cera purificada es una en la que la cera está sustancialmente libre de contaminantes, tales como los que pueden estar presentes tras la fermentación.

En un ejemplo, un éster de ácido graso está purificado cuando al menos aproximadamente el 50% en peso de una muestra está compuesta por el éster de ácido graso, por ejemplo cuando al menos aproximadamente el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 92%, el 95%, el 98% o el 99% o más de una muestra está compuesta por el éster de ácido graso. Los ejemplos de métodos que pueden usarse para purificar ceras, alcoholes grasos y ésteres de ácidos grasos incluyen los métodos descritos en el ejemplo 11 más adelante.

Recombinante: Una molécula de ácido nucleico o proteína recombinante es una que tiene una secuencia que no se produce de manera natural, tiene una secuencia que está compuesta por una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otra forma, o ambos. Esta combinación artificial puede lograrse, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de moléculas de ácido nucleico o proteínas, tales como técnicas de ingeniería genética. Recombinante también se usa para describir moléculas de ácido nucleico que se han manipulado artificialmente, pero que contienen las mismas secuencias reguladoras y regiones codificantes que se encuentran en el organismo a partir del que se aisló el ácido nucleico. Una célula o un microorganismo recombinante es uno que contiene una molécula de ácido nucleico exógeno, tal como una molécula de ácido nucleico recombinante.

5
10
15
Liberación: El movimiento de un compuesto desde el interior de una célula (intracelular) hasta el exterior de una célula (extracelular). El movimiento puede ser activo o pasivo. Cuando la liberación es activa puede facilitarse mediante uno o más péptidos transportadores y en algunos ejemplos puede consumir energía. Cuando la liberación es pasiva, puede ser mediante difusión a través de la membrana y puede facilitarse recogiendo de manera continua el compuesto deseado del entorno extracelular, promoviendo así la difusión adicional. La liberación de un compuesto también puede lograrse lisando una célula.

20
Tensioactivos: Sustancias que pueden reducir la tensión superficial de un líquido en el que están disueltos. Normalmente están compuestos por una cabeza soluble en agua y una cola o cadena de hidrocarburo. El grupo soluble en agua es hidrófilo y puede ser o bien iónico o bien no iónico, y la cadena de hidrocarburo es hidrófoba. Los tensioactivos se usan en una variedad de productos, incluyendo detergentes y productos de limpieza, y también se usan como agentes auxiliares para materiales textiles, cuero y papel, en procedimientos químicos, en productos cosméticos y productos farmacéuticos, en la industria alimentaria y en agricultura. Además, pueden usarse para ayudar en la extracción y el aislamiento de crudos que se encuentran en entornos de acceso difícil o como emulsiones de agua.

25
Existen cuatro tipos de tensioactivos caracterizados por usos variables. Los tensioactivos aniónicos tienen actividad de tipo detergente y se usan generalmente para aplicaciones de limpieza. Los tensioactivos catiónicos contienen hidrocarburos de cadena larga y se usan a menudo para tratar proteínas y polímeros sintéticos o son componentes de suavizantes de tejidos y acondicionadores del cabello. Los tensioactivos anfóteros también contienen hidrocarburos de cadena larga y se usan normalmente en champús. Los tensioactivos no iónicos se usan generalmente en productos de limpieza.

30
35
Célula transformada o recombinante: Una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico, tal como una molécula de ácido nucleico que codifica para acil-CoA sintasa, por ejemplo mediante técnicas de biología molecular. La transformación abarca todas las técnicas mediante las que una molécula de ácido nucleico puede introducirse en una célula de este tipo, incluyendo, pero sin limitarse a, transfección con vectores virales, conjugación, transformación con vectores de plásmido e introducción de ADN desnudo mediante electroporación, lipofección y aceleración con pistola de partículas.

40
45
En condiciones que permiten la producción de producto: Cualquier condición de fermentación que permita que un microorganismo produzca un producto deseado, tal como ácidos grasos, hidrocarburos, alcoholes grasos, ceras, o ésteres de ácidos grasos. Las condiciones de fermentación incluyen habitualmente intervalos de temperatura, niveles de aeración y selección de medios, que cuando se combinan permiten que el microorganismo crezca. Los medios a modo de ejemplo incluyen caldos o geles. Generalmente, el medio incluye una fuente de carbono tal como glucosa, fructosa, celulosa, o similares que puede metabolizarse por el microorganismo directamente, o pueden usarse enzimas en el medio para facilitar la metabolización de la fuente de carbono. Para determinar si las condiciones de cultivo permiten la producción de producto, el microorganismo puede cultivarse durante 24, 36 ó 48 horas y puede obtenerse una muestra y analizarse. Por ejemplo, las células en la muestra o el medio en el que se hicieron crecer las células pueden someterse a prueba para determinar la presencia del producto deseado. Cuando se realizan pruebas para determinar la presencia de un producto pueden usarse ensayos, tales como los descritos en los ejemplos a continuación.

50
Vector: Una molécula de ácido nucleico tal como se introduce en una célula, produciendo de ese modo una célula transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que permiten que se replique en la célula, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica.

55
Cera: Una variedad de ésteres de ácidos grasos que forman sólidos o sustancias maleables en un conjunto de condiciones físicas identificadas. Los ésteres de ácidos grasos que se denominan ceras tienen generalmente cadenas de carbono más largas que los ésteres de ácidos grasos que no son ceras. Por ejemplo, una cera forma generalmente una sustancia maleable a temperatura ambiente.

Descripción detallada

I. Producción de derivados de ácidos grasos

El organismo huésped en el que se transforman secuencias de ADN exógeno puede ser un organismo huésped

modificado, tal como un organismo que se ha modificado para aumentar la producción de acil-ACP o acil-CoA, reducir el catabolismo de productos intermedios y derivados de ácidos grasos, o para reducir la inhibición por retroalimentación en puntos específicos en la ruta de biosíntesis. Además de modificar los genes descritos en el presente documento, pueden desviarse recursos celulares adicionales para sobreproducir ácidos grasos, por ejemplo pueden atenuarse las rutas de lactato, succinato y/o acetato, y puede sobreexpresarse acetil-CoA carboxilasa (ACC). Las modificaciones en el huésped de producción descrito en el presente documento pueden ser mediante alteraciones genómicas, sistemas de expresión extracromosómicos, o combinaciones de los mismos. Una visión general de la ruta se proporciona en las figuras 1 y 2.

A. Acetil-CoA - Malonil-CoA para dar Acil-ACP

Ácido graso sintasa (FAS) es un grupo de péptidos que catalizan el inicio y la elongación de cadenas de acilo (Marrakchi *et al*, Biochemical Society, 30:1050-1055, 2002). La proteína transportadora de acilo (ACP) junto con las enzimas en la ruta de FAS controlan la longitud, el grado de saturación y la ramificación de los ácidos grasos producidos. Las enzimas que pueden incluirse en FAS incluyen AccABCD, FabD, FabH, FabG, FabA, FabZ, FabI, FabK, FabL, FabM, FabB y FabF. Dependiendo del producto deseado, puede atenuarse o sobreexpresarse uno o más de estos genes.

Por ejemplo, la ruta de biosíntesis de ácidos grasos en el huésped de producción usa los precursores acetil-CoA y malonil-CoA (figura 2). *E. coli* u otros organismos huéspedes modificados por ingeniería genética para sobreproducir estos componentes pueden servir como punto de partida para etapas de modificación por ingeniería genética posteriores para proporcionar el producto de salida específico (tal como, ésteres de ácidos grasos, hidrocarburos, alcoholes grasos). Pueden realizarse varias modificaciones diferentes, o bien en combinación o bien individualmente, en la cepa huésped para obtener un aumento de la producción de acetil CoA/malonil CoA/ácido graso y derivado de ácido graso. Por ejemplo, para aumentar la producción de acetil CoA, puede construirse un plásmido con *pdh*, *panK*, *aceEF*, (que codifica para el componente de deshidrogenasa E1p y el componente de dihidrolipoamida aciltransferasa E2p de los complejos de piruvato y 2-oxoglutarato deshidrogenasa), *fabH/fabD/fabG/acpP/fabF*, y en algunos ejemplos ADN adicional que codifica para acil graso-CoA reductasas y aldehído descarboxilasas, todo bajo el control de un promotor constitutivo, o que puede controlarse de otra manera. Los números de registro de Genbank a modo de ejemplo para estos genes son: *pdh* (BAB34380, AAC73227, AAC73226), *panK* (también conocido como *coaA*, AAC76952), *aceEF* (AAC73227, AAC73226), *fabH* (AAC74175), *fabD* (AAC74176), *fabG* (AAC74177), *acpP* (AAC74178), *fabF*(AAC74179).

Adicionalmente, *fadE*, *gpsA*, *ldhA*, *pflb*, *adhE*, *pta*, *poxB*, *ackA* y/o *ackB* pueden desactivarse, o pueden reducirse sus niveles de expresión, en el microorganismo modificado por ingeniería genética mediante transformación con plásmidos no replicativos o replicativos de manera condicional que contienen mutaciones nulas o de delección de los genes correspondientes, o sustituyendo secuencias promotoras o potenciadoras. Los números de registro de Genbank a modo de ejemplo para estos genes son: *fadE* (AAC73325), *gpsA* (AAC76632), *ldhA* (AAC74462), *pflb* (AAC73989), *adhE* (AAC74323), *pta* (AAC75357), *poxB* (AAC73958), *ackA* (AAC75356) y *ackB* (BAB81430).

Los microorganismos modificados por ingeniería genética resultantes pueden hacerse crecer en un entorno deseado, por ejemplo uno con glicerol limitado (menos del 1% p/v en el medio de cultivo). Como tales, estos microorganismos tendrán niveles de producción de acetil-CoA aumentados. La sobreproducción de malonil-CoA puede efectuarse modificando por ingeniería genética el microorganismo tal como se describió anteriormente, con ADN que codifica para *accABCD* (acetil CoA carboxilasa, por ejemplo número de registro AAC73296, EC 6.4.1.2) incluido en el plásmido sintetizado *de novo*. La sobreproducción de ácidos grasos puede lograrse incluyendo además ADN que codifica para lipasa (por ejemplo números de registro CAA89087, CAA98876) en el plásmido sintetizado *de novo*.

En algunos ejemplos, se sobreexpresa acetil-CoA carboxilasa (ACC) para aumentar la concentración intracelular de la misma en al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, o al menos 10 veces, por ejemplo en relación con niveles de expresión nativos.

Además, puede usarse la mutación de *plsB* (por ejemplo número de registro AAC77011) D311E para eliminar limitaciones en la reserva de acil-CoA.

Además, puede incluirse la sobreexpresión de un gen *sfa* (supresor de FabA, por ejemplo número de registro AAN79592) en el huésped de producción para aumentar la producción de ácidos grasos monosaturados (Rock *et al*, *J. Bacteriology* 178:5382-5387, 1996).

B. Acil-ACP para dar ácido graso

Para modificar por ingeniería genética un huésped de producción para la producción de una población homogénea de derivados de ácidos grasos, pueden atenuarse o deleccionarse funcionalmente uno o más genes endógenos y pueden expresarse una o más tioesterasas. Por ejemplo, pueden producirse derivados de ácidos grasos C10 atenuando la tioesterasa C18 (por ejemplo números de registro AAC73596 y POADA1), que usa C18:1-ACP y que expresa tioesterasa C10 (por ejemplo número de registro Q39513), que usa C10-ACP. Por tanto, da como resultado una población relativamente homogénea de derivados de ácidos grasos que tienen una longitud de cadena de

5 carbono de 10. En otro ejemplo, pueden producirse derivados de ácidos grasos C14 atenuando tioesterasas endógenas que producen ácidos grasos no C14 y expresando la tioesterasa con número de registro Q39473 (que usa C14-ACP). En aún otro ejemplo, pueden producirse derivados de ácidos grasos C12 expresando tioesterasas que usan C12-ACP (por ejemplo número de registro Q41635) y atenuando tioesterasas que producen ácidos grasos no C12. Puede verificarse la sobreproducción de acetil CoA, malonil CoA y ácido graso usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo usando precursores radiactivos, HPLC y CG-EM tras la lisis celular.

Tabla 1
Tioesterasas

Número de registro	Organismo fuente	Gen	Producto preferente producido
AAC73596	<i>E. coli</i>	<i>tesA</i> sin secuencia líder	C18:1
Q41635	<i>Umbellularia californica</i>	<i>fatB</i>	C12:0
Q39513;	<i>Cuphea hookeriana</i>	<i>fatB2</i>	C8:0-C10:0
AAC49269	<i>Cuphea hookeriana</i>	<i>fatB3</i>	C14:0-C16:0
Q39473	<i>Cinnamomum camphorum</i>	<i>fatB</i>	C14:0
CAA85388	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>fatB</i> [M141T]*	C16:1
NP 189147; NP 193041	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>fatA</i>	C18:1
CAC39106	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>fatA</i>	C18:1
AAC72883	<i>Cuphea hookeriana</i>	<i>fatA</i>	C18:1

*Mayer *et al.*, *BMC Plant Biology* 7:1-11, 2007.

10 C. Ácido graso para dar acil-CoA

Los huéspedes de producción pueden modificarse por ingeniería genética usando péptidos conocidos para producir ácidos grasos de diversas longitudes. Un método de preparación de ácidos grasos implica aumentar la expresión de, o expresar formas más activas de, uno o más péptidos de acil-CoA sintasa (EC 2.3.1.86).

15 Tal como se usa en el presente documento, acil-CoA sintasa incluye péptidos con número de clasificación de enzimas EC 2.3.1.86, así como cualquier otro péptido que pueda catalizar la conversión de un ácido graso en acil-CoA. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica apreciará que algunos péptidos de acil-CoA sintasa también catalizarán otras reacciones, por ejemplo algunos péptidos de acil-CoA sintasa aceptarán otros sustratos además de ácidos grasos. Por tanto también se incluyen tales péptidos de acil-CoA sintasa no específicos. Las secuencias de péptidos de acil-CoA sintasa están disponibles públicamente. En la figura 10 se proporcionan números de registro de GenBank a modo de ejemplo.

20

D. Acil-CoA para dar alcohol graso

25 Los huéspedes de producción pueden modificarse por ingeniería genética usando polipéptidos conocidos para producir alcoholes grasos a partir de acil-CoA. Un método de preparación de alcoholes grasos implica aumentar la expresión de o expresar formas más activas de acil-CoA reductasa (FAR, EC 1.1.1.*), o acil-CoA reductasas (EC 1.2.1.50) y alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) que forman alcohol graso. A continuación en el presente documento acil-CoA reductasa (FAR, EC 1.1.1.*), acil-CoA reductasas (EC 1.2.1.50) y alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) que forman alcohol graso se denominan colectivamente péptidos que forman alcohol graso. En algunos ejemplos los tres genes que forman alcohol graso pueden sobreexpresarse en un huésped de producción, y en aún otros ejemplos uno o más de los genes que forman alcohol graso pueden sobreexpresarse.

30 Tal como se usa en el presente documento, los péptidos que forman alcohol graso incluyen péptidos con número de clasificación de enzimas EC 1.1.1.*, 1.2.1.50 y 1.1.1.1, así como cualquier otro péptido que pueda catalizar la conversión de acil-CoA en alcohol graso. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica apreciará que algunos péptidos que forman alcohol graso también catalizarán otras reacciones, por ejemplo algunos péptidos de acil-CoA reductasa aceptarán otros sustratos además de ácidos grasos. Por tanto también se incluyen tales péptidos no específicos. Las secuencias de péptidos que forman alcohol graso están disponibles públicamente. En la figura 10 se proporcionan números de registro de GenBank a modo de ejemplo.

35

40 Los alcoholes grasos también pueden describirse como tensioactivos a base de hidrocarburo. Para la producción de tensioactivo, el microorganismo se modifica de modo que produce un tensioactivo a partir de una fuente de carbono renovable. Un microorganismo de este tipo incluye una primera secuencia de ADN exógeno que codifica para una proteína que pueden convertir un ácido graso en un aldehído graso y una segunda secuencia de ADN exógeno que codifica para una proteína que puede convertir un aldehído graso en un alcohol. En algunos ejemplos, la primera secuencia de ADN exógeno codifica para una ácido graso reductasa. En una realización, la segunda secuencia de ADN exógeno codifica para aldehído reductasa microsómica de mamífero o aldehído deshidrogenasa de cadena larga. En un ejemplo adicional, las secuencias de ADN exógeno primera y segunda son de un complejo

multienzimático de *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula glutinins*, *Acinobacter sp cepa M-1* o *Candida lipolytica*. En una realización, las secuencias de ADN heterólogo primera y segunda son de un complejo multienzimático de *Acinobacter sp cepa M-1* o *Candida lipolytica*.

5 Las fuentes adicionales de secuencias de ADN heterólogo que codifican para ácido graso para dar proteínas convertidoras de alcohol de cadena larga que pueden usarse en la producción de tensioactivo incluyen, pero no se limitan a, *Mortierella alpina* (ATCC 32222), *Cryptococcus curvatus* (también denominado *Apiotricum curvatum*), *Alcanivorax jadensis* (T9T = DSM 12718 = ATCC 700854), *Acinetobacter sp. HO1-N*, (ATCC 14987) y *Rhodococcus opacus* (PD630 DSMZ 44193).

10 En un ejemplo, el derivado de ácido graso es un producto de tensioactivo saturado o insaturado que tiene un contenido en átomos de carbono limitado a entre 6 y 36 átomos de carbono. En otro ejemplo, el producto de tensioactivo tiene un contenido en átomos de carbono limitado a entre 24 y 32 átomos de carbono.

15 Huéspedes apropiados para la producción de tensioactivos pueden ser microorganismos o bien eucariotas o bien procariotas. Los huéspedes a modo de ejemplo incluyen *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula glutinins*, *Acinobacter sp cepa M-1*, *Arabidopsis thaliana* o *Candida lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* y *E. coli* modificados por ingeniería genética para expresar acetil CoA carboxilasa. También pueden usarse huéspedes que demuestran una capacidad innata para sintetizar altos niveles de precursores de tensioactivo en forma de lípidos y aceites, tales como *Rhodococcus opacus*, *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula glutinins*, *E. coli* modificados por ingeniería genética para expresar acetil CoA carboxilasa, y otras bacterias, levaduras y hongos oleaginosos.

E. Alcoholes grasos para dar ésteres grasos

20 Los huéspedes de producción pueden modificarse por ingeniería genética usando polipéptidos conocidos para producir ésteres grasos de diversas longitudes. Un método de preparación de ésteres grasos incluye aumentar la expresión de, o expresar formas más activas de, uno o más péptidos de alcohol O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.84). Estos péptidos catalizan la reacción de acetil-CoA y un alcohol para formar CoA y un éster acético. En algunos ejemplos los péptidos de alcohol O-acetiltransferasa pueden expresarse junto con péptidos de tioesterasa, péptidos de FAS y péptidos que forman alcohol graso seleccionados, permitiendo así que se controle la longitud de la cadena de carbono, la saturación y el grado de ramificación. En algunos casos el operón *bkd* puede coexpresarse para permitir que se produzcan precursores de ácidos grasos ramificados.

30 Tal como se usa en el presente documento, los péptidos de alcohol O-acetiltransferasa incluyen péptidos con número de clasificación de enzimas EC 2.3.1.84, así como cualquier otro péptido que pueda catalizar la conversión de acetil-CoA y un alcohol para formar CoA y un éster acético. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica apreciará que los péptidos de alcohol O-acetiltransferasa también catalizarán otras reacciones, por ejemplo algunos péptidos de alcohol O-acetiltransferasa aceptarán otros sustratos además de alcoholes grasos o acetil-CoA tioéster, es decir, tales como otros alcoholes y otros acil-CoA tioésteres. Por tanto también se incluyen tales péptidos de alcohol O-acetiltransferasa no específicos o de especificidad divergente. Las secuencias de péptidos de alcohol O-acetiltransferasa están disponibles públicamente. En la figura 10 se proporcionan números de registro de GenBank a modo de ejemplo. En la técnica se conocen bien ensayos para la caracterización de la actividad de péptidos de alcohol O-acetiltransferasa particulares. También pueden crearse O-acetiltransferasas y O-aciltransferasas modificadas por ingeniería genética que tienen nuevas actividades y especificidades para el grupo acilo donador o el resto alcohol aceptor. Podrían generarse enzimas modificadas por ingeniería genética mediante enfoques racionales y evolutivos bien documentados en la técnica.

F. Acil-CoA para dar ésteres grasos (biodiésel y ceras)

45 Los huéspedes de producción pueden modificarse por ingeniería genética usando péptidos conocidos para producir ésteres de ácidos grasos a partir de acil-CoA y alcoholes. En algunos ejemplos los alcoholes se proporcionan en los medios de fermentación y en otros ejemplos el huésped de producción puede proporcionar el alcohol tal como se describe en el presente documento. Un experto habitual en la técnica apreciará que, estructuralmente, los ésteres de ácidos grasos tienen un lado A y uno B. Tal como se describe en el presente documento, el lado A del éster se usa para describir la cadena de carbono que aporta el alcohol, y el lado B del éster se usa para describir la cadena de carbono que aporta el acil-CoA. Cualquiera de las cadenas puede estar saturada o insaturada, ramificada o no ramificada. El huésped de producción puede modificarse por ingeniería genética para producir alcoholes grasos o alcoholes de cadena corta. El huésped de producción también puede modificarse por ingeniería genética para producir moléculas de acil-CoA específicas. Tal como se usa en el presente documento los ésteres de ácidos grasos son ésteres derivados de un acilo graso-tioéster y un alcohol, en los que el lado A y el lado B del éster pueden variar en longitud independientemente. Generalmente, el lado A del éster tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 carbonos de longitud, mientras que el lado B del éster tiene 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ó 26 carbonos de longitud. El lado A y el lado B pueden ser de cadena lineal o ramificados, saturados o insaturados.

La producción de ésteres grasos, incluyendo ceras a partir de acil-CoA y alcoholes puede modificarse por ingeniería genética usando polipéptidos conocidos. Tal como se usa en el presente documento, las ceras son ésteres de ácidos grasos de cadena larga, en los que el lado A y el lado B del éster pueden variar en longitud

independientemente. Generalmente, el lado A del éster tiene al menos 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ó 26 carbonos de longitud. De manera similar el lado B del éster tiene al menos 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ó 26 carbonos de longitud. El lado A y el lado B pueden estar mono, di, triinsaturados. La producción de ésteres grasos, incluyendo ceras a partir de acil-CoA y alcoholes puede modificarse por ingeniería genética usando polipéptidos conocidos. Un método de preparación de ésteres grasos incluye aumentar la expresión de o expresar formas más activas de una o más cera sintasas (EC 2.3.1.75).

Tal como se usa en el presente documento, las cera sintasas incluyen péptidos con número de clasificación de enzimas EC 2.3.1.75, así como cualquier otro péptido que pueda catalizar la conversión de un acil-tioéster en ésteres grasos. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica apreciará que algunos péptidos de cera sintasa también catalizarán otras reacciones, por ejemplo algunos péptidos de cera sintasa aceptarán acil-CoA de cadena corta y alcoholes de cadena corta para producir ésteres grasos. Por tanto también se incluyen tales cera sintasas no específicas. Las secuencias de péptidos de cera sintasa están disponibles públicamente. En la figura 10 se proporcionan números de registro de GenBank a modo de ejemplo. En la patente estadounidense número 7.118.896 se proporcionan métodos para identificar la actividad cera sintasa.

En ejemplos particulares, si el producto deseado es un biocombustible a base de éster graso, el microorganismo se modifica de modo que produce un éster graso generado a partir de una fuente de energía renovable. Un microorganismo de este tipo incluye una secuencia de ADN exógeno que codifica para una éster de cera sintasa que se expresa para conferir a dicho microorganismo la capacidad para sintetizar un éster graso saturado, insaturado o ramificado a partir de una fuente de energía renovable. En algunas realizaciones, las proteínas de síntesis de éster de cera incluyen, pero no se limitan a: ácido graso elongasas, acil-CoA reductasas, aciltransferasas o cera sintasas, acil graso transferasas, diacilglicerol aciltransferasas, acil-coa cera alcohol aciltransferasas, éster de cera sintasa/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa bifuncional seleccionada de un complejo multienzimático de *Simmondsia chinensis*, *Acinetobacter* sp. cepa ADPI (anteriormente *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1), *Pseudomonas aeruginosa*, *Fundibacter jadensis*, *Arabidopsis thaliana* o *Alkaligenes eutrophus*. En una realización, las ácido graso elongasas, acil-CoA reductasas o cera sintasas son de un complejo multienzimático de *Alkaligenes eutrophus* y otros organismos que se sabe en la bibliografía que producen cera y ésteres de ácidos grasos.

Fuentes adicionales de ADN heterólogo que codifica para proteínas de síntesis de cera útiles en la producción de éster graso incluyen, pero no se limitan a, *Mortierella alpina* (por ejemplo ATCC 32222), *Cryptococcus curvatus*, (también denominado *Apiotricum curvatum*), *Alcanivorax jadensis* (por ejemplo T9T = DSM 12718 = ATCC 700854), *Acinetobacter* sp. HO1-N, (por ejemplo ATCC 14987) y *Rhodococcus opacus* (por ejemplo PD630, DSMZ 44193).

Los métodos descritos en el presente documento permiten la producción de ésteres grasos de longitud variable. En un ejemplo, el producto de éster graso es un producto de éster graso saturado o insaturado que tiene un contenido en átomos de carbono de entre 24 y 46 átomos de carbono. En una realización, el producto de éster graso tiene un contenido en átomos de carbono de entre 24 y 32 átomos de carbono. En otra realización el producto de éster graso tiene un contenido en carbono de 14 y 20 carbonos. En otra realización el éster graso es el éster metílico de C18:1. En otra realización el éster de ácido graso es el éster etílico de C16:1. En otra realización el éster graso es el éster metílico de C16:1. En otra realización el éster de ácido graso es éster octadecílico de octanol.

Huéspedes útiles para producir ésteres grasos pueden ser microorganismos o bien eucariotas o bien procariotas. En algunas realizaciones tales huéspedes incluyen, pero no se limitan a, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica*, *E. coli*, *Arthrobacter* AK 19, *Rhodotorula glutinins*, *Acinobacter* sp cepa M-1, *Candida lipolytica* y otros microorganismos oleaginosos.

En un ejemplo se usa la éster de cera sintasa de *Acinetobacter* sp. ADP1 en el locus AAO17391 (descrito en Kalscheuer y Steinbuchel, J. Biol. Chem. 278:8075-8082, 2003). En otro ejemplo se usa la éster de cera sintasa de *Simmondsia chinensis*, en el locus AAD38041.

Opcionalmente puede usarse un exportador de éster de cera tal como un miembro de la familia FATP para facilitar la liberación de ceras o ésteres al entorno extracelular. Un ejemplo de un exportador de éster de cera que puede usarse es la proteína de transporte de ácido graso (de cadena larga) CG7400-PA, isoforma A de *Drosophila melanogaster*, en el locus NP_524723.

G. Acil-ACP, Acil-CoA para dar hidrocarburo

Se sabe que una diversidad de microorganismos producen hidrocarburos, tales como alcanos, olefinas e isoprenoides. Muchos de estos hidrocarburos se derivan de la biosíntesis de ácidos grasos. La producción de estos hidrocarburos puede controlarse controlando los genes asociados con la biosíntesis de ácidos grasos en los huéspedes nativos. Por ejemplo, la biosíntesis de hidrocarburos en las algas *Botryococcus braunii* se produce a través de la descarboxilación de aldehídos grasos. Los aldehídos grasos se producen mediante la reducción de acil graso-tioésteres mediante acil graso-CoA reductasa. Por tanto, la estructura de los alcanos finales puede controlarse modificando por ingeniería genética *B. braunii* para expresar genes específicos, tales como tioesterasas, que controlan la longitud de cadena de los ácidos grasos canalizados a la biosíntesis de alcanos. La expresión de las enzimas que dan como resultado la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada en *B. braunii* dará como

resultado la producción de alcanos de cadena ramificada. La introducción de genes que efectúan la producción de desaturación de ácidos grasos dará como resultado la producción de olefinas. Combinaciones adicionales de estos genes pueden proporcionar control adicional sobre la estructura final de los hidrocarburos producidos. Para producir niveles más altos de los hidrocarburos nativos o modificados por ingeniería genética, pueden expresarse, sobreexpresarse o atenuarse los genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos y sus precursores o la degradación en otros productos. Cada uno de éstos enfoques puede aplicarse a la producción de alcanos en *Vibrio furnissi* M1 y sus homólogos funcionales, que produce alcanos a través de una reducción de alcoholes grasos (véase anteriormente para la biosíntesis y la modificación por ingeniería genética de la producción de alcoholes grasos). Cada uno de estos enfoques puede aplicarse también a la producción de las olefinas producidas por muchas cepas de *Micrococcus luteus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Jeogalicoccus sp.* (ATCC8456) y microorganismos relacionados. Estos microorganismos producen olefinas internas de cadena larga que se derivan de la condensación cabeza a cabeza de precursores de ácidos grasos. El control de la estructura y el nivel de precursores de ácidos grasos usando los métodos descritos en el presente documento darán como resultado la formación de olefinas de diferente longitud de cadena, ramificación y nivel de saturación.

Los hidrocarburos también pueden producirse usando óxido/reductasas evolucionadas para la reducción de alcoholes primarios. Se sabe que se usan alcoholes grasos primarios para producir alcanos en microorganismos tales como *Vibrio furnissii* M1 (Myong-Ok, J. Bacteriol., 187:1426-1429, 2005). Una óxido/reductasa dependiente de NAD(P)H es el catalizador responsable. Pueden producirse oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H sintéticas mediante el uso de modificación por ingeniería genética evolutiva y pueden expresarse en huéspedes de producción para producir derivados de ácidos grasos. Un experto habitual en la técnica apreciará que el procedimiento de "evolucionar" una alcohol graso reductasa para que tenga la actividad deseada se conoce bien (Kolkman y Stemmer Nat Biotechnol. 19:423-8, 2001, Ness *et al.*, Adv Protein Chem. 55:261-92, 2000, Minshull y Stemmer Curr Opin Chem Biol. 3:284-90, 1999, Huisman y Gray Curr Opin Biotechnol. Aug;13:352-8, 2002, y véase la solicitud de patente estadounidense 2006/0195947). Se genera una biblioteca de oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H mediante métodos convencionales, tales como PCR propensa a error, mutagénesis al azar específica de sitio, mutagénesis por saturación específica de sitio o mutagénesis específica dirigida al sitio. Adicionalmente, puede crearse una biblioteca a través del "intercambio" de secuencias que codifican para oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H que se producen de manera natural. La biblioteca se expresa en un huésped adecuado, tal como *E. coli*. Entonces se analizan colonias individuales que expresan un miembro diferente de la biblioteca de óxido/reductasa para determinar su expresión de una óxido/reductasa que puede catalizar la reducción de un alcohol graso. Por ejemplo, cada célula puede someterse a ensayo como bioconversión de célula completa, un extracto celular, una célula permeabilizada o una enzima purificada. Las alcohol graso reductasas se identifican mediante la monitorización de la oxidación dependiente de alcohol graso de NAD(P)H espectrofotométricamente o fluorimétricamente. La producción de alcanos se monitoriza mediante CG/EM, CCF u otros métodos. Se usa una óxido/reductasa identificada de esta manera para producir alcanos, alquenos e hidrocarburos ramificados relacionados. Esto se logra o bien *in vitro* o bien *in vivo*. Esto último se logra expresando el gen de alcohol graso reductasa evolucionada en un organismo que produce alcoholes grasos, tales como los descritos en el presente documento. Los alcoholes grasos actúan como sustratos para la alcohol reductasa que produciría alcanos. Otras oxidorreductasas también pueden modificarse por ingeniería genética para catalizar esta reacción, tal como las que usan hidrógeno molecular, glutatión, FADH u otras coenzimas reductoras.

II. Modificación por ingeniería genética de la cepa de producción para aumentar la producción de derivados de ácidos grasos

Pueden introducirse de manera estable o transitoria secuencias de ADN heterólogas implicadas en una ruta de biosíntesis para la producción de derivados de ácidos grasos en una célula huésped usando técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas, conjugación, transducción, y similares. Para la transformación estable, una secuencia de ADN puede incluir además un marcador seleccionable, tal como, resistencia a antibióticos, por ejemplo resistencia a neomicina, tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina, genes que complementan deficiencias auxotróficas, y similares.

Diversas realizaciones de esta divulgación utilizan un vector de expresión que incluye una secuencia de ADN heterólogo que codifica para una proteína implicada en una ruta metabólica o de biosíntesis. Los vectores de expresión adecuados incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, tales como vectores de baculovirus, vectores de fago, tales como vectores de bacteriófago, plásmidos, fagémidos, cósmidos, fósmodos, cromosomas artificiales bacterianos, vectores virales (por ejemplo vectores virales basados en virus vaccinia, poliovirus, adenovirus, virus adenoasociado, SV40, virus del herpes simple, y similares), cromosomas artificiales basados en P1, plásmidos de levadura, cromosomas artificiales de levadura, y cualquier otro vector específico para huéspedes específicos de interés (tales como *E. coli*, *Pseudomonas pisum* y *Saccharomyces cerevisiae*).

Los vectores de expresión útiles pueden incluir uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas. El gen marcador seleccionable codifica para una proteína necesaria para la supervivencia o el crecimiento de células huésped transformadas que se han hecho crecer en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped no transformadas con el vector que contiene el gen marcador seleccionable no sobrevivirán en el medio de cultivo. Genes de selección típicos codifican para proteínas

que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de los medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica para D-alanina racemasa para bacilos. En realizaciones alternativas, el gen marcador seleccionable es uno que codifica para dihidrofolato reductasa o confiere resistencia a neomicina (para su uso en cultivo de células eucariotas), o uno que confiere resistencia a tetraciclina o ampicilina (para su uso en una célula huésped procarionta, tal como *E. coli*).

La secuencia de ADN que codifica para el producto génico de la ruta de biosíntesis en el vector de expresión está operativamente unida a una secuencia de control de la expresión apropiada, (promotores, potenciadores, y similares) para dirigir la síntesis del producto génico codificado. Tales promotores pueden derivarse de fuentes microbianas o virales, incluyendo CMV y SV40. Dependiendo del sistema de huésped/vector utilizado, pueden usarse cualquiera de varios elementos de control de la transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles, elementos potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, etc. en el vector de expresión (véase por ejemplo, Bitter *et al.* *Methods In Enzymology*, 153:516-544, 1987).

Los promotores adecuados para su uso en células huésped procariontas incluyen, pero no se limitan a, promotores que pueden reconocer las polimerasas T4, T3, Sp6 y T7, los promotores P_R y P_L del bacteriófago lambda, los promotores trp, recA, de choque térmico y lacZ de *E. coli*, los promotores de alfa-amilasa y específicos de sigma de *B. subtilis*, los promotores de los bacteriófagos de *Bacillus*, promotores de *Streptomyces*, el promotor int del bacteriófago lambda, el promotor bla del gen de beta-lactamasa de pBR322 y el promotor CAT del gen de cloranfenicol acetil transferasa. Se revisan promotores de procariontas por Glick, J. *Ind Microbiol.* 1:277, 1987; Watson *et al.*, *MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE*, 4^a ed., Benjamin Cummins (1987); y Sambrook *et al.*, citados anteriormente.

Los ejemplos no limitativos de promotores eucariotas adecuados para su uso dentro de un huésped eucariota son de origen viral e incluyen el promotor del gen de metalotioneína I de ratón (Hamer *et al.*, *J. Mol. Appl. Gen.* 1:273, 1982); el promotor TK del virus del herpes (McKnight, *Cell* 31:355, 1982); el promotor temprano de SV40 (Benoist *et al.*, *Nature* (Londres) 290:304, 1981); el promotor del virus del sarcoma de Rous; el promotor de citomegalovirus (Foeking *et al.*, *Gene* 45:101, 1980); el promotor del gen gal4 de levadura (Johnston, *et al.*, *PNAS* (USA) 79:6971, 1982; Silver, *et al.*, *PNAS* (USA) 81:5951, 1984); y el promotor de IgG (Orlandi *et al.*, *PNAS* (USA) 86:3833, 1989).

La célula huésped microbiana puede modificarse genéticamente con una secuencia de ADN heterólogo que codifica para un producto génico de la ruta de biosíntesis que está operativamente unida a un promotor inducible. En la técnica se conocen bien promotores inducibles. Los promotores inducibles adecuados incluyen, pero no se limitan a promotores que se ven afectados por proteínas, metabolitos o productos químicos. Éstos incluyen: un promotor del virus de leucemia bovina, un promotor de metalotioneína, un promotor de MMTV inducible por dexametasona, un promotor de SV40, un promotor de MRP polIII, un promotor de CMV inducible por tetraciclina (tal como el promotor de CMV inmediato-temprano humano) así como los de los operones trp y lac.

En algunos ejemplos una célula huésped modificada genéticamente está modificada genéticamente con una secuencia de ADN heterólogo que codifica para un producto génico de la ruta de biosíntesis que está operativamente unida a un promotor constitutivo. En la técnica se conocen promotores constitutivos adecuados e incluyen, promotor tardío principal de adenovirus constitutivo, un promotor de MPSV constitutivo y un promotor de CMV constitutivo.

En algunos ejemplos una célula huésped modificada es una que está modificada genéticamente con una secuencia de ADN exógeno que codifica para una proteína individual implicada en una ruta de biosíntesis. En otras realizaciones, una célula huésped modificada es una que está modificada genéticamente con secuencias de ADN exógeno que codifican para dos o más proteínas implicadas en una ruta de biosíntesis, por ejemplo, la primera y la segunda enzima en una ruta de biosíntesis.

Cuando la célula huésped está modificada genéticamente para expresar dos o más proteínas implicadas en una ruta de biosíntesis, esas secuencias de ADN pueden estar cada una contenida en un vector de expresión individual o en vectores de expresión separados. Cuando esas secuencias de ADN están contenidas en un vector de expresión individual, en algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos estarán operativamente unidas a un elemento de control común (por ejemplo, un promotor), por ejemplo, el elemento de control común controla la expresión de todas las secuencias de ADN que codifican para proteínas de la ruta de biosíntesis en el vector de expresión individual.

Cuando una célula huésped modificada está modificada genéticamente con secuencias de ADN heterólogo que codifican para dos o más proteínas implicadas en una ruta de biosíntesis, una de las secuencias de ADN puede estar operativamente unida a un promotor inducible, y una o más de las secuencias de ADN pueden estar operativamente unidas a un promotor constitutivo.

En algunas realizaciones, la concentración intracelular (por ejemplo, la concentración del producto intermedio en la célula huésped modificada genéticamente) del producto intermedio de la ruta de biosíntesis puede aumentarse para mejorar adicionalmente el rendimiento del producto final. La concentración intracelular del producto intermedio puede aumentarse de varias maneras, incluyendo, pero sin limitarse a, aumentar la concentración en el medio de

cultivo de un sustrato para una ruta de biosíntesis; aumentar la actividad catalítica de una enzima que es activa en la ruta de biosíntesis; aumentar la cantidad intracelular de un sustrato (por ejemplo, un sustrato primario) para una enzima que es activa en la ruta de biosíntesis; y similares.

5 En algunos ejemplos el producto intermedio o derivado de ácido graso se produce en el citoplasma de la célula. La concentración citoplasmática puede aumentarse de varias maneras, incluyendo, pero sin limitarse a, unión del ácido graso a coenzima A para formar un acil-CoA tioéster. Adicionalmente, la concentración de acil-CoA puede aumentarse mediante el aumento de la biosíntesis de CoA en la célula, tal como sobreexpresando genes asociados con la biosíntesis de pantotenato (*panD*) o desactivando los genes asociados con la biosíntesis de glutatión (glutatión sintasa).

10 III. Características de la cadena de carbono

Usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento puede producirse una gama de productos. Estos productos incluyen hidrocarburos, alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos y ceras. Algunos de estos productos son útiles como biocombustibles y productos químicos especializados. Estos productos pueden diseñarse y producirse en microorganismos. Los productos pueden producirse de manera que contengan puntos de ramificación, niveles de saturación y longitud de cadena de carbono, por tanto, haciendo que estos productos sean materiales de partida deseables para su uso en muchas aplicaciones (la figura 10 proporciona una descripción de las diversas enzimas que pueden usarse solas o en combinación para preparar diversos derivados de ácidos grasos).

15 En otros ejemplos, la expresión de genes de FAS exógenos que se originan a partir de especies diferentes o variantes modificadas por ingeniería genética puede introducirse en la célula huésped para dar como resultado la biosíntesis de metabolitos de ácidos grasos diferentes estructuralmente (en longitud, ramificación, grado de insaturación, etc.) a los del huésped nativo. Estos productos génicos heterólogos también pueden elegirse o modificarse por ingeniería genética de manera que no se vean afectados por los mecanismos reguladores complejos naturales en la célula huésped y, por tanto, funcionen de una manera que es más controlable para la producción del producto comercial deseado. Por ejemplo las enzimas FAS de *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces spp*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Corynebacteria*, *Brevibacteria*, *Mycobacteria*, levadura oleaginosa, y similares pueden expresarse en el huésped de producción.

20 Un experto habitual en la técnica apreciará que cuando un huésped de producción se modifica por ingeniería genética para que produzca un ácido graso a partir de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos que contiene un nivel específico de insaturación, ramificación o longitud de cadena de carbono, el ácido graso modificado por ingeniería genética resultante puede usarse en la producción de los derivados de ácidos grasos. Por tanto, los derivados de ácidos grasos generados a partir del huésped de producción pueden presentar características del ácido graso modificado por ingeniería genética. Por ejemplo, un huésped de producción puede modificarse por ingeniería genética para preparar ácidos grasos de cadena corta, ramificados, y entonces usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento que se refieren a la producción de alcohol graso (es decir que incluyen enzimas que forman alcohol tales como FAR) el huésped de producción produce alcoholes grasos de cadena corta, ramificados. De manera similar, puede producirse un hidrocarburo modificando por ingeniería genética un huésped de producción para producir un ácido graso que tiene un nivel definido de ramificación, insaturación y/o longitud de cadena de carbono, produciendo así una población de hidrocarburos homogénea. Además, cuando se desea un alcohol, éster de ácido graso o hidrocarburo insaturado, la ruta de biosíntesis de ácidos grasos puede modificarse por ingeniería genética para producir niveles bajos de ácidos grasos saturados y puede expresarse una desaturasa adicional para reducir la producción de producto saturado.

A. Saturación

25 Los huéspedes de producción pueden modificarse por ingeniería genética para producir ácidos grasos insaturados modificando por ingeniería genética el huésped de producción para sobreexpresar *fabB*, o haciendo crecer el huésped de producción a temperaturas bajas (por ejemplo inferiores a 37°C). *FabB* tiene preferencia por cis- δ^3 decenoil-ACP y da como resultado la producción de ácidos grasos insaturados en *E. coli*. La sobreexpresión de *FabB* dio como resultado la producción de un porcentaje significativo de ácidos grasos insaturados (de Mendoza *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 258:2098-101, 1983). Estos ácidos grasos insaturados pueden usarse entonces como productos intermedios en huéspedes de producción que están modificados por ingeniería genética para producir derivados de ácidos grasos, tales como alcoholes grasos, ésteres, ceras, olefinas, alcanos, y similares. Un experto habitual en la técnica apreciará que atenuando *fabA*, o sobreexpresando *FabB* y expresando tioesterasas específicas (descritas a continuación), pueden producirse derivados de ácidos grasos insaturados que tienen una longitud de cadena de carbono deseada. Alternativamente, puede delecionarse el represor de la biosíntesis de ácidos grasos, *FabR* (registro de Genbank NP_418398), lo que también dará como resultado el aumento de la producción de ácidos grasos insaturados en *E. coli* (Zhang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277: págs. 15558, 2002.). Puede lograrse un aumento adicional de ácidos grasos insaturados mediante la sobreexpresión de *FabM* (trans-2, cis-3-decenoil-ACP isomerasa, registro de Genbank DAA05501) y la expresión controlada de *FabK* (trans-2-enoil-ACP reductasa II, registro de Genbank NP_357969) de *Streptococcus pneumoniae* (Marrakchi *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277: 44809, 2002), mientras que se deleciona *Fab I* de *E. coli* ((trans-2-enoil-ACP reductasa, registro de Genbank NP_415804). Adicionalmente, para aumentar el porcentaje de ésteres de ácidos grasos insaturados, el microorganismo también

puede tener sobreexpresado *fabB* (que codifica para β -cetoacil-ACP sintasa I, registros: BAA16180, EC:2.3.1.41), *Sfa* (que codifica para un supresor de *fabA*, registro: AAC44390) y *gnsA* y *gnsB* (que codifican ambos para supresores mutantes nulos de *secG*, también conocidos como proteínas de choque de frío, registro: ABD18647.1, AAC74076.1).

- 5 En algunos ejemplos, el gen de *fabF* endógeno puede estar atenuado, aumentando así el porcentaje de palmitoleato (C16:1) producido.

B. Ramificación que incluye restos cíclicos

Pueden producirse derivados de ácidos grasos que contienen puntos de ramificación, restos cíclicos y combinaciones de los mismos, usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

- 10 Pueden modificarse por ingeniería genética microorganismos que producen de manera natural ácidos grasos lineales (sFA) para producir ácidos grasos de cadena ramificada (brFA) expresando una o más secuencias de ácido nucleico exógeno. Por ejemplo, *E. coli* produce de manera natural ácidos grasos lineales (sFA). Para modificar por ingeniería genética *E. coli* para producir brFA, pueden introducirse y expresarse varios genes que proporcionan precursores ramificados (operón *bkd*) y permiten el inicio de la biosíntesis de ácidos grasos a partir de precursores ramificados (*fabH*). Adicionalmente, el organismo puede expresar genes para la elongación de brFA (por ejemplo ACP, *FabF*) y/o deletionar los genes de *E. coli* correspondientes que normalmente conducen a sFA y competirían con los genes introducidos (por ejemplo *FabH*, *FabF*).

- 20 Los acil-CoA, 2-metil-butiril-CoA, isovaleril-CoA e isobutil-CoA ramificados son los precursores de brFA. En la mayoría de los microorganismos que contienen brFA, se sintetizan en dos etapas (descritas en detalle a continuación) a partir de aminoácidos ramificados (isoleucina, leucina y valina) (Kadena, Microbiol. Rev. 55: págs. 288, 1991). Para modificar por ingeniería genética un microorganismo para producir brFA, o para sobreproducir brFA, puede modificarse por ingeniería genética la expresión o sobreexpresión de una o más de las enzimas en estas dos etapas. Por ejemplo, en algunos casos el huésped de producción puede tener una enzima endógena que puede llevar a cabo una etapa y, por tanto, sólo es necesario expresar de manera recombinante las enzimas implicadas en la segunda etapa.

- 30 La primera etapa en la formación de ácidos grasos ramificados es la producción de los α -cetoácidos correspondientes mediante una aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa. *E. coli* tiene una enzima de este tipo, *IlvE* (EC 2.6.1.42; registro de Genbank YP_026247). En algunos ejemplos, puede no expresarse una aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa heteróloga. Sin embargo, *IlvE* de *E. coli* o cualquier otra aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa, por ejemplo *ilvE* de *Lactococcus lactis* (registro de Genbank AAF34406), *ilvE* de *Pseudomonas putida* (registro de Genbank NP_745648) o *ilvE* de *Streptomyces coelicolor* (registro de Genbank NP_629657) puede sobreexpresarse en un microorganismo huésped, si la reacción de la aminotransferasa resulta ser limitante de la velocidad en la biosíntesis de brFA en el organismo huésped elegido para la producción de derivados de ácidos grasos.

- 35 La segunda etapa, la descarboxilación oxidativa de los α -cetoácidos para dar el acil-CoA de cadena ramificada correspondiente, se cataliza mediante complejos de α -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa (*bkd*; EC 1.2.4.4.) (Denoya *et al.* J. Bacteriol. 177: págs. 3504, 1995), que consisten en las subunidades *E1* α / β (descarboxilasa), *E2* (dihidrolipoil transacilasa) y *E3* (dihidrolipoil deshidrogenasa) y son similares a complejos de piruvato y α -cetoglutarato deshidrogenasa. La tabla 2 muestra posibles genes *bkd* de varios microorganismos, que pueden expresarse en un huésped de producción para proporcionar precursores de acil-CoA de cadena ramificada. Básicamente, cada microorganismo que presenta brFA y/o crece en aminoácidos de cadena ramificada puede usarse como fuente para aislar genes *bkd* para la expresión en huéspedes de producción tales como, por ejemplo, *E. coli*. Además, *E. coli* tiene el componente *E3* (como parte de su complejo de piruvato deshidrogenasa; *lpd*, EC 1.8.1.4, registro de Genbank NP_414658), por tanto, puede ser suficiente expresar sólo los genes *bkd* de *E1* α / β y *E2*.

Tabla 2

Genes *bkd* de microorganismos seleccionados

Organismo	Gen	N.º de registro de Genbank
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>bkdA1</i> (<i>E1</i> α)	NP_628006
	<i>bkdB1</i> (<i>E1</i> β)	NP_628005
	<i>bkdC1</i> (<i>E2</i>)	NP_638004
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>bkdA2</i> (<i>E1</i> α)	NP_733618
	<i>bkdB2</i> (<i>E1</i> β)	NP_628019
	<i>bkdC2</i> (<i>E2</i>)	NP_628018
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>bkdA</i> (<i>E1a</i>)	BAC72074
	<i>bkdB</i> (<i>E1b</i>)	BAC72075
	<i>bkdC</i> (<i>E2</i>)	BAC72076

<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>bkdF</i> (E1 α) <i>bkdG</i> (E1 β) <i>bkdH</i> (E2)	BAC72088 BAC72089 BAC72090
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>bkdAA</i> (E1 α) <i>bkdAB</i> (E1 β) <i>bkdB</i> (E2)	NP_390288 NP_390288 NP_390288
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>bkdA1</i> (E1 α) <i>bkdA2</i> (E1 β) <i>bkdC</i> (E2)	AAA65614 AAA65615 AAA65617

En otro ejemplo, puede producirse isobutiril-CoA en un huésped de producción, por ejemplo en *E. coli*, a través de la coexpresión de una crotonil-CoA reductasa (Ccr, EC 1.1.1.9) e isobutiril-CoA mutasa (subunidad grande IcmA, EC 5.4.99.2; subunidad pequeña IcmB, EC 5.4.99.13) (Han y Reynolds J. *Bacteriol.* 179: págs. 5157, 1997). Crotonil-CoA es un producto intermedio en la biosíntesis de ácidos grasos en *E. coli* y otros microorganismos. En la tabla 3 se proporcionan ejemplos de genes *ccr* e *icm* de microorganismos seleccionados.

Tabla 3

Genes *ccr* e *icm* de microorganismos seleccionados

Organismo	Gen	N.º de registro de Genbank
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>ccr</i> <i>icmA</i> <i>icmB</i>	NP_630556 NP_629554 NP_630904
<i>Streptomyces cinnamonensis</i>	<i>ccr</i> <i>icmA</i> <i>icmB</i>	AAD53915 AAC08713 AJ246005

Además de la expresión de los genes *bkd* (véase anteriormente), el inicio de la biosíntesis de brFA utiliza β -cetoacil-proteína transportadora sintasa III (FabH, EC 2.3.1.41) con especificidad por acilo de cadena ramificada CoA (Li *et al. J. Bacteriol.* 187: págs. 3795, 2005). En la tabla 4 se enumeran ejemplos de tales FabH. Genes *FabH* que están implicados en la biosíntesis de ácidos grasos de cualquier microorganismo que contiene brFA pueden expresarse en un huésped de producción. Las enzimas Bkd y FabH de huéspedes de producción que no producen de manera natural brFA pueden no soportar la producción de brFA y, por tanto, Bkd y FabH pueden expresarse de manera recombinante. De manera similar, el nivel endógeno de producción de Bkd y FabH puede no ser suficiente para producir brFA, por tanto, pueden sobreexpresarse. Adicionalmente, pueden expresarse otros componentes de la maquinaria de biosíntesis de ácidos grasos, tales como proteínas transportadoras de acilo (ACP) y candidatos a β -cetoacil-acil-proteína transportadora sintasa II son proteínas transportadoras de acilo (ACP) y β -cetoacil-acil-proteína transportadora sintasa II (*fabF*, EC 2.3.1.41) (en la tabla 4 se enumeran los candidatos). Además de expresar estos genes, pueden atenuarse algunos genes en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos endógena en el huésped de producción. Por ejemplo, en *E. coli* los candidatos que es más probable que interfieran con la biosíntesis de brFA son los genes *fabH* (n.º de registro de Genbank NP_415609) y/o *fabF* (n.º de registro de Genbank NP_415613).

Tal como se mencionó anteriormente, mediante la combinación de la expresión de genes que apoyan la síntesis de brFA y la síntesis de alcohol, pueden producirse alcoholes de cadena ramificada. Por ejemplo, cuando se coexpresa una alcohol reductasa tal como *Acr1* de *Acinetobacter baylyi* ADP1 con un operón *bkd*, *E. coli* puede sintetizar isopentanol, isobutanol o 2-metil-butanol. De manera similar, cuando se coexpresa *Acr1* con genes de *ccr/icm*, *E. coli* puede sintetizar isobutanol.

Con el fin de convertir un huésped de producción tal como *E. coli* en un organismo que pueda sintetizar ácidos grasos cíclicos ω (cyFA), es necesario introducir y expresar varios genes que proporcionan el precursor cíclico ciclohexilcarbonil-CoA (Cropp *et al. Nature Biotech.* 18: págs. 980, 2000). Los genes enumerados en la tabla 4 (*fabH*, ACP y *fabF*) pueden expresarse entonces para permitir el inicio y la elongación de ácidos grasos cíclicos ω . Alternativamente, los genes homólogos pueden aislarse a partir de microorganismos que producen cyFA y se expresan en *E. coli*.

Tabla 4

Genes *FabH*, ACP y *fabF* de microorganismos seleccionados con brFA

Organismo	Gen	N.º de registro de Genbank
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>fabH1</i> ACP <i>fabF</i>	NP_626634 NP_626635 NP_626636
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>fabH3</i> <i>fabC3</i> (ACP)	NP_823466 NP_823467

	<i>fabF</i>	NP_823468
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>fabH_A</i>	NP_389015
	<i>fabH_B</i>	NP_388898
	<i>ACP</i>	NP_389474
	<i>fabF</i>	NP_389016
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	SmaIDRAFT_0818 (<i>FabH</i>)	ZP_01643059
	SmaIDRAFT_0821 (<i>ACP</i>)	ZP_01643063
	SmaIDRAFT_0822 (<i>FabF</i>)	ZP_01643064
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>FabH</i>	YP_123672
	<i>ACP</i>	YP_123675
	<i>fabF</i>	YP_123676

La expresión de los siguientes genes es suficiente para proporcionar ciclohexilcarbonil-CoA en *E. coli*: *ansJ*, *ansK*, *ansL*, *chcA* y *ansM* de la agrupación génica de ansatrienina de *Streptomyces collinus* (Chen *et al.*, Eur. J. Biochem. 261: págs. 1999, 1999) o *plmJ*, *plmK*, *plmL*, *chcA* y *plmM* de la agrupación génica de foslactomicina B de *Streptomyces* sp. HK803 (Palaniappan *et al.*, J. Biol. Chem. 278: págs. 35552, 2003) junto con el gen *chcB* (Patton *et al.* Biochem., 39: págs. 7595, 2000) de *S. collinus*, *S. avermitilis* o *S. coelicolor* (véase la tabla 5 para los números de registro de Genbank).

Tabla 5

Genes para la síntesis de ciclohexilcarbonil-CoA

Organismo	Gen	N.º de registro de Genbank
<i>Streptomyces collinus</i>	<i>ansJK</i>	U72144*
	<i>ansL</i>	
	<i>chcA</i>	
	<i>ansL chcB</i>	AF268489
<i>Streptomyces</i> sp. HK803	<i>plmJK</i>	AAQ84158
	<i>plmL</i>	AAQ84159
	<i>chcA</i>	AAQ84160
	<i>plmM</i>	AAQ84161
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>chcB/caiD</i>	NP_629292
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>chcB/caiD</i>	NP_629292

10 Sólo *chcA* se anota en la entrada de Genbank U72144, *ansJKLM* son según Chen *et al.* (Eur. J. Biochem. 261: págs. 1999, 1999)

15 Los genes enumerados en la tabla 4 (*fabH*, *ACP* y *fabF*) son suficientes para permitir la iniciación y el alargamiento de ácidos grasos cíclicos ω debido a que pueden tener una amplia especificidad de sustrato. En el caso de que la coexpresión de cualquiera de estos genes con los genes de *ansJKLM/chcAB* o *plmJKLR4/chcAB* de la tabla 5 no produzca *cyFA*, pueden aislarse homólogos de *fabH*, *ACP* y/o *fabF* de microorganismos que producen *cyFA* (por ejemplo usando cebadores de PCR degenerados o sondas de ADN heterólogo) y coexpresarse. La tabla 6 enumera microorganismos seleccionados que contienen ácidos grasos cíclicos ω .

Tabla 6

Ejemplos de microorganismos que contienen ácidos grasos cíclicos ω

Organismo	Referencia
<i>Curtobacterium pusillum</i>	ATCC19096
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	ATCC49025
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	ATCC27009
<i>Alicyclobacillus cycloheptanicum</i> *	Moore, J. Org. Chem. 62: págs. 2173, 1997.

20 *Usa cicloheptilcarbonil-CoA y no ciclohexilcarbonil-CoA como precursor para la biosíntesis de FA cíclicos

C. Características de ésteres

25 Un experto habitual en la técnica apreciará que un éster incluye un lado A y un lado B. Tal como se describe en el presente documento, al lado B contribuye un ácido graso producido a partir de la síntesis *de novo* en el organismo huésped. En algunos casos en los que el huésped se modifica por ingeniería genética adicionalmente para producir alcoholes, incluyendo alcoholes grasos, el lado A se produce también por el organismo huésped. En aún otros ejemplos el lado A puede proporcionarse en el medio. Tal como se describe en el presente documento, seleccionando los genes de tioesterasa deseados puede diseñarse el lado B, y cuando están produciéndose

alcoholes grasos el lado A, para que tengan determinadas características de la cadena de carbono. Estas características incluyen puntos de insaturación, ramificación y longitudes de la cadena de carbono deseadas. Se describen en el ejemplo 6, a continuación, métodos a modo de ejemplo de preparación de ésteres de ácidos grasos de cadena larga, en los que el lado A y B se producen mediante el huésped de producción. De manera similar, el ejemplo 5 describe métodos de preparación de ésteres de ácidos grasos de cadena media. Cuando el huésped de producción contribuye al lado tanto A como B y se producen usando productos intermedios de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos, tendrán características de la cadena de carbono similares. Por ejemplo, al menos el 50%, el 60%, el 70% o el 80% de los ésteres de ácidos grasos producidos tendrán lados A y lados B que varían en 6, 4 ó 2 carbonos de longitud. El lado A y el lado B también presentarán niveles de saturación y ramificación similares.

Además de la producción de alcoholes grasos para la contribución al lado A, el huésped puede producir otros alcoholes de cadena corta tales como etanol, propanol, isopropanol, isobutanol y butanol para su incorporación en el lado A usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede producirse butanol por el organismo huésped. Para crear células productoras de butanol, puede modificarse por ingeniería genética la cepa LS9001 (descrita en el ejemplo 1, a continuación) para que exprese atoB (acetil-CoA acetiltransferasa) de *Escherichia coli* K12, β -hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa de *Butyrivibrio fibrisolvens*, crotonasa de *Clostridium beijerinckii*, butiril CoA deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii*, aldehído deshidrogenasa (ALDH) CoA-acilante de *Cladosporium fulvum* y adhE que codifica para una aldehído-alcohol deshidrogenasa de *Clostridium acetobutylicum* en el vector de expresión pBAD24 bajo el sistema de promotor de *prpBCDE*. De manera similar, puede producirse etanol en un huésped de producción usando los métodos enseñados por Kalscheuer *et al.*, *Microbiology* 152:2529-2536, 2006.

IV. Fermentación

La producción y el aislamiento de derivados de ácidos grasos puede potenciarse empleando técnicas de fermentación específicas. Un método para maximizar la producción al mismo tiempo que se reducen los costes es aumentar el porcentaje de la fuente de carbono que se convierte en productos de hidrocarburos. Durante los ciclos de vida celulares normales se usa carbono en funciones celulares incluyendo la producción de lípidos, sacáridos, proteínas, ácidos orgánicos y ácidos nucleicos. La reducción de la cantidad de carbono necesaria para actividades relacionadas con el crecimiento puede aumentar la eficacia de la conversión de la fuente de carbono en producción. Esto puede lograrse haciendo crecer en primer lugar microorganismos a una densidad deseada, tal como una densidad lograda en el pico de la fase logarítmica de crecimiento. En tal punto, pueden aprovecharse genes de punto de control de la replicación para detener el crecimiento de las células. Específicamente, pueden usarse mecanismos de detección quórum (revisado en Camilli y Bassler *Science* 311:1113,2006; Venturi *FFMS Microbio Rev* 30:274-291, 2006; y Reading y Sperandio *FEMS Microbiol Lett* 254:1-11, 2006) para activar genes tales como p53, p21 u otros genes de punto de control. Los genes que pueden activarse para detener la replicación y el crecimiento celulares en *E. coli* incluyen genes de umuDC, cuya sobreexpresión detiene la progresión desde la fase estacionaria hasta el crecimiento exponencial (Murli *et al.*, *J. de Bact.* 182:1127, 2000). UmuC es una ADN polimerasa que puede llevar a cabo síntesis translesión a lo largo de lesiones no codificantes, la base mecánica de la mayor parte de la mutagénesis química y por UV. Los productos génicos de *umuDC* se usan para el procedimiento de síntesis translesión y también sirven como punto de control del daño en el ADN. Los productos génicos de UmuDC incluyen UmuC, UmuD, umuD', UmuD'₂C, UmuD'₂ y UmuD₂. Simultáneamente, los genes que producen producto se activarían, minimizando así la necesidad de usar rutas de mantenimiento y replicación mientras que está preparándose el derivado de ácido graso.

El porcentaje de carbonos de entrada convertidos en productos de hidrocarburos es un inductor de costes. Cuanto más eficaz (es decir, cuanto mayor sea el porcentaje), menos caro es el procedimiento. Para fuentes de carbono que contienen oxígeno (es decir, glucosa y otras fuentes a base de hidratos de carbono), el oxígeno debe liberarse en forma de dióxido de carbono. Por cada 2 átomos de oxígeno liberados, se libera también un átomo de carbono lo que conduce a una eficacia metabólica teórica máxima de ~34% (p/p) (para productos derivados de ácidos grasos). Sin embargo, esta cifra cambia para otros productos de hidratos de carbono y fuentes de carbono. Las eficacias típicas en la bibliografía son de ~<5%. Microorganismos modificados por ingeniería genética que producen productos de hidrocarburos pueden tener más del 1, el 3, el 5, el 10, el 15, el 20, el 25 y el 30% de eficacia. En un ejemplo los microorganismos presentarán una eficacia de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 25%. En otros ejemplos, tales microorganismos presentarán una eficacia de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 30%, y en otros ejemplos tales microorganismos presentarán >30% de eficacia.

En algunos ejemplos en los que el producto final se libera de la célula, puede emplearse un procedimiento continuo. En este enfoque, puede ensamblarse un reactor con organismos que producen derivados de ácidos grasos de múltiples modos. En un ejemplo, se retira una parte de los medios y se deja que se asiente. Los derivados de ácidos grasos se separan de la fase acuosa, que a su vez se devolverá a la cámara de fermentación.

En un ejemplo, la cámara de fermentación encerrará una fermentación que está sometiendo a reducción continua. En este caso, se crearía un entorno reductor estable. El equilibrio de electrones se mantendría por la liberación de dióxido de carbono (en forma gaseosa). Esfuerzos por aumentar el equilibrio de NAD/H y NADP/H también pueden facilitar la estabilización del equilibrio de electrones.

La disponibilidad de NADPH intracelular también puede potenciarse mediante la modificación por ingeniería genética

del huésped de producción para que exprese una NADH:NADPH transhidrogenasa. La expresión de una o más NADH:NADPH transhidrogenasas convierte el NADH producido en la glicólisis en NADPH lo que potencia la producción de derivados de ácidos grasos.

5 Se da a conocer en el presente documento un sistema para producir y exportar de manera continua derivados de ácidos grasos fuera de microorganismos huésped recombinantes por medio de una proteína de transporte. Muchas proteínas de flujo de salida y transporte sirven para excretar una gran variedad de compuestos y pueden estar evolucionadas para ser selectivas para un tipo particular de derivados de ácidos grasos. Por tanto, en algunas realizaciones una secuencia de ADN exógeno que codifica para un transportador ABC se expresará funcionalmente por el microorganismo huésped recombinante, de modo que el microorganismo exporta el derivado de ácido graso al medio de cultivo. En un ejemplo, el transportador ABC es un transportador ABC de *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Alkaligenes eutrophus* o *Rhodococcus erythropolis* (locus AAN73268). En otro ejemplo, el transportador ABC es un transportador ABC elegido de CER5 (locus At1g51500 o AY734542), AtMRP5, AmiS2 y AtPGP1. En algunos ejemplos, el transportador ABC es CER5. En aún otro ejemplo, el gen de CER5 es de *Arabidopsis* (locus At1g51500, AY734542, At3g21090 y At1g51460).

15 La proteína de transporte, por ejemplo, también puede ser una proteína de flujo de salida seleccionada de: AcrAB, TolC y AcrEF de *E. coli*, o tll1618, tll1619 y tll0139 de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1.

Además, la proteína de transporte puede ser, por ejemplo, una proteína de transporte de ácidos grasos (FATP) seleccionada de *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Mycobacterium tuberculosis* o *Saccharomyces cerevisiae* o una cualquiera de las FATP de mamíferos. Las FATP pueden resintetizarse adicionalmente con las regiones de membrana revertidas con el fin de invertir la dirección de flujo de sustrato. Específicamente, las secuencias de aminoácidos que componen los dominios hidrófilos (o dominios de membrana) de la proteína podrían estar invertidas al mismo tiempo que se mantienen los mismos codones para cada aminoácido particular. La identificación de estas regiones se conoce bien en la técnica.

También pueden elegirse huéspedes de producción por su capacidad endógena para liberar derivados de ácidos grasos. La eficacia de producción de productos y liberación al caldo de fermentación puede expresarse como una razón de producto intracelular con respecto a producto extracelular. En algunos ejemplos la razón puede ser de 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 ó 1:5.

El huésped de producción puede modificarse por ingeniería genética adicionalmente para expresar celulosomas recombinantes, tales como los descritos en la solicitud PCT número PCT/US2007/003736, que permitirán que el huésped de producción use material celulósico como fuente de carbono. Por ejemplo, el huésped de producción puede modificarse por ingeniería genética adicionalmente para expresar invertasas (EC 3.2.1.26) de modo que pueda usarse sacarosa como fuente de carbono.

De manera similar, el huésped de producción puede modificarse por ingeniería genética usando las enseñanzas descritas en las patentes estadounidenses números 5.000.000, 5.028.539, 5.424.202, 5.482.846 y 5.602.030 concedidas a Ingram *et al.* de modo que el huésped de producción pueda asimilar carbono eficazmente y usar materiales celulósicos como fuentes de carbono.

IV. Procesamiento tras la producción

Los derivados de ácidos grasos producidos durante la fermentación pueden separarse de los medios de fermentación. Puede usarse cualquier técnica conocida para separar derivados de ácidos grasos de medios acuosos. Un procedimiento de separación a modo de ejemplo descrito en el presente documento es un procedimiento de separación de dos fases (bifásico). Este procedimiento implica fermentar los huéspedes de producción modificados por ingeniería genética en condiciones suficientes para producir un derivado de ácido graso, permitir que el derivado se recoja en una fase orgánica y separar la fase orgánica del caldo de fermentación acuoso. Este método puede ponerse en práctica en un entorno de fermentación tanto discontinua como continua.

La separación bifásica usa la relativa inmiscibilidad de los derivados de ácidos grasos para facilitar la separación. Inmiscible se refiere a la relativa incapacidad de un compuesto para disolverse en agua y se define por el coeficiente de reparto de los compuestos. El coeficiente de reparto, P, se define como la concentración en equilibrio de compuesto en una fase orgánica (en un sistema bifásico la fase orgánica es habitualmente la fase formada por el derivado de ácido graso durante el procedimiento de producción, sin embargo, en algunos ejemplos puede proporcionarse una fase orgánica (tal como una fase de octano para facilitar la separación del producto) dividida entre la concentración en equilibrio en una fase acuosa (es decir, caldo de fermentación). Cuando se describe un sistema de dos fases, el P se comenta habitualmente en cuanto a logP. Un compuesto con un logP de 10 tendría un reparto de 10:1 en la fase orgánica, mientras que un compuesto de logP de 0,1 tendría un reparto de 10:1 en la fase acuosa. Un experto habitual en la técnica apreciará que eligiendo un caldo de fermentación y la fase orgánica de manera que el derivado de ácido graso que está produciéndose tenga un valor de logP alto, el derivado de ácido graso se separará en la fase orgánica, incluso a concentraciones muy bajas en el recipiente de fermentación.

Los derivados de ácidos grasos producidos mediante los métodos descritos en el presente documento serán relativamente inmiscibles en el caldo de fermentación, así como en el citoplasma. Por tanto, el derivado de ácido

graso se recogerá en una fase orgánica o bien intracelular o bien extracelularmente. La recogida de los productos en una fase orgánica reducirá el impacto del derivado de ácido graso sobre la función celular y permitirá que el huésped de producción produzca más producto. Dicho de otro modo, la concentración del derivado de ácido graso no tendrá un impacto significativo sobre la célula huésped.

5 Los alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, ceras e hidrocarburos producidos tal como se describió en el presente documento permiten la producción de compuestos homogéneos en los que al menos el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 95% de los alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos y ceras producidos tendrán longitudes de la cadena de carbono que varían en menos de 4 carbonos, o menos de 2 carbonos. Estos compuestos pueden producirse también de modo que tengan un grado de saturación relativamente uniforme, por ejemplo al menos el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 95% de los alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, hidrocarburos y ceras serán mono, di o triinsaturados. Estos compuestos pueden usarse directamente como combustibles, aditivos para el cuidado personal, complementos nutricionales. Estos compuestos también pueden usarse como materia prima para reacciones posteriores, por ejemplo, transesterificación, hidrogenación, craqueo catalítico por medio de o bien hidrogenación, pirólisis o ambos o bien reacciones de epoxidación para preparar otros productos.

15 V. Composiciones de combustible

Los derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento pueden usarse como combustible. Un experto habitual en la técnica apreciará que dependiendo del fin previsto del combustible pueden producirse y usarse diferentes derivados de ácidos grasos. Por ejemplo, para combustible de automóviles que se prevé que se use en climas fríos puede ser deseable un derivado de ácido graso ramificado y usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, pueden prepararse hidrocarburos, ésteres de ácidos grasos y alcoholes ramificados. Usando los métodos descritos en el presente documento pueden producirse combustibles que comprenden derivados de ácidos grasos relativamente homogéneos que tienen calidades de combustible deseadas. Tales combustibles pueden caracterizarse por la huella de carbono, su falta de impurezas en comparación con combustibles derivados del petróleo o biodiésel derivado de triglicéridos y, además, los combustibles a base de derivados de ácidos grasos pueden combinarse con otros combustibles o aditivos de combustibles para producir combustibles que tienen propiedades deseadas.

A. Huella de carbono

Los derivados de ácidos grasos producidos de manera biológica representan una nueva materia prima para combustibles, tales como alcoholes, diésel y gasolina. Algunos biocombustibles preparados usando derivados de ácidos grasos no se han producido a partir de fuentes renovables y, como tales, son nuevas composiciones de materia. Estos nuevos combustibles pueden distinguirse de combustibles derivados de carbono petroquímico basándose en la huella isotópica del carbono doble. Adicionalmente, la fuente específica de carbono de origen biológico (por ejemplo glucosa frente a glicerol) puede determinarse mediante la determinación de la huella isotópica del carbono doble (véase la patente estadounidense número 7.169.588).

35 Este método distingue de manera útil materiales químicamente idénticos, y distribuye el carbono en los productos por la fuente (y posiblemente el año) de crecimiento del componente biosférico (vegetal). Los isótopos, ^{14}C y ^{13}C , aportan información complementaria a este problema. El isótopo de datación de radiocarbono (^{14}C), con su semivida nuclear de 5730 años, permite claramente distribuir un carbono de muestra entre materias primas fósiles ("muertas") y biosféricas ("vivas") [Currie, L. A. "Source Apportionment of Atmospheric Particles", Characterization of Environmental Particles, J. Buffle y H. P. van Leeuwen, Eds., 1 de vol. I de la IUPAC Environmental Analytical Chemistry Series (Lewis Publishers, Inc) (1992) 3 74]. La suposición básica en la datación de radiocarbono es que la constancia de la concentración de ^{14}C en la atmósfera conduce a la constancia de ^{14}C en los organismos vivos. Cuando se trata con una muestra aislada, la edad de una muestra puede deducirse aproximadamente mediante la relación $t = (-5730/0,693) \ln(A/A_{\text{sub.O}})$ (ecuación 5) donde t =edad, 5730 años es la semivida del radiocarbono, y A y $A_{\text{sub.O}}$ son la actividad de ^{14}C específica de la muestra y del patrón moderno, respectivamente [Hsieh, Y., Soil Sci. Soc. Am J., 56, 460, (1992)]. Sin embargo, debido a las pruebas nucleares atmosféricas desde 1950 y la quema de combustible fósil desde 1850, el ^{14}C ha adquirido una segunda característica temporal geoquímica. Su concentración en CO_2 atmosférico, y por tanto en la biosfera viva, se duplicó aproximadamente en el pico de las pruebas nucleares, a mediados de la década de 1960. Desde entonces ha retornado gradualmente a la tasa de isótopos inicial cosmogénica en estado estacionario (atmosférica) ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$) de aprox. $1,2 \times 10^{12}$, con una "semivida" de relajación aproximada de 7-10 años (esta última semivida no debe tomarse literalmente; más bien, debe usarse la función de desintegración/entrada nuclear atmosférica detallada para trazar la variación del ^{14}C atmosférico y biosférico desde el inicio de la era nuclear). Es esta última característica temporal del ^{14}C biosférico la que ofrece la promesa de la datación anual del carbono biosférico reciente. Puede medirse el ^{14}C mediante espectrometría de masas con acelerador (EMA), con resultados facilitados en unidades de "fracción de carbono moderno" (f_M). f_M se define por los Standard Reference Materials (SRMs) 4990B y 4990C del National Institute of Standards and Technology (NIST), conocidos como patrones de ácidos oxálicos HOxI y HOxII, respectivamente. La definición fundamental se refiere a 0,95 veces la razón de isótopos de $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ de HOxI (denominada AD 1950). Esto es aproximadamente equivalente a la madera de antes de la revolución industrial corregida para la desintegración. Para la biosfera viva actual (material vegetal), f_M es de aprox. 1,1.

La razón de isótopos de carbono estables ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) proporciona una vía complementaria para obtener la discriminación y distribución. La razón de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en un material de origen biológico dado es una consecuencia de la razón de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en el dióxido de carbono atmosférico en el momento en el que se fija el dióxido de carbono y también refleja la ruta metabólica precisa. También se producen variaciones regionales. El petróleo, las plantas C3 (las plantas de hoja ancha), las plantas C.sub.4 (los pastos) y los carbonatos marinos muestran todas las diferencias significativas en $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y los correspondientes valores de delta ^{13}C . Además, la materia lipídica de plantas C3 y C4 se analiza de manera diferente que materiales derivados de los componentes de hidratos de carbono de las mismas plantas como consecuencia de la ruta metabólica. Dentro de la precisión de la medición, ^{13}C muestra variaciones grandes debido a efectos de fraccionamiento isotópico, el más significativo de los cuales para la presente invención es el mecanismo fotosintético. La principal causa de diferencias en la razón de isótopos de carbono en las plantas está estrechamente asociada con diferencias en la ruta del metabolismo de carbono fotosintético en las plantas, particularmente la reacción que se produce durante la carboxilación primaria, es decir, la fijación inicial de CO_2 atmosférico. Dos grandes clases de vegetación son las que incorporan el ciclo fotosintético "C3" (o de Calvin-Benson) y las que incorporan el ciclo fotosintético "C4" (o de Hatch-Slack). Las plantas C3, tales como maderas duras y coníferas, son dominantes en las zonas de clima templado. En las plantas C3, la fijación de CO_2 primaria o reacción de carboxilación implica la enzima ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa y el primer producto estable es un compuesto de 3 carbonos. Las plantas C4, por otro lado, incluyen plantas tales como pastos tropicales, maíz y caña de azúcar. En las plantas C4, una reacción de carboxilación adicional que implica otra enzima, fosfoenol-piruvato carboxilasa, es la reacción de carboxilación primaria. El primer compuesto de carbono estable es un ácido de 4 carbonos que posteriormente se descarboxila. El CO_2 así liberado vuelve a fijarse mediante el ciclo C3.

Las plantas tanto C4 como C3 presentan un intervalo de razones isotópicas $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, pero los valores típicos son de aprox. -10 a -14 por mil (C4) y de -21 a -26 por mil (C3) [Weber *et al.*, J. Agric. Food Chem., 45, 2942 (1997)]. El carbón y el petróleo se encuentran generalmente en este último intervalo. La escala de medición de ^{13}C se definió originalmente por un ajuste a cero mediante la piedra caliza belemnita pee dee (PDB), en la que los valores se facilitan en partes por mil desviaciones con respecto a este material. Los valores de " $\Delta^{13}\text{C}$ " están en partes por mil (por mil), abreviado ‰, y se calculan tal como sigue:

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{muestra}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{patrón}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{patrón}}} \times 100\% \quad (\text{Ecuación 6})$$

Puesto que el material de referencia (MR) PDB se ha agotado, se han desarrollado una serie de MR alternativos en cooperación con IAEA, USGS, MIST y otros laboratorios de isótopos internacionales seleccionados. La notación para las desviaciones por mil con respecto a PDB es $\Delta^{13}\text{C}$. Las mediciones se realizan en CO_2 mediante espectrometría de masas de razón estable de alta precisión (IRMS) sobre iones moleculares de masas 44, 45 y 46.

Los derivados de ácidos grasos y los biocombustibles, productos químicos y mezclas asociados pueden distinguirse completamente de sus homólogos derivados de productos petroquímicos basándose en ^{14}C (fM) y determinación de la huella isotópica del carbono, indicando nuevas composiciones de materia.

Los derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento tienen utilidad en la producción de biocombustibles y productos químicos. Las nuevas composiciones de productos a base de derivados de ácidos grasos adicionalmente pueden distinguirse basándose en la determinación de la huella isotópica del carbono de los materiales derivados únicamente de fuentes petroquímicas. La capacidad para distinguir estos productos es beneficiosa en el rastreo de estos materiales en el comercio. Por ejemplo, pueden distinguirse combustibles o productos químicos que comprenden perfiles de isótopos de carbono tanto "nuevos" como "antiguos" de combustibles y productos químicos preparados sólo a partir de materiales "antiguos". Por tanto, los presentes materiales pueden seguirse en el comercio basándose en su perfil único y para los fines de definir la competición, y para determinar la vida útil de almacenamiento.

En algunos ejemplos se prepara una composición de biocombustible que incluye un derivado de ácido graso que tiene $\delta^{13}\text{C}$ de desde aproximadamente -10,9 hasta aproximadamente -15,4, en el que el derivado de ácido graso representa al menos aproximadamente el 85% del material de origen biológico (derivado de un recurso renovable tal como materiales celulósicos y azúcares) en la composición. En otros ejemplos, la composición de biocombustible incluye un derivado de ácido graso que tiene la fórmula



en la que X representa CH_3 , $-\text{CH}_2\text{OR}^1$; $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^2$; o $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^3\text{R}^4$;

R está, para cada n, independientemente ausente, es H o compuesto alifático inferior;

n es un número entero de desde 8 hasta 34, tal como desde 10 hasta 24; y

R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se seleccionan independientemente de H y alquilo inferior. Normalmente, cuando R es compuesto alifático inferior, R representa un resto alquenilo inferior o alquilo inferior ramificado, no ramificado o cíclico. Los

grupos R a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, ciclopentenilo y similares. El derivado de ácido graso se caracteriza adicionalmente por tener un $\delta^{13}\text{C}$ de desde aproximadamente 10,9 hasta aproximadamente -15,4; y el derivado de ácido graso representa al menos aproximadamente el 85% del material de origen biológico en la composición. En algunos ejemplos el derivado de ácido graso en la composición de biocombustible se caracteriza por tener una fracción de carbono moderno ($f_M^{14}\text{C}$) de al menos aproximadamente 1,003, 1,010 ó 1,5.

B. Derivados de ácidos grasos

El índice de cetano (CN), la viscosidad, el punto de fusión y el calor de combustión para diversos ésteres de ácidos grasos se han caracterizado en, por ejemplo, Knothe, Fuel Processing Technology 86:1059-1070, 2005. Usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento puede modificarse por ingeniería genética un huésped de producción para producir uno cualquiera de los ésteres de ácidos grasos descritos en Knothe, Fuel Processing Technology 86:1059-1070, 2005.

Pueden producirse alcoholes (de cadena corta, de cadena larga, ramificados o insaturados) por los huéspedes de producción descritos en el presente documento. Tales alcoholes pueden usarse como combustibles directamente o pueden usarse para crear un éster, es decir el lado A de un éster tal como se describió anteriormente. Tal éster solo o en combinación con los otros derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento son útiles como combustibles.

De manera similar, los hidrocarburos producidos a partir de los microorganismos descritos en el presente documento pueden usarse como biocombustibles. Tales combustibles a base de hidrocarburos pueden diseñarse para contener puntos de ramificación, grados de saturación definidos y longitudes de carbono específicas. Cuando se usan como biocombustibles solos o en combinación con otros derivados de ácidos grasos, los hidrocarburos pueden combinarse adicionalmente con aditivos u otros combustibles tradicionales (alcoholes, diésel derivado de triglicéridos y combustibles a base de petróleo).

C. Impurezas

Los derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento son útiles para preparar biocombustibles. Estos derivados de ácidos grasos se preparan directamente a partir de ácidos grasos y no a partir del procesamiento químico de triglicéridos. Por consiguiente, los combustibles que comprenden los derivados de ácidos grasos dados a conocer contendrán menos de las impurezas que normalmente están asociadas con biocombustibles derivados de triglicéridos, tales como combustibles derivados de grasas y aceites vegetales.

Los biocombustibles de derivados de ácidos grasos en bruto descritos en el presente documento (antes del mezclado del derivado de ácido graso con otros combustibles tales como combustibles tradicionales) contendrán menos catalizador de transesterificación que diésel petroquímico o biodiésel. Por ejemplo, el derivado de ácido graso puede contener menos de aproximadamente el 2%, el 1,5%, el 1,0%, el 0,5%, el 0,3%, el 0,1%, el 0,05% o el 0% de un catalizador de transesterificación o una impureza que resulta de un catalizador de transesterificación. Los catalizadores de transesterificación incluyen por ejemplo catalizadores de hidróxido tales como NaOH, KOH, LiOH y catalizadores ácidos, tales como catalizadores de ácido mineral y catalizadores de ácido de Lewis. Los catalizadores y las impurezas que resultan de los catalizadores de transesterificación incluyen, sin limitación, estaño, plomo, mercurio, cadmio, zinc, titanio, zirconio, hafnio, boro, aluminio, fósforo, arsénico, antimonio, bismuto, calcio, magnesio, estroncio, uranio, potasio, sodio, litio, y combinaciones de los mismos.

De manera similar, los biocombustibles de derivados de ácidos grasos en bruto descritos en el presente documento (antes del mezclado del derivado de ácido graso con otros combustibles tales como diésel petroquímico o biodiésel) contendrán menos glicerol (o glicerina) que biocombustibles preparados a partir de triglicéridos. Por ejemplo, el derivado de ácido graso puede contener menos de aproximadamente el 2%, el 1,5%, el 1,0%, el 0,5%, el 0,3%, el 0,1%, el 0,05% o el 0% de glicerol.

El biocombustible en bruto derivado de derivados de ácidos grasos contendrá también menos alcohol libre (es decir, alcohol que se usa para crear el éster) que biodiésel preparado a partir de triglicéridos. Esto se debe en parte a la eficacia de utilización del alcohol por el huésped de producción. Por ejemplo, el derivado de ácido graso contendrá menos de aproximadamente el 2%, el 1,5%, el 1,0%, el 0,5%, el 0,3%, el 0,1%, el 0,05% o el 0% de alcohol libre.

El biocombustible derivado de los derivados de ácidos grasos dados a conocer puede caracterizarse adicionalmente por su baja concentración de azufre en comparación con diésel derivado de petróleo. Por ejemplo, el biocombustible derivado de derivados de ácidos grasos puede tener menos de aproximadamente el 2%, el 1,5%, el 1,0%, el 0,5%, el 0,3%, el 0,1%, el 0,05% o el 0% de azufre.

D. Aditivos

Se usan aditivos de combustible para potenciar el rendimiento de un combustible o motor. Por ejemplo, pueden usarse aditivos de combustible para alterar el punto de congelación/gelificación, el punto de turbidez, la lubricidad, la viscosidad, la estabilidad oxidativa, la calidad de ignición, el nivel de octano y el punto de inflamación. En los

Estados Unidos, todos los aditivos de combustible deben estar registrados en la Agencia de Protección Medioambiental y las compañías que venden el aditivo de combustible y el nombre del aditivo de combustible están disponibles públicamente en el sitio web de la agencia y también mediante contacto con la agencia. Un experto habitual en la técnica apreciará que los derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento pueden mezclarse con uno o más de tales aditivos para conferir una calidad deseada.

Un experto habitual en la técnica también apreciará que los derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento pueden mezclarse con otros combustibles tales como biodiésel derivado de triglicéridos, diversos alcoholes tales como etanol y butanol, y productos derivados del petróleo tales como gasolina. En algunos ejemplos, se produce un derivado de ácido graso, tal como éster etílico C16:1 o éster etílico C18:1, que tiene un bajo punto de gelificación. Este derivado de ácido graso con bajo punto de gelificación se mezcla con biodiésel preparado a partir de triglicéridos para reducir el punto de gelificación global del combustible. De manera similar, puede mezclarse un derivado de ácido graso tal como éster etílico C16:1 o éster etílico C18:1 con diésel derivado del petróleo para proporcionar una mezcla que tiene al menos y a menudo más del 5% de biodiésel. En algunos ejemplos, la mezcla incluye al menos el 20% o más del derivado de ácido graso.

Por ejemplo, puede prepararse una composición de biocombustible que incluye al menos aproximadamente el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90% o el 95% de un derivado de ácido graso que incluye una cadena de carbono que es 8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 14:1, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:0, 20:1, 20:2, 20:3, 22:0, 22:1 ó 22:3. Tales composiciones de biocombustible pueden incluir adicionalmente al menos un aditivo seleccionado de un aditivo que disminuye el punto de turbidez que puede disminuir el punto de turbidez hasta menos de aproximadamente 5°C o 0°C, un tensioactivo, o una microemulsión, al menos aproximadamente el 5%, el 10%, el 15%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70% o el 80%, el 85%, el 90% o el 95% de combustible diésel de triglicéridos, gasolina derivada del petróleo o combustible diésel del petróleo.

Ejemplos

La figura 1 es un diagrama de la ruta de FAS que muestra las enzimas directamente implicadas en la síntesis de acil-ACP. Para aumentar la producción de ésteres de ácidos grasos/ceras y alcoholes grasos puede sobreexpresarse o mutarse una o más de las enzimas para reducir la inhibición por retroalimentación. Adicionalmente, pueden atenuarse o deleccionarse funcionalmente enzimas que metabolizan los productos intermedios para preparar productos no a base de ácidos grasos (reacciones secundarias) para aumentar el flujo de carbono a través de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. Los ejemplos 1, 2 y 8 a continuación proporcionan huéspedes de producción a modo de ejemplo que se han modificado para aumentar la producción de ácidos grasos.

Las figuras 2, 3 y 4 muestran rutas de biosíntesis que pueden modificarse por ingeniería genética para preparar alcoholes grasos y ésteres de ácidos grasos/ceras, respectivamente. Tal como se ilustra en la figura 2, la conversión de cada sustrato (acetil-CoA, malonil-CoA, acil-ACP, ácido graso y acil-CoA) en cada producto (acetil-CoA, malonil-CoA, acil-ACP, ácido graso y acil-CoA) puede lograrse usando varios polipéptidos diferentes que son miembros de las clases de enzimas indicadas. Los ejemplos a continuación describen microorganismos que se han modificado por ingeniería genética o pueden modificarse por ingeniería genética para producir alcoholes grasos y ésteres de ácidos grasos/ceras e hidrocarburos específicos.

Ejemplo 1, construcción del huésped de producción

Un huésped de producción a modo de ejemplo es LS9001. Se produjo LS9001 modificando C41 (DE3) de Overexpress.com (Saint Beausine, Francia) para deleccionar funcionalmente el gen *fadE* (acil-CoA deshidrogenasa).

En resumen, se preparó la cepa de *E. coli* con desactivación de *fadE* usando los cebadores YafV_NotI y Ivry_OI para amplificar aproximadamente 830 pb en el sentido de 5' de *fadE* y los cebadores Lpcaf_ol y LpcaR_Bam para amplificar aproximadamente 960 pb en el sentido de 3' de *fadE*. Se usó PCR de solapamiento para crear un constructo para la delección en marco del gen *fadE* completo. Se clonó el constructo de delección de *fadE* en el plásmido sensible a la temperatura pKOV3, que contenía un gen *SacB* para la contraselección, y se realizó una delección cromosómica de *fadE* según el método de Link *et al.*, J. Bact. 179:6228-6237, 1997. La cepa resultante no podía degradar ácidos grasos y acil graso-CoA (esta delección funcional se designa en el presente documento como $\Delta fadE$).

Las modificaciones adicionales que pueden incluirse en un huésped de producción incluyen introducir un plásmido que porta los cuatro genes que son responsables de la actividad acetil-CoA carboxilasa en *E. coli* (*accA*, B, C y D, registros: NP_414727, NP_417721, NP_417722, NP_416819, EC 6.4.1.2). Se clonaron los genes accABCD en dos etapas como operones bicistrónicos en los sitios *NcoI/HindIII* y *NdeI/AvrII* de pACYCDuet-1 (Novagen, Madison, WI), el plásmido resultante se denominó pAS004.126.

Las modificaciones adicionales que pueden incluirse en un huésped de producción incluyen las siguientes: sobreexpresión de *aceEF* (que codifica para el componente de deshidrogenasa E1p y el componente de dihidrolipoamida aciltransferasa E2p de los complejos de piruvato y 2-oxoglutarato deshidrogenasa); y pueden expresarse en el huésped de producción *fabH/fabD/fabG/lacp/fabF* (que codifican para FAS) de cualquier organismo que se sepa en la técnica que codifica para tales proteínas, incluyendo por ejemplo *E. coli*, *Nitrosomonas*

5 *europaea* (ATCC 19718), *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces spp*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Corynebacteria*, *Brevibacteria*, *Mycobacteria*, levaduras oleaginosas, y similares. De manera similar, pueden modificarse por ingeniería genética huéspedes de producción para expresar *accABCD* (que codifica para acetil co-A carboxilasa) de *Pisum sativum* en lugar de, o además de, los homólogos de *E. coli*. Sin embargo, cuando el huésped de producción también está produciendo butanol es menos deseable expresar el homólogo de *Pisum sativum*.

10 En algunos huéspedes de producción a modo de ejemplo, pueden desactivarse o atenuarse genes usando el método de Link, *et al.*, J. Bacteriol. 179:6228-6237, 1997. Por ejemplo, los genes que pueden desactivarse o atenuarse incluyen *gpsA* (que codifica para sn-glicerol 3-fosfato deshidrogenasa biosintética, registro NP_418065, EC: 1.1.1.94); *ldhA* (que codifica para lactato deshidrogenasa, registro NP_415898, EC: 1.1.1.28); *pf1b* (que codifica para formiato acetiltransferasa 1, registros: P09373, EC: 2.3.1.54); *adhE* (que codifica para alcohol deshidrogenasa, registros: CAA47743, EC: 1.1.1.1, 1.2.1.10); *pta* (que codifica para fosfotransacetilasa; registros: NP_416800, EC: 2.3.1.8); *poxB* (que codifica para piruvato oxidasa, registros: NP_415392, EC: 1.2.2.2); *ackA* (que codifica para acetato cinasa, registros: NP_416799, EC: 2.7.2.1) y combinaciones de los mismos.

15 De manera similar, puede introducirse la mutación PlsB[D311E] en LS9001 para atenuar PlsB usando el método descrito anteriormente para la delección de *fadE*. Una vez introducida, esta mutación disminuirá la cantidad de carbono que se desvía a la producción de fosfolípidos (véase la figura 1). En resumen, se prepara un alelo que codifica para PlsB[D311E] reemplazando el codón GAC para aspartato 311 por un codón GAA para glutamato. Se prepara el alelo alterado mediante síntesis génica y se intercambia el alelo silvestre *plsB* cromosómico por el alelo *plsB*[D311E] mutante usando el método de Link *et al.* (véase anteriormente).

20 Ejemplo 2, modificaciones del huésped de producción

Se construyeron los siguientes plásmidos para la expresión de diversas proteínas que se usaron en la síntesis de derivados de ácidos grasos. Se prepararon los constructos usando métodos de biología molecular convencionales y se pusieron todos los genes clonados bajo el control de promotores inducibles por IPTG (T7, promotores tac o lac).

25 Se clonó el gen *tesA* (gen de tioesterasa A, registro NP_415027 sin secuencia líder (Cho y Cronan, The J. of Biol. Chem., 270:4216-9, 1995, EC: 3.1.1.5, 3.1.2.-) de *E. coli* en pETDuet-1 digerido con *NdeI/AvrII* (pETDuet-1 descrito en el presente documento está disponible de Novagen, Madison, WI). Se clonaron individualmente genes que codifican para tioesterasas (TE) vegetales de tipo FatB de *Umbellularia California*, *Cuphea hookeriana* y *Cinnamomum camphorum* (registros: UcFatB1=AAA34215, ChFatB2=AAC49269, ChFatB3=AAC72881, CcFatB=AAC49151 en tres vectores diferentes: (i) pETDuet-1 digerido con *NdeI/AvrII*, (ii) pBluescript KS+ digerido con *XhoI/HindIII* (Stratagene, La Jolla, CA) (usado para crear proteínas de fusión lacZ::TE N-terminales) y (iii) pMAL-c2X digerido con *XbaI/HindIII* (New England Lab, Ipswich, MA) (usado para crear fusiones MalE::TE N-terminales). Se clonó el gen *fadD* (que codifica para acil-CoA sintetasa) de *E. coli* en un derivado de pCDFDuet-1 digerido con *NcoI/HindIII* que contenía el gen *acr1* (acil-CoA reductasa) de *Acinetobacter baylyi* ADP1 dentro de sus sitios *NdeI/AvrII*. La tabla 7 proporciona un resumen de los plásmidos generados para preparar varias cepas de producción a modo de ejemplo, un experto habitual en la técnica apreciará que pueden usarse diferentes plásmidos y modificaciones genómicas para lograr cepas similares.

Tabla 7
Resumen de plásmidos usados en huéspedes de producción

Plásmido	Organismo fuente Producto génico	N.º de registro, número EC
pETDuet-1- <i>tesA</i>	<i>E. coli</i> TesA	Registros: NP_415027, EC: 3.1.1.5, 3.1.2.-
pETDuet-1-TEuc pBluescript-TEuc pMAL-c2X-TEuc	<i>Umbellularia California</i> UcFatB 1	Q41635 AAA34215
pETDuet-1-TEch pBluescript-TEch pMAL-c2X-TEch	<i>Cuphea hookeriana</i> ChFatB2 ChFatB3	ABB71581 AAC49269 AAC72881
pETDuet-1-TEcc pBluescript-TEcc TEci	<i>Cinnamomum camphorum</i> CcFatB	AAC49151
pCDFDuet-1- fadD-acr1	<i>E. coli</i>	<i>fadD</i> : Registros NP_416319, EC 6.2.1.3 <i>acr1</i> : Registros YP_047869

40 Los plásmidos de expresión elegidos contienen replicones compatibles y marcadores de resistencia a antibióticos, de modo que puede establecerse un sistema de expresión de cuatro plásmidos. Por tanto, puede cotransformarse LS9001 con (i) cualquiera de los plásmidos de expresión de TE, (ii) el plásmido de expresión de FadD, que también

expresaba *acr1* y (iii) plásmido de expresión de cera sintasa. Cuando se indujo con IPTG, la cepa resultante producirá concentraciones aumentadas de alcoholes grasos a partir de fuentes de carbono tales como glucosa. La longitud de la cadena de carbono y el grado de saturación del alcohol graso producido depende del gen de tioesterasa que se expresa.

5 Ejemplo 3, producción de alcohol graso en las cepas de *E. coli* recombinantes

Se produjeron alcoholes grasos expresando un gen de tioesterasa y un gen de acil-CoA reductasa (FAR) de manera exógena en un huésped de producción. Más específicamente, se transformaron los plásmidos pCDFDuet-1-fadD-*acr1* (acil-CoA reductasa) y pETDuet-1-*tesA* (tioesterasa) en la cepa de *E. coli* LS9001 (descrita en el ejemplo 1) y se seleccionaron los transformantes correspondientes en placa de LB complementado con 100 mg/l de espectinomicina y 50 mg/l de carbenicilina. Se inocularon independientemente cuatro transformantes de LS9001/pCDFDuet-1-fadD-*acr1* en 3 ml de medio M9 complementado con 50 mg/l de carbenicilina y 100 mg/l de espectinomicina. Se hicieron crecer las muestras que contenían los transformantes a 25°C en un agitador (250 rpm) hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,5. Se transfirieron 1,5 ml de cada muestra a un frasco de 250 ml que contenía 30 ml del medio descrito anteriormente. Se hizo crecer el cultivo resultante a 25°C en un agitador hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de entre 0,5 -1,0. Entonces se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y se continuó el crecimiento durante 40 horas.

Entonces se centrifugaron las células a 4000 rpm y se suspendieron los sedimentos celulares en 1,0 ml de metanol. Entonces se mezclaron 3 ml de acetato de etilo con las células suspendidas. Entonces se añadieron 3 ml de H₂O a la mezcla y se sonicó la mezcla durante 20 minutos. Se centrifugó la muestra resultante a 4000 rpm durante 5 minutos y se sometió la fase orgánica (la fase superior) que contenía alcohol graso a análisis de CG/EM. El rendimiento de alcohol total (incluyendo tetradecanol, hexadecanol, hexadecenol y octadecenol) era de aproximadamente 1-10 mg/l. Cuando se cultivó una cepa de *E. coli* que portaba sólo vectores vacíos del mismo modo, sólo se encontraron 0,2-0,5 mg/l de alcoholes grasos en el extracto de acetato de etilo.

Ejemplo 4, producción y liberación de alcohol graso a partir del huésped de producción

25 Se expresó *acr1* (acil-CoA reductasa) en *E. coli* hecha crecer sobre glucosa como la única fuente de carbono y energía. La *E. coli* produjo pequeñas cantidades de alcoholes grasos tales como dodecanol (C12:0-OH), tetradecanol (C14:0-OH) y hexadecanol (C16:0-OH). En otras muestras, se expresó *FadD* (acil-CoA sintetasa) junto con *acr1* en *E. coli* y se observó un aumento de cinco veces en la producción de alcohol graso.

30 En otras muestras, se expresaron *acr1*, *fadD*, *accABCD* (acetil-CoA carboxilasa) (plásmido que portaba *accABCD* construido tal como se describe en el ejemplo 1) junto con diversas tioesterasas individuales (TE) en *E. coli* C41(DE3) silvestre y una *E. coli* C41(DE3 Δ *fadE*), una cepa que carece de acil-CoA deshidrogenasa). Esto dio como resultado aumentos adicionales en la producción de alcohol graso y la modulación de los perfiles de alcoholes grasos (véase la figura 5). Por ejemplo, la sobreexpresión de *tesA* de *E. coli* (pETDuet-1-*tesA*) en este sistema logró un aumento de aproximadamente 60 veces en C12:0-OH, C14:0-OH y C16:0-OH siendo C14:0-OH el alcohol graso principal. Se obtuvo un resultado muy similar cuando se expresó la enzima ChFatB3 (FatB3 de *Cuphea hookeriana* en pMAL-c2X-TEcu). Cuando se expresó la enzima UcFatB1 (FatB1 de *Umbellularia californica* en pMAL-c2X-TEuc), la producción de alcohol graso aumentó aproximadamente 20 veces y C12:0-OH era el alcohol graso predominante.

40 La expresión de ChFatB3 y UcFatH1 también condujo a la producción de cantidades significativas de los alcoholes grasos insaturados C16:1-OH y C14:1-OH, respectivamente. También se encontró la presencia de alcoholes grasos en el sobrenadante de muestras generadas a partir de la expresión de *tesA* (figura 6). A 37°C, se encontraron cantidades aproximadamente iguales de alcoholes grasos en el sobrenadante y en el sedimento celular, mientras que a 25°C se encontraron aproximadamente el 25% de los alcoholes grasos en el sobrenadante.

Ejemplo 5, ésteres de ácidos grasos de cadena media

45 Pueden usarse alcohol acetil transferasas (AAT, EC 2.3.1.84), que son responsables de la producción de acetato de acilo en diversas plantas, para producir ceras de longitud de cadena media, tales como octanoato de octilo, octanoato de decilo, decanoato de decilo, y similares. Los ésteres grasos, sintetizados a partir de alcohol de cadena media (tal como C6, C8) y acil-CoA de cadena media (o ácidos grasos, tales como C6 o C8) tienen un punto de fusión bajo relativo. Por ejemplo, el hexanoato de hexilo tiene un punto de fusión de -55°C y el octanoato de octilo tiene un punto de fusión de -18 a -17°C. Los puntos de fusión bajos de estos compuestos los hace buenos candidatos para su uso como biocombustibles.

55 En este ejemplo, se coexpresó un gen de SAAT en un huésped de producción C41 (DE3, Δ *fadE*) con *fadD* de *E. coli* y *acr1* (alcohol reductasa de *A. baylyi* ADP1) y se proporcionó ácido octanoico en el caldo de fermentación. Esto dio como resultado la producción de octanoato de octilo. De manera similar, cuando se expresó el gen de cera sintasa de *A. baylyi* ADP 1 en el huésped de producción en lugar del gen de SAAT, se produjo octanoato de octilo.

Se sintetizó un gen de SAAT recombinante usando DNA 2.0 (Menlo Park, CA 94025). El ADN sintetizado se basaba en la secuencia génica publicada (número de registro AF193789) y se modificó para eliminar el sitio *NcoI*. Se clonó

el gen SAAT sintetizado (como un fragmento de BamHI-HindIII) en pRSET B (Invitrogen, Carlsbad, California), linealizado con BamHI y HindIII. El plásmido resultante, pHZ1.63A se cotransformó en un huésped de producción de *E. coli* con pAS004.114B, que porta un gen *fadD* de *E. coli* y un gen *acr1* de *A. baylyi* ADP1. Se hicieron crecer los transformantes en 3 ml de medio M9 con un 2% de glucosa. Tras la inducción con IPTG y la adición de un 0,02% de ácido octanoico, se continuó el cultivo a 25°C a partir de 40 horas. Después de eso, se añadieron 3 ml de acetato de acetilo al cultivo completo y se mezcló varias veces con una mezcladora. Se analizó la fase de acetato de acetilo mediante CG/EM.

Sorprendentemente, en el extracto de acetato de acetilo, no se encontró acetato de acilo. Sin embargo, se encontró un nuevo compuesto y el compuesto era octanoato de octilo. Mientras que la cepa control sin el gen de SAAT [C41 (DE3, Δ fadE)/pRSET B+pAS004.114B] no produjo octanoato de octilo. Además, la cepa [C41 (DE3, Δ fadE)/pHZ1.43 B+pAS004.114B], en la que se portaba el gen de cera sintasa de *A. baylyi* ADP1 por pHZ1.43, produjo octanoato de octilo (véase la figura 7B).

El hallazgo de que la actividad de SAAT produce octanoato de octilo no se ha notificado antes y hace posible producir ceras de cadena media tales como octanoato de octilo, decanoato de octilo, que tienen un punto de fusión bajo y son buenos candidatos para usarse como biocombustible para reemplazar el biodiésel a base de triglicéridos.

Ejemplo 6, producción de éster de cera en la cepa de *E. coli* LS9001

Se produjeron ésteres de ceras modificando por ingeniería genética un huésped de producción de *E. coli* para expresar una acil-CoA reductasa que forma alcohol graso, tioesterasa y una cera sintasa. Por tanto, el huésped de producción produjo el lado tanto A como B del éster y la estructura de ambos lados estaba influida por la expresión del gen de tioesterasa.

Más específicamente, se amplificó cera sintasa de *A. baylyi* ADP1 (denominada WSadp1, registros AA017391, EC: 2.3.175) con los siguientes cebadores usando ADN genómico de *A. baylyi* ADP1 como molde. Los cebadores fueron (1) WSadp1_Ndel, 5'-TCATATGCGCCATTACATCCG-3' y (2) WSadp1_Avr, 5'-TCCTAGGAGGGCTAATTTAGCCCTTTAGTT-3'. Se digirió el producto de PCR con Ndel y AvrI y se clonó en pCOALDeut-1 para dar pHZ 1.43. Entonces se cotransformó el plásmido que portaba WSadp1 en la cepa de *E. coli* LS9001 con tanto pETDuet-1^{tesA} como pCDFDuet-1-fadD-*acr1* y se seleccionaron transformantes en placas de LB complementado con 50 mg/l de kanamicina, 50 mg/l de carbenicilina y 100 mg/l de espectinomicina. Se inocularon tres transformantes en 3 ml de LBKCS (caldo LB complementado con 50 mg/l de kanamicina, 50 mg/l de carbenicilina, 100 mg/l de espectinomicina y 10 g/l de glucosa) y se cultivaron a 37°C en un agitador (250 rpm). Cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,5, se transfirieron 1,5 ml de cada cultivo a frascos de 250 ml que contenían 50 ml de LBKCS y se hicieron crecer los frascos en un agitador (250 rpm) a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,5-1,0. Entonces se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Se hicieron crecer los cultivos inducidos a 37°C en un agitador durante otras 40-48 horas.

Entonces se colocó el cultivo en tubos cónicos de 50 ml y se centrifugaron las células a 3500 X g durante 10 minutos. Entonces se mezcló el sedimento celular con 5 ml de acetato de etilo. Se analizó el extracto de acetato de etilo con CG/EM. El rendimiento intracelular de ceras (incluyendo C16:C16, C14:1C16, C18:1C18:1, C2C14, C2C16, C2C16:1, C16C16:1 y C2C18:1) era de aproximadamente 10 mg/l. Cuando se cultivó del mismo modo una cepa de *E. coli* que portaba solo vectores vacíos, sólo se encontraron 0,2 mg/l de cera en el extracto de acetato de etilo.

Ejemplo 7, producción y liberación de éster etílico graso a partir del huésped de producción

Se modificó la cepa LS9001 transformándola con los plásmidos que portaban un gen de cera sintasa de *A. baylyi* (plásmido pHZ1.43), un gen de tioesterasa de *Cuphea hookeriana* (plásmido pMAL-c2X-TEcu) y un gen *fadD* de *E. coli* (plásmido pCDFDuet-1-fadD). Se hizo crecer esta cepa recombinante a 25°C en 3 ml de medio M9 con 50 mg/l de kanamicina, 100 mg/l de carbenicilina y 100 mg/l de espectinomicina. Tras la inducción con IPTG, se ajustaron los medios a una concentración final de etanol al 1% y glucosa al 2%. Se permitió que el cultivo creciese durante 40 horas tras la inducción con IPTG. Se separaron las células del medio gastado mediante centrifugación a 3500 X g durante 10 minutos). Se resuspendió el sedimento celular con 3 ml de medio M9. Entonces se extrajeron la suspensión celular y el medio gastado con 1 volumen de acetato de etilo. Se sometieron las fases de acetato de etilo resultantes de la suspensión celular y el sobrenadante a análisis de CG-EM. Los resultados mostraron que el éster etílico C16 era la especie de éster más relevante (tal como se esperaba para esta tioesterasa, véase la tabla 1), y que el 20% del éster de ácido graso producido se liberaba de la célula (véase la figura 8). Una cepa de *E. coli* control C41(DE3, Δ fadE) que contenía pCOLADuet-1 (vector vacío para el gen de cera sintasa), pMAL-c2X-TEuc (que contenía *fatB* de *U. californiana*) y pCDFDuet-1-fadD (gen *fadD* de *E. coli*) no pudo producir cantidades detectables ésteres etílicos grasos. Se cuantificaron los ésteres de ácidos grasos usando éster etílico de ácido palmítico comercial como referencia. También se prepararon ésteres de ácidos grasos usando los métodos descritos en el presente documento excepto porque se añadió metanol o isopropanol al caldo de fermentación y se produjeron los ésteres de ácidos grasos esperados.

Ejemplo 8, la influencia de diversas tioesterasas sobre la composición de ésteres etílicos grasos producidos en cepas de *E. coli* recombinantes.

Se expresaron las tioesterasas FatB3 (*C. hookeriana*), TesA (*E. coli*) y FatB (*U. californica*) simultáneamente con cera sintasa (*A. baylyi*). Se construyó un plásmido denominado pHZ1.61 reemplazando el fragmento de *NotI-AvrII* (que portaba el gen *acr1*) por el fragmento de *NotI-AvrII* de pHZ1.43 de modo que *fadD* y la cera sintasa *ADP1* estaban en un plásmido y ambas secuencias codificantes estaban bajo el control de un promotor de T7 separado. La construcción de pHZ1.61 hizo posible usar un sistema de dos plásmidos en lugar del sistema de tres plásmidos tal como se describió en el ejemplo 6. Entonces se cotransformó pHZ1.61 en *E. coli* C41 (DE3, Δ *fadE*) con uno de los diversos plásmidos que portan los diferentes genes de tioesterasa establecidos anteriormente.

Se evaluaron los ésteres etílicos de ácidos grasos totales (ésteres etílicos de ácidos grasos intracelulares y del sobrenadante) producidos por estos transformantes usando la técnica descrita en el presente documento. Los rendimientos y la composición de ésteres etílicos de ácidos grasos se resumen en la tabla 8.

Tabla 8

Los rendimientos (mg/l) y la composición de ésteres etílicos de ácidos grasos por *E. coli* C41(DE3, Δ *fadE*)/pHZ1.61 recombinante y plásmidos que portan diversos genes de tioesterasa.

Tioesterasas	C2C10	C2C12:1	C2C12	C2C14:1	C2C14	C2C16:1	C2C16	C2C18:1	Total
'TesA	0,0	0,0	6,5	0,0	17,5	6,9	21,6	18,1	70,5
ChFatB3	0,0	0,0	0,0	0,0	10,8	12,5	11,7	13,8	48,8
ucFatB	6,4	8,5	25,3	14,7	0,0	4,5	3,7	6,7	69,8
pMAL	0,0	0,0	0,0	0,0	5,6	0,0	12,8	7,6	26,0

Nota: 'TesA, pETDuet-1-'*tesA*; chFatB3, pMAL-c2X-TEcu; ucFatB, pMAL-c2X-TEuc; pMAL, pMAL-c2X, el vector vacío para genes de tioesterasa usados en el estudio.

Ejemplo 9, construcción del huésped de producción

Los genes que controlan la producción de ácidos grasos están conservados entre microorganismos. Por ejemplo, la tabla 9 identifica los homólogos de muchos de los genes descritos en el presente documento que se sabe que se expresan en microorganismos que producen hidrocarburos. Para aumentar la producción de ácidos grasos y, por tanto, la producción de hidrocarburos en microorganismos tales como los identificados en la tabla 9, pueden expresarse genes heterólogos, tales como los de *E. coli*. Un experto habitual en la técnica también apreciará que también pueden sobreexpresarse o atenuarse genes que son endógenos para los microorganismos proporcionados en la tabla 9, usando los métodos descritos en el presente documento. Además, pueden expresarse o atenuarse genes que se describen en la figura 10 en microorganismos que producen de manera endógena hidrocarburos para permitir la producción de hidrocarburos específicos con longitud de cadena de carbono, puntos de saturación y puntos de ramificación definidos.

Por ejemplo, se introducen secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican para acetil-CoA carboxilasa en *K. radiotolerans*. Los siguientes genes comprenden el producto proteico de acetil-CoA carboxilasa en *K. radiotolerans*; acetil CoA carboxilasa, subunidad alfa (*accA/ZP_00618306*), acetil-CoA carboxilasa, proteína transportadora de biotina-carboxilo (*accB/ZP_00618387*), acetil-CoA carboxilasa, subunidad de biotina carboxilasa (*accC/ZP_00618040*) y acetil-CoA carboxilasa, subunidad beta (carboxiltransferasa) (*accD/ZP_00618306*). Se clonan estos genes en un plásmido de manera que constituyan un operón de acetil-CoA carboxilasa sintética (*accABCD*) bajo el control de un sistema de expresión de *K. radiotolerans* tal como el sistema de expresión dado a conocer en Ruyter *et al.*, Appl Environ Microbiol. 62:3662-3667, 1996. La transformación del plásmido en *K. radiotolerans* potenciará la producción de ácidos grasos. La cepa productora de hidrocarburos de *K. radiotolerans* también puede modificarse por ingeniería genética para preparar hidrocarburos ramificados, insaturados que tienen longitudes de cadena de carbono específicas usando los métodos dados a conocer en el presente documento.

Tabla 9

Huéspedes de producción de hidrocarburos

Organismo	Nombre del gen	N.º de registro/Seq ID/Loci	N.º EC
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	<i>accA</i>	YP_388034	6.4.1.2
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G22	<i>accC</i>	YP_388573/YP_388033	63.4.14, 6.4.1.2
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G23	<i>accD</i>	YP_388034	6.4.1.2
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G28	<i>fabH</i>	YP_388920	23.1.180
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G29	<i>fabD</i>	YP_388786	23.1.39
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G30	<i>fabG</i>	YP_388921	1.1.1.100 3.1.26.3,
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G31	<i>acpP</i>	YP_388922/YP_389150	1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G32	<i>fabF</i>	YP_388923	2.3.1.179
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G33	<i>gpsA</i>	YP_389667	1.1.1.94

<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G34	ldhA	YP_388173/YP_390177	1.1.127, 1.1.1.28
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	accA	942060-943016	6.4.1.2
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	accB	3440869-3441336	6.4.1.2
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	accC	3441351-3442697	6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	accD	2517571-2516696	6.4.1.2
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	fadE	1003232-1000791	1.3.99.-
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	plsB(D311E)	333843-331423	2.3.1.15
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	aceE	840558-843218	1.2.4.1
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	aceF	843248-844828	2.3.1.12
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	fabH	1579839-1580789	2.3.1.180
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	fabD	1580826-1581749	2.3.1.39
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	fabG	CAA74944	1.1.1.100
			3.1.26.3,
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	acpP	1582658-1582891	1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	fabF	1582983-1584221	2.3.1.179
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	gpsA	124800-125810	1.1.1.94
			1.1.1.27,
<i>Erwinia (micrococcus) amylovora</i>	ldhA	1956806-1957789	1.1.1.28
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	accA	ZP_00618306	6.4.1.2
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	accB	ZP_00618387	6.4.1.2
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	accC	ZP_00618040/ZP_00618387	6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	accD	ZP_00618306	6.4.1.2
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	fadE	ZP_00617773	1.3.99.-
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	plsB(D311E)	ZP_00617279	2.3.1.15
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	aceE	ZP_00617600	1.2.4.1
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	aceF	ZP_00619307	2.3.1.12
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	fabH	ZP_00618003	2.3.1.180
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	fabD	ZP_00617602	2.3.1.39
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	fabG	ZP_00615651	1.1.1.100
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	acpP	ZP_00617604	3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	fabF	ZP_00617605	2.3.1.179
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	gpsA	ZP_00618825	1.1.1.94
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SR530216	ldhA	ZP_00618879	1.1.1.27, 1.1.1.28
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	accA	YP_425310	6.4.1.2
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	accB	YP_427521	6.4.1.2
		YP_427522/YP_425144/YP_427028/YP_426209/	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	accC	YP_427404	6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	accD	YP_428511	6.4.1.2
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	fadE	YP_427035	1.3.99.-
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	aceE	YP_427492	1.2.4.1
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	aceF	YP_426966	2.3.1.12
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	fabH	YP_426754	2.3.1.180
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	fabD	YP_425507	2.3.1.39
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	fabG	YP_425508/YP_425365	1.1.1.100
			3.1.26.3,
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	acpP	YP_425509	1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	fabF	YP_425510/YP_425510 /YP_425285	2.3.1.179
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	gpsA	YP_428652	1.1.1.94
			1.1.1.27,
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	ldhA	YP_426902/YP_428871	1.1.1.28
<i>Vibrio furnissii</i>	accA	1, 16	6.4.1.2
<i>Vibrio furnissii</i>	accB	2, 17	6.4.1.2
<i>Vibrio furnissii</i>	accC	3, 18	6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Vibrio furnissii</i>	accD	4, 19	6.4.1.2
<i>Vibrio furnissii</i>	fadE	5, 20	1.3.99.-
<i>Vibrio furnissii</i>	plsB(D311E)	6, 21	2.3.1.15
<i>Vibrio furnissii</i>	aceE	7, 22	1.2.4.1

<i>Vibrio furnissii</i>	aceF	8, 23	2.3.1.12
<i>Vibrio furnissii</i>	fabH	9, 24	2.3.1.180
<i>Vibrio furnissii</i>	fabD	10, 25	2.3.1.39
<i>Vibrio furnissii</i>	fabG	11, 26	1.1.1.100
			3.1.26.3,
<i>Vibrio furnissii</i>	acpP	12, 27	1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Vibrio furnissii</i>	fabF	13, 28	2.3.1.179
<i>Vibrio furnissii</i>	gpsA	14, 29	1.1.1.94
			1.1.1.27,
<i>Vibrio furnissii</i>	ldhA	15, 30	1.1.1.28
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	accA	ZP_01643799	6.4.1.2
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	accB	ZP_01644036	6.4.1.2
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	accC	ZP_01644037	6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Stenotrophomonas R551-3</i>	accD	ZP_01644801	6.4.1.2
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	fadE	ZP_01645823	1.3.99.-
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	plsB(D311E)	ZP_01644152	2.3.1.15
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	aceE	ZP_01644724	1.2.4.1
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	aceF	ZP_01645795	2.3.1.12
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	fabH	ZP_01643247	2.3.1.180
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	fabD	ZP_01643535	2.3.1.39
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	fabG	ZP_01643062	1.1.1.100
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	acpP	ZP_01643063	3.1.26.3, 1.6.3.3,
			1.6.99.3
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	fabF	ZP_01643064	2.3.1.179
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	gpsA	ZP_01643216	1.1.1.94.
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	ldhA	ZP_01645395	1.1.1.27, 1.1.1.28

Para la tabla 9, los números de registro son de GenBank, versión 159.0 del 15 de abril de 2007.

Los números EC son de KEGG, versión 42.0 de abril de 2007 (más actualizaciones diarias hasta e incluyendo el 05/09/07), los resultados para la cepa de *Erwinia amylovora* Ea273 se toman del centro de secuenciación Sanger, secuencia al azar completada del 5/9/07, las posiciones para *Erwinia* representan ubicaciones en el pseudocromosoma de Sanger, las secuencias de *Vibrio furnissii* M1 son del pseudocromosoma LS9 VFM1, v2 construido el 9/28/06, e incluyen el gen completo, y también pueden incluir la secuencia flanqueante

Ejemplo 10, cepas de producción a modo de ejemplo adicionales

La tabla 10 proporciona a continuación cepas de producción a modo de ejemplo adicionales. Se describen dos rutas de biosíntesis de ejemplo para producir ácidos grasos, alcoholes grasos y ésteres de ceras. Puede producirse un huésped modificado por ingeniería genética clonando la expresión de los genes de accABCD de *E. coli*, el gen tesA de *E. coli* y el gen fadD de *E. coli* en una célula huésped. Pueden seleccionarse células huésped de *E. coli*, levaduras, añadir a la lista. Estos genes también pueden transformarse en una célula huésped que se modifica para que contenga una o más de las manipulaciones genéticas descritas en los ejemplos 1 y 2, anteriormente. Tal como se proporciona en la tabla 10, pueden crearse huéspedes de producción adicionales usando los genes exógenos indicados.

5

10

Tabla 10

Combinación de genes útiles para preparar cepas de producción modificadas por ingeniería genética

Péptido	Fuentes de genes	Genes	Ácidos grasos		Alcoholes grasos		Cera/ésteres grasos	
			ejemplo 1	ejemplo 2	ejemplo 1	ejemplo 2	ejemplo 1	ejemplo 2
acetil-CoA carboxilasa	<i>E. coli</i>	accABCD	X	X	X	X	X	X
tioesterasa	<i>E. coli</i>	tesA	X		X		X	X
	<i>Cinnamomum camphora</i>	ccFatB						
	<i>Umbellulera californica</i>	umFatB		X		X		
	<i>Cuphea hookeriana</i>	chFatB2						
	<i>Cuphea hookeriana</i>	chFatB3						
	<i>Cuphea hookeriana</i>	chFatA						
	<i>Arabidopsis</i>	AlFatA1						

	<i>thaliana</i>							
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtFatB1[M141T]						
acil-CoA sintasa	<i>E. coli</i>	fadD	X	X	X	X	X	X
acil-CoA reductasa	<i>Bombyx mori</i>	bFAR						
	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	acr 1			X		X	
	<i>Simmondsia chinensis</i>	jjFAR				X		X
	<i>Triticum aestivum</i>							
	<i>Mus musculus</i>	mFAR1						
	<i>Mus musculus</i>	mFAR2						
	<i>Acinetobacter sp</i> M1	acr M1						
	<i>Homo sapiens</i>	hFAR						
cera sintasa/ alcohol acil transferasa	<i>Fundibacter jadensis</i> DSM 12178	WST9						
	<i>Acinetobacter sp.</i> HO1-N	WSHN					X	
	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	WSadp1						X
	<i>Mus musculus</i>	mWS						
	<i>Homo sapiens</i>	hWS						
	<i>Fragaria x ananassa</i>	SAAT						
	<i>Malus x domestica</i>	MpAAT						
	<i>Simmondsia chinensis</i>	JjWS (AAD38041)						
Descarboxilasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	cer1						
	<i>Oryza sativa</i>	cer1						
Transportador	<i>Acinetobacter sp.</i> HO1-N						X	X
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cer5						

Ejemplo 11, fermentación

5 También pueden modificarse por ingeniería genética microorganismos huésped para que expresen umuC y umuD de *E. coli* en pBAD24 bajo el sistema de promotor de *prpBCDE* a través de síntesis *de novo* de este gen con los genes de producción de productos finales apropiados. Para la producción de productos de hidrocarburos a pequeña escala, se incuban células de *E. coli* BL21 (DE3) que albergan pBAD24 (con resistencia a ampicilina y la ruta de síntesis de productos finales) así como pUMVC1 (con resistencia a kanamicina y el sistema de sobreexpresión de acetil CoA/malonil CoA) durante la noche a 37°C en frascos de 2 l con agitación a >200 rpm en 500 ml de medio LB complementado con ampicilina 75 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml hasta que los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de > 0,8. Tras lograr una DO₆₀₀ de > 0,8, se complementan las células con propionato de sodio 25 mM (pH 8,0) para 10 activar los sistemas de genes modificados por ingeniería genética para la producción así como para detener la proliferación celular (a través de la activación de las proteínas umuC y umuD). Se realiza la inducción durante 6 horas a 30°C. Tras la incubación, se examinan los medios para detectar el producto usando CG-EM (tal como se describe a continuación).

15 Para la producción de producto a gran escala, se hacen crecer los microorganismos modificados por ingeniería genética en lotes de 10 l, 100 l o más grandes, se fermentan y se inducen para que expresen los productos deseados basándose en los genes específicos codificados en plásmidos según sea apropiado. Se incuban células de *E. coli* BL21 (DE3) que albergan pBAD24 (con resistencia a ampicilina y la ruta de síntesis de productos finales) así como pUMVC1 (con resistencia a kanamicina y el sistema de sobreexpresión de acetil-CoA/malonil-CoA) a partir

de un cultivo de siembra de 500 ml para fermentaciones de 10 l (5 l para fermentaciones de 100 l) en medios LB (libres de glicerol) a 37°C con agitación a >200 rpm hasta que los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de > 0,8 (normalmente 16 horas) incubados con kanamicina 50 µg/ml y ampicilina 75 µg/ml. Se tratan los medios con complementación continua para mantener propionato de sodio 25 mM (pH 8,0) para activar los sistemas de genes modificados por ingeniería genética para la producción así como para detener la proliferación celular (a través de la activación de las proteínas umuC y umuD). Se complementan de manera continua los medios con glucosa para mantener una concentración de 90 g/100 ml. Tras la primera hora de inducción, se retiran alícuotas de no más del 10% del volumen celular total cada hora y se permite que se asienten sin agitar de modo que se permite que el producto de hidrocarburo suba a la superficie y experimente una separación de fases espontánea. Entonces se recoge el componente de hidrocarburo y se devuelve la fase acuosa a la cámara de reacción. Se hace funcionar de manera continua la cámara de reacción. Cuando la DO₆₀₀ cae por debajo de 0,6, se reemplazan las células por un nuevo lote hecho crecer a partir de un cultivo de siembra.

Para la producción de ésteres de ceras, posteriormente al aislamiento, se lavan brevemente los ésteres de ceras en HCl 1 M para romper el enlace éster, y se devuelven a pH 7 con lavado extenso con agua destilada.

15 Ejemplo 12, caracterización del producto

Para caracterizar y cuantificar los alcoholes grasos y ésteres de ácidos grasos, se usó cromatografía de gases (CG) acoplada con detección por espectros de masas (EM) de impacto electrónico. En primer lugar se derivatizaron muestras de alcohol graso con un exceso de N-trimetilsililo (TMS) imidazol para aumentar la sensibilidad de la detección. Los ésteres de ácidos grasos no requerían derivatización. Se disolvieron tanto derivados de alcohol graso-TMS como ésteres de ácidos grasos en un disolvente volátil apropiado, como acetato de etilo. Se analizaron las muestras en una columna capilar 30m DP-5 usando el siguiente método. Tras una inyección sin división de 1 µl sobre la columna de CG/EM, se mantiene el horno a 100°C durante 3 minutos. Se elevó la temperatura hasta 320°C a una velocidad de 20°C/minuto. Se mantuvo el horno a 320°C durante 5 minutos adicionales. La velocidad de flujo del gas portador helio era de 1,3 ml/minuto. La EM de cuadrupolo explora de desde 50 hasta 550 m/z. Se compararon los tiempos de retención y los patrones de fragmentación de picos de producto con referencias auténticas para confirmar la identidad de los picos.

Por ejemplo, un éster etílico del ácido hexadecanoico eluyó a los 10,18 minutos (figuras 9A y 9B). Se observó fácilmente el ión original de 284 unidades de masa. Más abundantes fueron los iones hijos producidos durante la fragmentación de masas. Esto incluía el ión hijo más prevalente de 80 unidades de masa. El alcohol graso derivatizado hexadecanol-TMS eluyó a los 10,29 minutos y pudo observarse el ión hijo de 313. El ión más prevalente era el ión M-14 de 299 unidades de masa.

Se llevó a cabo la cuantificación inyectando diversas concentraciones de las referencias auténticas apropiadas usando el método de CG/EM descrito anteriormente. Se usó esta información para generar una curva patrón con respuesta (recuento iónico integrado total) frente a la concentración.

35 Lista de secuencias

<110> LS9, Inc

<120> Ácidos grasos y derivados de los mismos

40 <130> 7771-77376-02

<160> 30

<170> PatentIn versión 3.3

45 <210> 1

<211> 498

<212> ADN

<213> *Vibrio furnisii*

50 <400> 1

gtagatgagc ctaaattttc tagaatttag aaaaacctat tgtagaactg gaagctaaaa 60
ttcaggcgct tcgtgacgtg tctcgtcatg gcggtggaac ttccgtagat cttgaaaaag 120
agatcgaaca gctagaaaag aaaagcctag agcttaaaaa gaaaattttc ggtgatttag 180
gggcatggca agtggcacag atggctcgcc atccacaacg tccttacacc ttagattaca 240
tcaacaacat gtttacggag ttcgatgaac tagccgggtga ccggtcattt gctgacgaca 300
aagcgatcgt gggcggcatg gcccgcttag atggctcgcc tgtgatggtg attggtcadc 360
agaaaggccg tgaaaccctg gaaaaagtaa aacgtaactt tgggatgcca aagccagaag 420
gttaccgtaa agccctgcgt ttgatggaaa tggctgagcg tttcaacatg ccaatcatta 480
ccttcacga cacggcgg 498

5 <210> 2
 <211> 564
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnisii*

<400> 2
atgaattcgc tttgtcggca gccgttcgcy cgctgcaage aaagtaaacc caaacactct 60
gcagctcaat tgagctgtct tattcacaag ataaaagaga aagaacaat ggatattcgt 120
aaaatcaaga agcttatcga attggttgaa gagtcaggca ttgctgagct agaaatttct 180
gaaggtgaag aatcggtagc catcagtcgt cacgggtgcy cccagttgc acctatccag 240
tatgcagcac ctgcaccaat ggcagcgcca gtagcagcac ctgcagcagc gccagtcgct 300
gaagcaccag cagcagccaa aacgcctgcy ggccacatgg ttctttctcc aatggtgggt 360

acgttctacc gttcaccaag tccagatgca aaatcattca tcgaagtggg tcaaactgtg 420
aaagcgggtg acacattgtg catcgttgaa gcgatgaaaa tgatgaacca aatcgaagca 480
gacaagtctg gtgtagtac cgagatcctt gttgaagacg gtcaggccgt agaattcgac 540
cagccacttg ttgtcatcga ataa 564

10 <210> 3
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnisii*
 15 <400> 3

atgctagata agttagtcat cgcgaaccga ggcgaaattg cgcttcgtat tcttcgtgca 60
tgtaaagagt tgggcatcaa aactgttgcc gttcactcca cagcagaccg cgatctaaaa 120
cacgtcctgc tggcggatga aaccgtatgt atcggccctg caaaaggcat cgatagctac 180
ttgaacattc cacgcatcat ttcagccgct gaagtgaccg gcgcagtggc catccacccg 240
ggttacggct tcctgtctga aaatgcggac tttgctgaac aagttgagcg cagcggcttt 300
atcttcgtgg gtccaaaagc cgacaccatc cgcttgatgg gcgataaagt gtcagccatc 360
accgcgatga agaaagcagg cgttccttgt gtaccgggtt ctgacgggtc tctggacaac 420
gatgaagtga aaaaccgtgc acacgcgaaa cgcatttggt acccagtgat catcaaagcc 480
tctgggtggc gcggcggctc cggtatgctg gtggttcgca gcgaagcggg actggtcaat 540
gccatcagca tgaccctgct agaagcgaaa gcggcgttca acaacgacat ggtttacatg 600
gagaaatacc tcgaaaacc acgtcacgtt gaagtccaag ttctggccga tggtcagggc 660
agcgcgatcc acttgggtga acgcgactgt tccatgcagc gtcgtcacca gaaagtagtg 720
gaagaagcgc cagcaccagg cactactgaa gagatgcgta agtacatcgg tgaacgctgt 780
accctgtcgt gtatcgaaat cggttaccgc ggcgcaggtg cgtttgagtt cctgtacgaa 840
aacggcgaat tctacttcat cgaaatgaac acacgtattc aggttgaaca cccagtgact 900
gaaatggtca caggcgttga cttgatcaaa gaacagctgc gcatcgcagc aggccaaccg 960
ctgtcgttca cacaagacga catcaaaatt cgtggccatg cgatggaatg ccgtatcaac 1020
gcggaagacc cagaacgctt cctacctgct ccaggcaaga tcaccctgtt cactcacca 1080
ggtggcatgg gcgtgcgttg ggaatcacac atctactcag gctacaccgt accggcgtac 1140
tacgactcga tgatcggcaa actgatcacc tttggtgaga accgtgacgt cgcgattgca 1200
cggatgcgta acgcgctcga tgagatgatt gtggaaggta tcaaaaccaa cattccactg 1260
cagcaagtaa tcatgaaaga tgagaacttc caacacggtg gcaccaacat ccactatctg 1320
gagaaaaagc tggggctgca ataa 1344

<210> 4
 <211> 927
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnisii*

5

<400> 4
atgagctggc ttgagaagat tttagaaaa agcaacatcg gaagttcacg taaagcgtct 60
atccctgaag gggtttgac caaatgtaca tcgtgtgaac aggtgcttta ttacgctgaa 120
ctagagcgca atcttgaagt ttgtccgaag tgtaatcatc acatgcgtat gaaggcgcgc 180

cgtcgtcttg aaacgttctt ggacgaagca aaacggttacg aaatcgcgga cgaaactcgaa 240
 ccgcaagata aactgaaatt taaagactcc aaacggttaca aagagcgtct tgcgactgcg 300
 cagaagagca gtggcgaaaa agatgcgctg attgtgatga aaggcgagtt gatgacgatt 360
 ccagtcgtgg cgtgtgcggt tgaattctcg ttcattggcg gttcaatggg gtcggttgtc 420
 ggtgcgcggt tcgtgcgctg agttgaagcg gcgattgaag cgaactgtgg tctggtctgt 480
 ttctctgcca gtggtggcgc acgtatgcaa gaagcgcgta tgcgctgat gcagatggcc 540
 aaaaccagtg cagcgtcga gcgtctaacg gcgaaaggtc tcccgtttat ctccgtgatg 600
 acagacccaa ccatgggtgg ggtgtctgcg agtctggcaa tgctgggca catcaacatc 660
 ggtgagccga aagcactgat cggtttcgcg ggtcgtcgcg tgatcgagca gaccgtgcgc 720
 gaagagctgc cgaaggttt ccaacgcagc gaattcctgc tggagcacgg tgcgattgat 780
 atgatcgttg accgtcgtga aatgcgtcag cgtgtggctg gcctgctggc gaaaatgaca 840
 cgtcaggagt cgccgctggt ggtttctgtg aacgatgcgc caaatgaagc cgcatattct 900
 gtaccagaag cgaacaaaaa agggtaa 927

<210> 5
 <211> 2445
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnisii*

5

<400> 5
 atggacatct tgctctcaat cttagggttc gtggctcgtg taagcggctg cctgtaccac 60
 agaacctcat taatgactgc cttagccgca ctgaccgtga ccatgttggt cctgtcgttg 120
 tttggcccag tgggtatcat cagctggcg ctgtacttag ccgctatcgc ggtattggca 180
 gtcccgtcaa tccgtcaaag tctcatcagc ggtaagacac taaaggtatt caaaaaagta 240
 ctgcctgca tgctgcagac agaaaaagaa gcgcttgatg ctggcaccgt gtggtgggaa 300
 gccgaactgt tcaaaggcaa accggactgg caacagctga gccatatcaa agcggccaca 360
 ctttctgccc aagaacaggc gttcctcgtg gcccagtgca acgaagtgtg cgccatggtg 420
 aacgactatc aggtgactca cgaattggcg gatttgccct cggaagtgtg gcaatacctg 480
 aaagaccaca aatttttcgc catgatcatt aagaagcagt acggcggctt ggaattttcc 540
 gcgtacgcgc aatcgtggt gctacaaaag ctgacggcg taticggcgt gctctcttcc 600
 accgtcggcg tgccgaactc tctcggcccg ggcgaactgc tgcaacatta cggcaccgac 660
 gatcagaaaag attactacct ccctcgtttg gcggaaggca aagagattcc atgtttcgcg 720
 ctgaccagcc cagaagcggg ctctgatgcg ggctcgattc cggattacgg catcgtgtgc 780
 aaagacgaat ggaagggcaa agaagtgcgt ggcattgcgc tgacatggaa caaacgctac 840
 atcacgctgg cgccagttgc gacggttctt ggtttggcct ttaaactgcg cgaccctgac 900
 gggctattgg gcgacaaaa agagattggc atcacgtgtg ctttgatccc gacacacctc 960
 aaaggggtgg aaatcggcaa tcgtcactc ccattgaacg tgccgttcca aaatggcccc 1020
 acgcgcgca acgatctatt tgtgccgctg gacttcatca tcggtggccc atcgatggcc 1080
 ggccaagggt ggcgatgct ggtggaatgt ttatcagtgg gtcgcggtat tacgctgcca 1140
 tcgaactcaa ctggcggcat caaagcggcg gcaatggcaa cgggcgctta tgcgcgcat 1200
 cgtcgtcagt tcaagcaacc cattggtcac atggaagga ttgaagaacc tttggcgcgc 1260

cttgaggga	acgcttacgt	gatggatgca	gcgagcaacc	tcactgtcgc	ggggattgat	1320
gccggcgaaa	aaccatcggc	tatttctcgc	attgtgaagt	atcactgtac	ccaccgcggc	1380
caacgctcaa	tcacgatgc	aatggacatc	gtcggcgga	aaggcatctg	tttggccca	1440
tcgaacttcc	ttgcgcgagg	ttaccaaggt	tcccctatcg	cgatcacctg	ggaaggcgc	1500
aacattctga	cccgtccat	gatcatcttt	ggtcagggtg	ctattcgctg	ccatccgtac	1560
gttttgaaag	agatggaagc	agcgtattca	gacagcgcca	atgcggtcga	acaatttgac	1620
gccgcgctgg	ctggccatgt	cagctttacc	atgagtaact	tggtgcgctg	catctggttt	1680
ggtctgaccg	acgggttagg	ctctgccgca	ccaaccaaag	atgccaccaa	acgttactat	1740
cagcaactca	accgttacag	tgcaaacctt	gccctgctgg	ccgataattc	catggccgta	1800
ctgggtggct	ccctgaaacg	taaagagcgc	ctgtccgcgc	gtttgggtga	tattttaagc	1860
caactttatc	tcagctcagc	aacgctgaag	cgctttgaga	atgatggtcg	cccagcagaa	1920
gatttggcct	tggtacactg	ggggctgcaa	gacagcttga	aacagaccga	agtggcgatt	1980
gatgagttct	tggcgaactt	cccgaacaag	gtgatcggca	aagccctgcg	tgtcttgatc	2040
atgccatttg	gccgcgtcgc	caaagcacca	aacgacaagc	tcgacagcaa	agtggcgcag	2100
atcattcaaa	cgccaagtgc	gacccgctca	cgcatcggtc	gtcatcagta	cctcgaaccg	2160
actgcacata	acgcggtcgc	caagattgaa	ctggcgttga	atgtgattct	tcaagcagaa	2220
ccggtgttcg	acaaggtatg	caaagcgtg	aacgaacgtc	gcccattcac	gcaattggat	2280
caagtggcac	aatgtggcct	tgagcaaaag	ctgatcaccg	agcaagaagc	cgaaactgctg	2340
atcgaagccg	agcaacaccg	cttatacacc	atcaatgtgg	atgactttgc	gccgcaggag	2400
ttagcagcaa	aaaagtca	accaagctg	gtcgaggctg	cgatga		2445

<210> 6
 <211> 2424
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnisii*

5

<400> 6						
atgtcttctg	gacactcatt	ttcgcgttcc	ttgttgaaat	taccactgtc	tgttctggta	60
aaagggtacgg	tcattccatc	caatccgatc	gatgatctcg	agattgatat	taacaagccg	120
atcgtctatg	cactaccctt	tcgctccaat	gtcgacctgt	tgacgctgca	aacgcatgcg	180
ttacaagccg	gcctgccgga	tccgtagtaa	ccgctgacca	ttcatagtca	cacgctgaaa	240
cgttacgtgt	tcattctcgtc	gcgccccacg	ctgctgcaag	atgacaatca	ggtgccgacc	300
gattctatcg	ccacattcag	cgaaatgctc	agcctgcac	aagaagattc	ggagtggat	360
gtgcaggtea	ttcctgccac	cgctctgtgg	ggacgcaaac	cgggcaaaga	aggtcgggaa	420
cgccatatt	tgcaagcctt	gaatggcccg	caaaaagcca	aagcggctctt	tgccgccgga	480
cgggactggt	tggtgcgctt	tagccccgtg	gtctcgtcgc	gttatatggc	cgactcgcac	540
ggcaccgatg	cctcgattgc	ccacaagctg	gcacgtgtgg	cgcgattca	cttctcacgt	600
cagaagctgg	cggcgtctgg	gccgaacctg	ccacaacgcc	accagttggt	ccaacgcttg	660
atgaattccc	cagcgatcga	aaaagcgatt	gctgatgaag	cggccgcgaa	gaacatctcg	720
ctggagaaag	cgcgtaaaga	agcgcacgac	atgcttgatg	aaatcgccgc	agatttctct	780
tactcgttgg	tgcgcaaagg	cgatcgcatt	ctgggttgg	tatggaaccg	catctatcaa	840

ggcttgaaca tcaataacgc cgcgacggtg cgccgcttgg cacaagatgg tcācgagatt 900
gtgtatgtgc cctgtcaccg cagccacatg gattacctgt tgctgtcata cgtgttgtat 960
cacgaaggca tggtgcccc gcacattgca gcaggtatta acctcaactt cttccccggcc 1020
ggaccgattt tccgccgtgg tggcgcattc tttattcgtc gcagctttaa aggcaacaaa 1080
ctctattcaa ccatcttccg cgagtatctg gcagagctgt ttgccaaagg ctactcgggtg 1140
gagtacttca gtgaaggggg ccgctcacgc acaggtcgc tgctgcaage caaaaccggc 1200
atgtggcga tgaccattca agccatgttg cgcggtctca accgcccggt cactctgggtg 1260
cccgtgtaca tcggctatga acatgtgatg gaagtgggta cttacgcaa agagctgcgc 1320
ggtaaacgca aagagaaaga gaatgccagc ctagtgtctg gcaccattcg taaactgcgc 1380
aacttcggtc aaggctacgt gaactttggt gagccgattc cattgaacca gttcttgaat 1440
gagcaagtgc ccgagtggac acaagacatc gatgccatgg gcgccagcaa accccagtgg 1500
atgacaccgg tggtgaaaca gctcgcgacg aagatgatga cgcacattaa cgatgcagcg 1560
gccccaatg ccatgaccct atgtgcgacg gcgcttttgg catcgcgtca gcgcgcgctg 1620
gcccgtgaca atctggtgaa gcagatcgat tgctacctgc aactgctgcg caacgtgccc 1680
tattccaaca cctatacctg gccaaagcgc agcgcggaaa gtttgggtgca gcacgccgaa 1740
tactggata agtttgggt ggaaaccgac acctatggcg acatcatttc gctcgatcgc 1800
aatcagtcga ttctgatgac ctactaccgc aacaacatca ttcacctgct ggcgttgcca 1860
tactgattg cgcagatgct gatccgtcag caacaaatgc cggtggaaca gattcagacc 1920
tggtttgca aggtgtacc a ttcctcaa caagagctgt tcctcagcca tgatgaaacg 1980
caactcgatg aggtggtgat gcattatctc gctgagctgc aacgccaaca actggtgacg 2040
ctggacgatg gcattgccac catcaaccaa gcgcagacgc aggtgctgat gcttctgggt 2100
cgaccatct ctgagacgct gcaacgctac gcgatcacgc tcaacctgtt ggtggctaac 2160
cctgagctgg gcaaatccga tctggaaagc aagagccaag aaattgcgca gcgtctgggt 2220
cgactgcag gcacaaacgc ccccgagttt ttcgacaaag gcgtgttctc atcgatgttt 2280
gtcacgctca aacagcaagg ttacctgac agcgatggca actgccacct cgaccagacc 2340
aagcacttct cgcgatgct ctacaccatg ctttaccctg aagtgcgcct gactattcag 2400
gaaagtatct gtcaggtgga ataa 2424

<210> 7
 <211> 2661
 <212> ADN
 <213> *Vibrio fumisii*

5

<400> 7
atgtctgaca tgaagcatga cgtagatgca ctggaaactc aggagtgggt agccgcactt 60
gagtcagttg tacgtgaaga aggcgtagag cgtgccagat atctactaga agaagtactg 120
gaaaaagcac gtctagacgg cgttgatatg ccaactggta ttacaactaa ctacatcaac 180
acgatctctg cggcgcgaaga accggcatac ccaggcgaca cgaccattga acgtcgtatt 240
cgttcgatca ttcgttggaa cgcgatcatg atcgttctgc gtgcatcgaa gaaagacctg 300
gatctggggc gccacatggc atcattccag tcttcagctg cgttctatga aacatgtttc 360
aaccacttct tccgtgcacc aaacgagaag gacgggtgggt acctggttta ctaccaaggt 420

catattttctc cagggattta cgcgcgtgca ttcggtgaa gccgcctgac agāagaacaa 480
 ctggataact tccgtcaaga agtggatggc aaaggatttc cttcctaccc acaccgaaa 540
 ctgatgctg aattctggca attcccaact gtatcgatgg gtctgggtcc tatcgcatcg 600
 atctaccaag ctcgcttcc t gaaatacctg gaaggccgtg gcatgaaaga cactgctgag 660
 cagcgcgttt acgcgttctt gggcgacggt gagatggatg agccagaatc acgtggtgcc 720
 atttctttcg cggcgcgtga gaaactggac aacctgtgct tcctgatcaa ctgtaacctg 780
 caacgtctgg atggcccagt aatgggtaac ggcaagatca tccaagagct agaaggcctg 840
 ttcaaaggcg ctggctggaa cgtggtgaaa gtgatctggg gtaacaactg ggattctctg 900
 ctggcaaaag acacttcagg taaattgctg caactgatga acgaaacat cgacggcgac 960
 taccaaacgt tcaaagcgaa agatggcgcg tacgttcgtg agcatttctt cggtaaatac 1020
 ccagagacag cagcgcctggt tgctgacatg actgacgacg aagtgttcgc cctgaaacgt 1080
 ggtggtcacg agtcttctaa actgtacgca gcgttcaaga acgcacaaga caccaaaggc 1140
 cgtccaaccg ttatcctcgc gaagactgta aaaggttacg gcatgggtga tgcggctcaa 1200
 ggtaagaaca ttgcacacca agtgaagaag atggacatga cgcacgtgat cgcgatgctg 1260
 aaccgtctgg gtctgcaaga cataatttct gatgaagaag tgaacaacct gccttacctg 1320
 aaactggaag aaggttcaaa agaattcgaa tacctgcacg ctcgctgtaa agcgtgcac 1380
 ggttacacgc cacagcgtct gcctaagttc acacaagagc ttgtgattcc tgaactggaa 1440
 gagtcaaac cgcttctgga agaacagaaa cgtgaaatct cttcaacctt ggcttacgtg 1500
 cgtgactga acattctggt gaaagacaaa aatattggta agaacatcgt tcctatcatt 1560
 gctgacgaag cacgtacttt cggtatggaa ggtctgttcc gtcaaatcgg tatctacaac 1620
 ccacacggcc agacgtacac gcctgaagac cgtggcgtgg tgtcttacta caaagaagac 1680
 actgcaggtc aggtactgca agaaggatc aacgaactgg gtgcaatgct atcttgggtt 1740
 gcggtgca catcttacag caccaacaac ctgccaatga ttccgttcta catctactac 1800
 tcaatgttcg gttccaacg cgttggcgac atggcatgga tggcaggatga ccaacaagcg 1860
 cgtggttcc tactgggcg c aacggctggc cgtacaaccc tgaacggatga aggcctgcag 1920
 cacgaagatg gtcactcaca cattcaagcc gcgacaattc cgaactgtat ctcttacgac 1980
 ccaacattcg cttacgaagt tgcggtgatc atgcaagacg gtatccgtcg tatgtatggc 2040
 gatcaagaga acgtgttcta ctacatgacg ctgatgaacg agaactacgc tcaccagcg 2100
 atgccagaag gcgcagaaga aggtatccgt aaaggatctt acaactgga aacgtgtct 2160
 ggttctaaag gtaaggttca actgatgagc tcaggtaacta tcatgaatga agtacgaaa 2220
 gcggcagtga tcctgagcga agaatacggc atcgcgtctg atgtttactc tgtaacctca 2280
 ttcaacgaac tggctcgtga tggtcagaac gtcgagcgtt acaacatgct tcaccagaa 2340
 gccgaagcgc aagtacctta catcgcttca gtgatgggaa ctgaaccagc aatcgtgca 2400
 accgactaca tgaagaacta cgctgaccaa gttcgcgcgt tcattcctgc agagtcttac 2460
 aaagtgctgg gtactgacgg cttcggctctg tcagacagcc gtgagaacct acgtcgtcac 2520
 ttcgaagtga acgcaggcta cgctcgttgtt gctcgcgctaa acgaactagc gaaacgtggt 2580
 gaagtgtgaga aatctgtggt ggcggaagct atcaagaat tcgacatcga cactgaaaaa 2640
 actaaccgct tatacgttta a 2661

<211> 1893
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnisii*

5 <400> 8

atggctatcg	aaatttacgt	accagatatc	ggtgcagatg	aggttgaagt	gactgagatt	60
cttgtcagcg	taggcgacaa	ggttgaagaa	gaacaatctc	tgattactgt	tgaaggcgac	120
aaagcttcta	tggaagttcc	tgcgtctcag	gccggtattg	tcaaagaaat	caaagttgtg	180
actggtgata	aagtcacaac	tggctcactg	atcatggtgt	ttgaagcggg	agggtgcagca	240
gcygctgcac	cagcacctgc	ggcgggaagca	gcaccagttg	cggcagcacc	agcagccggt	300
gaactgaaag	aagttaacgt	accggacatc	ggcggtgacg	aagttgaagt	gactgaaatc	360
atggttgcyg	tgggtgacac	cgtgtctgaa	gagcagtcgc	tgatcaccgt	tgaaggcgac	420
aaagcgtcaa	tggaagtgcc	tgcgccattc	gcgggtaccg	tgaaagagat	caagatcgca	480
tcgggtgaca	aagtgaccac	aggctcactg	atcatggtct	tcgaagtggc	cggttctggt	540
gcgccagcag	cggcagcgcc	agctcaggca	gcggctccag	cagcagcgcc	agcggtagca	600
gcagataaag	aagttaacgt	gccagatatc	ggcggcgatg	aagttgaagt	gactgaaatc	660
atggttgacg	ttggcgacat	ggtgagcgaa	gagcaatctc	tgatcactgt	ggaaggcgac	720
aaagcgtcga	tggaagttcc	tgcaccattc	gcgggtaaag	tgaaagcgat	caaagtcgcy	780
gctggcgaca	aagtgtcgac	tggctcactg	atcatggtgt	ttgaagtggc	aggcgcagcy	840
ccggcagctg	ttcagcacc	agctcaagcc	gcagcacctg	cagcagcggc	accgaaagct	900
gaagcgccag	cggcagcagc	acctgcagcy	gcaaccggcy	acttccaaga	gaacaatgaa	960
tacgcacacg	cgctgccagt	ggttcgctgc	ttagcgcgtg	aattcgggtg	gaacctgtct	1020
aaagtgaag	gttcaggctg	taagagccgc	attctgaaag	aagatgttca	gaactacgtg	1080
aaagaagcgc	tgaaacgcct	agaatcaggc	gcagcatcag	ccgcatctgg	caaaggcgac	1140
ggcgcagcac	ttggcctgct	accttgcca	aaagtggact	tcagcaagtt	cggtgacact	1200
gaaattcagc	cactgtctcg	cattaagaag	atctctggcy	cgaacctgca	ccgtaactgg	1260
gtgatgatcc	cgcagctgac	ccagtgggat	aacgcagaca	tcacagaact	agaagctttc	1320
cgtaaagaac	agaacgcgat	cgaagcgaag	aaagacactg	gcatgaagat	cacgccactg	1380
gtgtttatca	tgaaagcggc	tgcgaaagcy	ctggaagcat	tccttgcggt	caactcgtct	1440
ctgtctgaag	atggtgaaag	cctgattctg	aagaaatcag	tgaacatcgg	tatcgcgggt	1500
gatacaccaa	acggtctggt	tgttcctgtg	ttcaaagacg	tgaacaagaa	aggcatttac	1560
gagctgtctg	aagagttggc	agtcgtatcg	aagaaagcac	gtgcaggtaa	actgacggcy	1620
tctgacatgc	aaggcggctg	ttcaccatc	tctagtctgg	gtggtatcgg	cggtacagca	1680
ttcacaccaa	tcgtgaatgc	accagaagta	ggtattctgg	gtgtgtctaa	gtctgaaatg	1740
aagccagtgt	ggaacggcaa	agaatttgcy	ccacgtctgc	aactgcctct	gtctctgtca	1800
tacgaccacc	gtgtgatcga	tggcgcggaa	ggtgcacgct	tcatcactta	cttgaacgggt	1860
tgcttgagcy	acattcgtcg	tctggttctg	taa			1893

<210> 9
 <211> 951
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnisii*

10

<400> 9

atgtatagca aaatTTtagg tacaggcagc tacctgccat ctcagggtgcg tactaacgcg 60
gatttagaga aaatggtaga tacaagtgat gagtggattg tcacgcgtac tggatttcgc 120
gagcgtcgta ttgccgcaga taatgaaacc gttgccgata tgggctttta cgcggcgcaa 180
aacgctattg agatggcggg cattgataaa aacgacatcg atttaatcat ccttgccacg 240
accagtagca gtcacacgtt cccttcgtct gcctgtcagg tgcaagcgaa actgggcatt 300
aaaggttgcc cagcgttga ccttgccgca gcgtgttctg gttttatcta cggattgtca 360
gtcgcggatc aacacatcaa atcgggcatg tgtaaaaacg tgctggatgat tggtgccgat 420
gcgttgtaaa aaacgtgtga cccaaccgat cgctcaacca ttatcctggt tggatgatggt 480
gcgggtgctg ttgtgggttg tgccagtga gaacctggca tttgtgcac tcatgtttac 540
gctgatggtc aattcggcga cctgctcagc ctggaagtac cagagcgtgg cggatgatgtg 600
gacaaatggc tataatatggc cggcaacgaa gtgttcaaag tggcgggtgac gcagctttca 660
aaactggtca aagacacgct ggcagccaac aatatgcaca agtctgaact agactggttg 720
gtaccgcatc aagcgaacta tcgattatt tctgcgacgg cgaaaaaatt gtcgatgtcg 780
ctggatcaag tggatgatcac gttggaccgt catgggaaca cgtctgctgc aacggtgccg 840
acggcactgg acgaagcggg acgtgatggc cggatcaaac ggggtcagac gctactttta 900
gaagcctttg gtgggtggtt cacctggggg tctgcggttag tgaagttcta a 951

<210> 10
 <211> 924
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnisii*

5

<400> 10
atgagcaagt ttgctatcgt atttccaggt caaggttctc aagcgggttg tatgcttgcc 60
gagcttggcg aacagtatga cgtagttaaa caaactttcg cagaagcgtc tgacgcaactg 120
ggttacgacc tatgggcatt ggttcagaac ggtcctggtg aagatctcaa ccagactttc 180
cgtagcaaac ctgcaactgct ggcgtcttct gtggcgattt ggcgtgtatg gcaagcgtg 240
ggtcttgagc agccagaagt gctggcaggc cacagccttg gtgaatactc tgcactgggt 300
tgtgccggtg tgattgattt taaagccgcg atcaaattgg tcgaactgcg tggatcaactg 360
atgcaagaag cagtacctgc aggaaccggc gcaatgtacg cgatcatcgg tttggatgat 420
gcggcgattg ccaaagcgtg tgaagacgct gcgcaaggcg acgtgggtgct tccgggtgaac 480
ttcaactcac caggccaagt ggtcattgcc ggtcagaaag atgcggtaga acgcgcgggc 540
gcactgtgta aagaagcggg cgcgaaacgt gcaactgccac tgccgggtgct agtgccttca 600
caactgcgcg tgatgaaacc tgcagcagaa aaactggctg tggcgttaga agcgttgag 660
ttcaacgcgc cgcaaatccc agtgattaac aacgtggacg ttgcgacaga aacggatcca 720
gcgaaaatca aagatgcgtt ggttcgtcaa ctacacagcc cagtccgctg gacagaaggc 780
gtggagaaga tggcagcaca aggcattgaa aaactaattg aagttggccc aggcaaagta 840
ctgactgggt tgactaaacg tattgtgaaa acgcttgatg cagcagcagt gaacgacatc 900
gcttcaactgg aagccgttaa gtaa 924

<210> 11
 <211> 747
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnisii*

10

15

<400> 11

atgagtaatt tcatgaacct ggaaggcaaa attgtcctgg ttactggcgc aagccgtggt 60
 atcggtaaag caatcgcgga actattgggt gaacgtggtg ccacagtgat tggtagacgcg 120
 accagcgaag gcggcgcaga tgcgatcagt gcgtacctag gcgacaacgg caaaggctctg 180
 gcgttgaatg tgacagatgt agcgtctatc gaatccgtgc tgaaaagcat taacgatgaa 240
 ttcggcgggtg ttgatattct ggtgaacaac gcgggtatca cgcgtgacaa cctgctgatg 300
 cgtagaaaag atgacgagtg gaccgatatt ctggatacca acttgacgtc gatcttccgt 360
 ctgtctaaag ctgtacttcg tggcatgatg aaaaaacgcc aaggccgtat cattaatgct 420
 ggttctggtg tcggtacaat gggtaacgcg ggtcaaaaca actacgcagc cgcaaaagcg 480
 ggcgtaatcg gctttacgaa gtcaatggca cgtgaagttg catcccgtgg cgtgaccgtg 540
 aacacagttg caccaggttt catcgaacg gatatgacaa aagcgtgaa tgacgaccaa 600
 cgtgctgcta cacttgaca agtgccagca ggtcgtctgg gtgatccacg tgaatcgca 660
 tccgcgggtg cattcttggc atctccagaa gcagcgtaca ttaccgggtga aactctgcac 720
 gttaacggcg gaatgtacat ggtttaa 747

5

<210> 12
 <211> 525
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnisii*

<400> 12

gaagtgaacg gaacttggtc ggtaaaatgt tgacttcgct caaaacttgt caatgaaatg 60
 cgcaagattt gtgcatgata tatgtcaaaa atggtgtgaa tttcgggtta aatcgccaaa 120
 tttgtgggtt gaccagcaag gtcccccttg caactttcac tagtttgaat aaactacgga 180
 atcatcgcac taggcgaaat ctgtaaagga aaagaaaaaa tgagcaacat cgaagaacgc 240
 gtaaagaaaa tcatcgttga acagctaggc gtagacgaag cagaagtga aaacgaagct 300
 tctttcgttg aagacctagg tgcggattct ctagacactg ttgagcttgt tatggctctg 360
 gaagaagaat tcgacactga gattctgat gaagaagcag agaaaatcac tactgttcaa 420
 gctgcgatcg attacgtaaa cagcgtcag taatgtctct cccagggcg cctctggcc 480
 gcctgagttt ttctactca tctataatct ctcatagaat ttcca 525

10

<210> 13
 <211> 1251
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnisii*

15

<400> 13

atgatcgtgt ccaagcgtcg tgctcgttgc actggcatgg gtatggtgct accggtaggc 60
 aacactgtag aatcttcttg gaaagccctg ctagctggct aaagtggat cgtgaatata 120
 gaacactttg atacaacaaa tttctcaact cgtttcgcag gtctggtaaa agatttcaac 180
 tgcgaagagt acatgtctaa aaaagatgcc cgtaaaatgg atttatttat ccagtacggt 240
 attgctgcgg gcatccaagc gctagacgat tctggctctg tgatcactga agaaaacgcg 300

ccacgcgtcg gtgttgaat cggctcgggc atcgggtggtc ttgattgat cgāaaaaggt 360
catcaagcgc ttatggagaa aggtccacgt aaagtgagcc cattcttcgt cccttcaacc 420
atcgtgaaca tggttgccgg taacttatct atcatgctg gtcttcgtgg tcctaacatc 480
gcgatttcaa ctgcatgtac cacaggttta cataacatcg gccacgcggc gcgtatgatt 540
gcatacggcg atgcggaagc gatggttgc ggtggtagtg aaaaagcgtc taccctctctg 600
ggtatggctg gcttcgggtc cgctaaagcg ctgtctacac gcaacgatga acctgcaaaa 660
gcttctcgcc cttgggacaa agaccgtgac ggttttgttc tgggtgacgg cgcaggcgtg 720
atggttctgg aaggatacga acacgcaaaa gcgcgtggcg cgaaaatcta cgcagaaatc 780
gtaggcttcg gtatgtccgg tgacgcgtac cacatgactt cgcāagcga agatggttca 840
ggtggcgcgc tggctatgga agcggcgatg cgtgatgcag cactagcggg tacacaaatc 900
ggctacgtga acgcgcacgg tacgtcaaca ccagcaggtg acgtagcggg agtgaaaggt 960
atcaaacgtg cacttggcga agacggtgcg aaacaagtac tgatctcttc aaccaaatcg 1020
atgaccggtc acctactggg tgctgcaggc tcggtagaag ccatcattac cgtgatgtct 1080
ctggttgacc aaatcgttcc gccaacctac aacctggata atccagaaga aggtttgggc 1140
gtggatttgg ttccgcacac agcacgtaaa gtggaaggca tggaatacgc gatgtgtaac 1200
tcgtttggct ttggtggcac aaacggttca ctgatcttca agcgcgtata a 1251

<210> 14
 <211> 1035
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnisii*

5

<400> 14
atgactgatt cacacacaaa caatgcttac ggtaaagcga tcgccatgac cgtcattggc 60
gcgggttcgt acggcacatc tctggccatt tctttggctc gcaacggcgc caatgttgtc 120
ctgtggggac acgatccggt ccacatggcg cgtttggaag cggaacgtgc taaccacgaa 180
ttctccctg acatcgattt tccaccgtcg ctgatcattg aatccgattt gcaaaaagcg 240
gtgcaagcga gccgcgatct gctggtggtg gtgccaagcc atgtgtttgc gattgtgctc 300
aacagcctgc aaccttactt gcgagaagat acccgtatct gctgggcaac caaagggttg 360
gaaccggaca caggacgttt gctgcaagat gtggcgcatt acgtgctggg tgaatcccat 420
ccattggcgg tgctgtctgg cccgacgttt gcgaaagagc tggcgatggg tatgcccact 480
gcgatttcag tggcatcgcc tgacgcgcag tttgtcggc atctgcagga aaagattcac 540
tgacgcaaaa ccttccgtgt ttatgccaac agcgatttca tcggcatgca actggggggc 600
gctgtgaaga acgtgattgc cattggtgcg gggatgtcgg atggcatcgg ctttgggtgcc 660
aacgctcgta cggcgtgat taccggtggt ttggcggaaa tgaccctgtc gggcgcggcg 720
ctgggcgcgc agccggaaac cttcatgggc atggcggggc tgggtgattt ggtgctgacg 780
tgtaccgata accaatcgcg caaccgtcgt tttggtttgg ccttgggcca aggcaagat 840
gtcgatacgg cgcaacaaga tatcgggtcaa gtggtggaag ggtatcgaa caccaagag 900
gtgtggctac tggcgcacg catgggcgtg gagatgcaa tagttgaaca aatttatcaa 960
gtattgtatc aaggaaaggā cgcccgcatt gcagcacaag atttgctggc gcgcgataaa 1020
aaagcagaac gataa 1035

10

<210> 15

<211> 855
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnisii*

5 <400> 15
gtgggtgtgtg cgtttgtgaa cgacgatttg agtgcgaccg tgttgaaga actgtatcaa 60
gggggcactc gcctgatcgc catgcgctgc gcgggctttg ataaagtgga tttagacgcc 120
gcaaaacgca ttggcatgca ggtggttcgc gtacctgcgt attcaccaga agcggtgcca 180
gagcacgcgg tcgggttgat gatgtgtctg aaccgccgtt accacaaagc gtatcagcgc 240
acacgtgagg ccaacttctc gttggaaggc ttggtgggct ttaacttcta tggcaaaacc 300
gtgggtgtga ttggttcagg caagattggc attgcagcga tgcgtatcct caaaggcctt 360
ggcatgaaca ttctctgctt tgacctgat gaaaacccat tggccattga aatcggcgcg 420
aaatacgttc aattgcccga gctgtatgca aacagcgaca tcattacgct gcactgcccg 480
atgaccaaag aaaactacca cctgctggat gagcaagcgt tcgctcaaat gaaggatggg 540
gtgatgatca tcaataccag ccgtggcgaa ttgcttgatt cagtcgcagc cattgaagcg 600
ctcaaacgtg gccgtattgg cgcgctgggc ttagacgtat acgacaacga aaaagatctg 660
ttcttccaag acaagtcgaa cgatgtgatt gtagatgacg tgttccgccg cctgtccgcc 720
tgccataacg tgctgtttac cggccatcag gcgttttga cagaagatgc cctgcacaat 780
atcgcgcaaa ccacgcttaa caacgtgctg gcgtttgagc aaggcaccaa atctggaaac 840
gaattagtta actaa 855

<210> 16
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> *Vibrio furnisii*

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

15

<400> 16
Phe Xaa Asn Leu Glu Lys Pro Ile Val Glu Leu Glu Ala Lys Ile Gln
1 5 10 15
Ala Leu Arg Asp Val Ser Arg His Gly Gly Gly Thr Ser Val Asp Leu
20 25 30
Glu Lys Glu Ile Glu Gln Leu Glu Lys Lys Ser Leu Glu Leu Lys Lys
35 40 45
Lys Ile Phe Gly Asp Leu Gly Ala Trp Gln Val Ala Gln Met Ala Arg
50 55 60
His Pro Gln Arg Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr Ile Asn Asn Met Phe Thr
65 70 75 80
Glu Phe Asp Glu Leu Ala Gly Asp Arg Ala Phe Ala Asp Asp Lys Ala
85 90 95

Ile Val Gly Gly Met Ala Arg Leu Asp Gly Arg Pro Val Met Val Ile
 100 105 110

Gly His Gln Lys Gly Arg Glu Thr Arg Glu Lys Val Lys Arg Asn Phe
 115 120 125

Gly Met Pro Lys Pro Glu Gly Tyr Arg Lys Ala Leu Arg Leu Met Glu
 130 135 140

Met Ala Glu Arg Phe Asn Met Pro Ile Ile Thr Phe Ile Asp Thr Ala
 145 150 155 160

Gly Ala Tyr Pro Gly Val Gly Ala Glu Glu Arg Gly Gln Ser Glu Ala
 165 170 175

Ile

<210> 17

<211> 187

5 <212> PRT

<213> *Vibrio fumisii*

<400> 17

Met Asn Ser Leu Cys Arg Gln Pro Phe Ala Arg Cys Lys Gln Ser Lys
 1 5 10 15

Pro Lys His Ser Ala Ala Gln Leu Ser Cys Leu Ile His Lys Ile Lys
 20 25 30

Glu Lys Glu Thr Met Asp Ile Arg Lys Ile Lys Lys Leu Ile Glu Leu
 35 40 45

Val Glu Glu Ser Gly Ile Ala Glu Leu Glu Ile Ser Glu Gly Glu Glu
 50 55 60

Ser Val Arg Ile Ser Arg His Gly Val Ala Pro Val Ala Pro Ile Gln
 65 70 75 80

Tyr Ala Ala Pro Ala Pro Met Ala Ala Pro Val Ala Ala Pro Ala Ala
 85 90 95

Ala Pro Val Ala Glu Ala Pro Ala Ala Ala Lys Thr Pro Ala Gly His
 100 105 110

Met Val Leu Ser Pro Met Val Gly Thr Phe Tyr Arg Ser Pro Ser Pro
 115 120 125

Asp Ala Lys Ser Phe Ile Glu Val Gly Gln Thr Val Lys Ala Gly Asp
 130 135 140

Thr Leu Cys Ile Val Glu Ala Met Lys Met Met Asn Gln Ile Glu Ala
 145 150 155 160

Asp Lys Ser Gly Val Val Thr Glu Ile Leu Val Glu Asp Gly Gln Ala
 165 170 175

Val Glu Phe Asp Gln Pro Leu Val Val Ile Glu
 180 185

10

<210> 18

<211> 447

<212> PRT
 <213> *Vibrio furnisii*

<400> 18

Met Leu Asp Lys Leu val Ile Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Leu Arg
 1 5 10 15

Ile Leu Arg Ala Cys Lys Glu Leu Gly Ile Lys Thr val Ala val His
 20 25 30

Ser Thr Ala Asp Arg Asp Leu Lys His val Leu Leu Ala Asp Glu Thr
 35 40 45

val Cys Ile Gly Pro Ala Lys Gly Ile Asp Ser Tyr Leu Asn Ile Pro
 50 55 60

Arg Ile Ile ser Ala Ala Glu val Thr Gly Ala val Ala Ile His Pro
 65 70 75 80

Gly Tyr Gly Phe Leu Ser Glu Asn Ala Asp Phe Ala Glu Gln val Glu
 85 90 95

Arg Ser Gly Phe Ile Phe val Gly Pro Lys Ala Asp Thr Ile Arg Leu
 100 105 110

Met Gly Asp Lys val Ser Ala Ile Thr Ala Met Lys Lys Ala Gly val
 115 120 125

Pro Cys val Pro Gly Ser Asp Gly Pro Leu Asp Asn Asp Glu val Lys
 130 135 140

Asn Arg Ala His Ala Lys Arg Ile Gly Tyr Pro val Ile Ile Lys Ala
 145 150 155 160

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Arg Gly Met Arg val val Arg Ser Glu Ala
 165 170 175

Glu Leu val Asn Ala Ile Ser Met Thr Arg Ala Glu Ala Lys Ala Ala
 180 185 190

Phe Asn Asn Asp Met val Tyr Met Glu Lys Tyr Leu Glu Asn Pro Arg
 195 200 205

His val Glu val Gln val Leu Ala Asp Gly Gln Gly Ser Ala Ile His
 210 215 220

Leu Gly Glu Arg Asp Cys Ser Met Gln Arg Arg His Gln Lys val val
 225 230 235 240

Glu Glu Ala Pro Ala Pro Gly Ile Thr Glu Glu Met Arg Lys Tyr Ile
 245 250 255

5

Gly Glu Arg Cys Thr Arg Ala Cys Ile Glu Ile Gly Tyr Arg Gly Ala
 260 265 270

Gly Thr Phe Glu Phe Leu Tyr Glu Asn Gly Glu Phe Tyr Phe Ile Glu
 275 280 285

Met Asn Thr Arg Ile Gln Val Glu His Pro Val Thr Glu Met Val Thr
 290 295 300

Gly Val Asp Leu Ile Lys Glu Gln Leu Arg Ile Ala Ala Gly Gln Pro
 305 310 315 320

Leu Ser Phe Thr Gln Asp Asp Ile Lys Ile Arg Gly His Ala Met Glu
 325 330 335

Cys Arg Ile Asn Ala Glu Asp Pro Glu Arg Phe Leu Pro Cys Pro Gly
 340 345 350

Lys Ile Thr Arg Phe His Ser Pro Gly Gly Met Gly Val Arg Trp Glu
 355 360 365

Ser His Ile Tyr Ser Gly Tyr Thr Val Pro Ala Tyr Tyr Asp Ser Met
 370 375 380

Ile Gly Lys Leu Ile Thr Phe Gly Glu Asn Arg Asp Val Ala Ile Ala
 385 390 395 400

Arg Met Arg Asn Ala Leu Asp Glu Met Ile Val Glu Gly Ile Lys Thr
 405 410 415

Asn Ile Pro Leu Gln Gln Val Ile Met Lys Asp Glu Asn Phe Gln His
 420 425 430

Gly Gly Thr Asn Ile His Tyr Leu Glu Lys Lys Leu Gly Leu Gln
 435 440 445

<210> 19
 <211> 308
 <212> PRT
 <213> *Vibrio furnisii*

5

<400> 19
 Met Ser Trp Leu Glu Lys Ile Leu Glu Lys Ser Asn Ile Gly Ser Ser
 1 5 10 15

Arg Lys Ala Ser Ile Pro Glu Gly Val Trp Thr Lys Cys Thr Ser Cys
 20 25 30

Glu Gln Val Leu Tyr Tyr Ala Glu Leu Glu Arg Asn Leu Glu Val Cys
 35 40 45

Pro Lys Cys Asn His His Met Arg Met Lys Ala Arg Arg Arg Leu Glu
 50 55 60

Thr Phe Leu Asp Glu Ala Asn Arg Tyr Glu Ile Ala Asp Glu Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Gln Asp Lys Leu Lys Phe Lys Asp Ser Lys Arg Tyr Lys Glu Arg
85 90 95

Leu Ala Thr Ala Gln Lys Ser Ser Gly Glu Lys Asp Ala Leu Ile Val
100 105 110

Met Lys Gly Glu Leu Met Thr Ile Pro Val Val Ala Cys Ala Phe Glu
115 120 125

Phe Ser Phe Met Gly Gly Ser Met Gly Ser Val Val Gly Ala Arg Phe
130 135 140

Val Arg Ala Val Glu Ala Ala Ile Glu Ala Asn Cys Gly Leu Val Cys
145 150 155 160

Phe Ser Ala Ser Gly Gly Ala Arg Met Gln Glu Ala Leu Met Ser Leu
165 170 175

Met Gln Met Ala Lys Thr Ser Ala Ala Leu Glu Arg Leu Thr Ala Lys
180 185 190

Gly Leu Pro Phe Ile Ser Val Met Thr Asp Pro Thr Met Gly Gly Val
195 200 205

Ser Ala Ser Leu Ala Met Leu Gly Asp Ile Asn Ile Gly Glu Pro Lys
210 215 220

Ala Leu Ile Gly Phe Ala Gly Arg Arg Val Ile Glu Gln Thr Val Arg
225 230 235 240

Glu Glu Leu Pro Glu Gly Phe Gln Arg Ser Glu Phe Leu Leu Glu His
245 250 255

Gly Ala Ile Asp Met Ile Val Asp Arg Arg Glu Met Arg Gln Arg Val
260 265 270

Ala Gly Leu Leu Ala Lys Met Thr Arg Gln Glu Ser Pro Leu Val Val
275 280 285

Ser Val Asn Asp Ala Pro Asn Glu Ala Ala Tyr Ser Val Pro Glu Ala
290 295 300

Asn Lys Lys Gly
305

<210> 20

<211> 814

<212> PRT

<213> *Vibrio furnisii*

5

<400> 20

Met Asp Ile Leu Leu Ser Ile Leu Gly Phe Val Val Val Leu Ser Gly
1 5 10 15

Cys Leu Tyr His Arg Thr Ser Leu Met Thr Ala Leu Ala Ala Leu Thr
20 25 30

Val Thr Met Leu Val Leu Ser Leu Phe Gly Pro Val Gly Ile Ile Ser
 35 40 45
 Trp Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Ile Ala Val Leu Ala Val Pro Ser Ile
 50 55 60
 Arg Gln Ser Leu Ile Ser Gly Lys Thr Leu Lys Val Phe Lys Lys Val
 65 70 75 80
 Leu Pro Ala Met Ser Gln Thr Glu Lys Glu Ala Leu Asp Ala Gly Thr
 85 90 95
 Val Trp Trp Glu Ala Glu Leu Phe Lys Gly Lys Pro Asp Trp Gln Gln
 100 105 110
 Leu Ser His Ile Lys Ala Pro Thr Leu Ser Ala Glu Glu Gln Ala Phe
 115 120 125
 Leu Asp Gly Pro Val Asn Glu Val Cys Ala Met Val Asn Asp Tyr Gln
 130 135 140
 Val Thr His Glu Leu Ala Asp Leu Pro Pro Glu Val Trp Gln Tyr Leu
 145 150 155 160
 Lys Asp His Lys Phe Phe Ala Met Ile Ile Lys Lys Gln Tyr Gly Gly
 165 170 175
 Leu Glu Phe Ser Ala Tyr Ala Gln Ser Leu Val Leu Gln Lys Leu Thr
 180 185 190
 Gly Val Ser Gly Val Leu Ser Ser Thr Val Gly Val Pro Asn Ser Leu
 195 200 205
 Gly Pro Gly Glu Leu Leu Gln His Tyr Gly Thr Asp Asp Gln Lys Asp
 210 215 220
 Tyr Tyr Leu Pro Arg Leu Ala Glu Gly Lys Glu Ile Pro Cys Phe Ala
 225 230 235 240
 Leu Thr Ser Pro Glu Ala Gly Ser Asp Ala Gly Ser Ile Pro Asp Tyr
 245 250 255
 Gly Ile Val Cys Lys Asp Glu Trp Glu Gly Lys Glu Val Leu Gly Met
 260 265 270
 Arg Leu Thr Trp Asn Lys Arg Tyr Ile Thr Leu Ala Pro Val Ala Thr
 275 280 285
 Val Leu Gly Leu Ala Phe Lys Leu Arg Asp Pro Asp Gly Leu Leu Gly
 290 295 300
 Asp Gln Lys Glu Ile Gly Ile Thr Cys Ala Leu Ile Pro Thr His Leu
 305 310 315 320
 Lys Gly Val Glu Ile Gly Asn Arg His Phe Pro Leu Asn Val Pro Phe
 325 330 335

Gln Asn Gly Pro Thr Arg Ala Asn Asp Leu Phe Val Pro Leu Asp Phe
 340 345 350
 Ile Ile Gly Gly Pro Ser Met Ala Gly Gln Gly Trp Arg Met Leu Val
 355 360 365
 Glu Cys Leu Ser Val Gly Arg Gly Ile Thr Leu Pro Ser Asn Ser Thr
 370 375 380
 Gly Gly Ile Lys Ala Ala Ala Met Ala Thr Gly Ala Tyr Ala Arg Ile
 385 390 395 400
 Arg Arg Gln Phe Lys Gln Pro Ile Gly His Met Glu Gly Ile Glu Glu
 405 410 415
 Pro Leu Ala Arg Leu Ala Gly Asn Ala Tyr Val Met Asp Ala Ala Ser
 420 425 430
 Asn Leu Thr Val Ala Gly Ile Asp Ala Gly Glu Lys Pro Ser Val Ile
 435 440 445
 Ser Ala Ile Val Lys Tyr His Cys Thr His Arg Gly Gln Arg Ser Ile
 450 455 460
 Ile Asp Ala Met Asp Ile Val Gly Gly Lys Gly Ile Cys Leu Gly Pro
 465 470 475 480
 Ser Asn Phe Leu Ala Arg Gly Tyr Gln Gly Ser Pro Ile Ala Ile Thr
 485 490 495
 Val Glu Gly Ala Asn Ile Leu Thr Arg Ser Met Ile Ile Phe Gly Gln
 500 505 510
 Gly Ala Ile Arg Cys His Pro Tyr Val Leu Lys Glu Met Glu Ala Ala
 515 520 525
 Tyr Ser Asp Ser Ala Asn Ala Val Glu Gln Phe Asp Ala Ala Leu Ala
 530 535 540
 Gly His Val Ser Phe Thr Met Ser Asn Leu Val Arg Cys Ile Trp Phe
 545 550 555 560
 Gly Leu Thr Asp Gly Leu Gly Ser Ala Ala Pro Thr Lys Asp Ala Thr
 565 570 575
 Lys Arg Tyr Tyr Gln Gln Leu Asn Arg Tyr Ser Ala Asn Leu Ala Leu
 580 585 590
 Leu Ala Asp Ile Ser Met Ala Val Leu Gly Gly Ser Leu Lys Arg Lys
 595 600 605
 Glu Arg Leu Ser Ala Arg Leu Gly Asp Ile Leu Ser Gln Leu Tyr Leu
 610 615 620
 Ser Ser Ala Thr Leu Lys Arg Phe Glu Asn Asp Gly Arg Pro Ala Glu
 625 630 635 640

Asp Leu Ala Leu Val His Trp Gly Leu Gln Asp Ser Leu Lys Gln Thr
 645 650 655
 Glu Val Ala Ile Asp Glu Phe Leu Ala Asn Phe Pro Asn Lys Val Ile
 660 665 670
 Gly Lys Ala Leu Arg Val Leu Ile Met Pro Phe Gly Arg Val Arg Lys
 675 680 685
 Ala Pro Asn Asp Lys Leu Asp Ser Lys Val Ala Gln Ile Ile Gln Thr
 690 695 700
 Pro Ser Ala Thr Arg Ser Arg Ile Gly Arg His Gln Tyr Leu Glu Pro
 705 710 715 720
 Thr Ala His Asn Ala Val Gly Lys Ile Glu Leu Ala Leu Asn Val Ile
 725 730 735
 Leu Gln Ala Glu Pro Val Phe Asp Lys Val Cys Lys Ala Leu Asn Glu
 740 745 750
 Arg Arg Pro Phe Thr Gln Leu Asp Gln Val Ala Gln Cys Gly Leu Glu
 755 760 765
 Gln Lys Leu Ile Thr Glu Gln Glu Ala Glu Leu Leu Ile Glu Ala Glu
 770 775 780
 Gln His Arg Leu Tyr Thr Ile Asn Val Asp Asp Phe Ala Pro Gln Glu
 785 790 795 800
 Leu Ala Ala Lys Lys Ser Gln Pro Lys Leu Val Glu Val Ala
 805 810

<210> 21
 <211> 807
 <212> PRT
 <213> *Vibrio furnisii*

5

<400> 21
 Met Ser Ser Gly His Ser Phe Ser Arg Ser Leu Leu Lys Leu Pro Leu
 1 5 10 15
 Ser Val Leu Val Lys Gly Thr Val Ile Pro Ser Asn Pro Ile Asp Asp
 20 25 30
 Leu Glu Ile Asp Ile Asn Lys Pro Ile Val Tyr Ala Leu Pro Phe Arg
 35 40 45
 Ser Asn Val Asp Leu Leu Thr Leu Gln Thr His Ala Leu Gln Ala Gly
 50 55 60
 Leu Pro Asp Pro Leu Glu Pro Leu Thr Ile His Ser His Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Arg Tyr Val Phe Ile Ser Ser Arg Pro Thr Leu Leu Gln Asp Asp Asn
 85 90 95

Gln Val Pro Thr Asp Ser Ile Ala Thr Phe Ser Glu Met Leu Ser Leu
 100 105 110
 His Gln Glu Asp Ser Glu Leu Asp Val Gln Val Ile Pro Ala Thr Val
 115 120 125
 Leu Trp Gly Arg Lys Pro Gly Lys Glu Gly Arg Glu Arg Pro Tyr Leu
 130 135 140
 Gln Ala Leu Asn Gly Pro Gln Lys Ala Lys Ala Val Phe Ala Ala Gly
 145 150 155 160
 Arg Asp Cys Leu Val Arg Phe Ser Pro Val Val Ser Leu Arg Tyr Met
 165 170 175
 Ala Asp Ser His Gly Thr Asp Ala Ser Ile Ala His Lys Leu Ala Arg
 180 185 190
 Val Ala Arg Ile His Phe Ser Arg Gln Lys Leu Ala Ala Ser Gly Pro
 195 200 205
 Asn Leu Pro Gln Arg His Gln Leu Phe Gln Arg Leu Met Asn Ser Pro
 210 215 220
 Ala Ile Glu Lys Ala Ile Ala Asp Glu Ala Ala Ala Lys Asn Ile Ser
 225 230 235 240
 Leu Glu Lys Ala Arg Lys Glu Ala His Asp Met Leu Asp Glu Ile Ala
 245 250 255
 Ala Asp Phe Ser Tyr Ser Leu Val Arg Lys Gly Asp Arg Ile Leu Gly
 260 265 270
 Trp Leu Trp Asn Arg Ile Tyr Gln Gly Leu Asn Ile Asn Asn Ala Ala
 275 280 285
 Thr Val Arg Arg Leu Ala Gln Asp Gly His Glu Ile Val Tyr Val Pro
 290 295 300
 Cys His Arg Ser His Met Asp Tyr Leu Leu Leu Ser Tyr Val Leu Tyr
 305 310 315 320
 His Glu Gly Met Val Pro Pro His Ile Ala Ala Gly Ile Asn Leu Asn
 325 330 335
 Phe Phe Pro Ala Gly Pro Ile Phe Arg Arg Gly Gly Ala Phe Phe Ile
 340 345 350
 Arg Arg Ser Phe Lys Gly Asn Lys Leu Tyr Ser Thr Ile Phe Arg Glu
 355 360 365
 Tyr Leu Ala Glu Leu Phe Ala Lys Gly Tyr Ser Val Glu Tyr Phe Ser
 370 375 380
 Glu Gly Gly Arg Ser Arg Thr Gly Arg Leu Leu Gln Ala Lys Thr Gly

Asn Gln Ala Gln Thr Gln Val Leu Met Leu Leu Gly Arg Thr Ile Ser
690 695 700

Glu Thr Leu Gln Arg Tyr Ala Ile Thr Leu Asn Leu Leu Val Ala Asn
705 710 715 720

Pro Glu Leu Gly Lys Ser Asp Leu Glu Ser Lys Ser Gln Glu Ile Ala
725 730 735

Gln Arg Leu Gly Arg Leu His Gly Ile Asn Ala Pro Glu Phe Phe Asp
740 745 750

Lys Gly Val Phe Ser Ser Met Phe Val Thr Leu Lys Gln Gln Gly Tyr
755 760 765

Leu Asp Ser Asp Gly Asn Cys His Leu Asp Gln Thr Lys His Phe Ser
770 775 780

Arg Met Leu Tyr Thr Met Leu Tyr Pro Glu Val Arg Leu Thr Ile Gln
785 790 795 800

Glu Ser Ile Cys Gln Val Glu
805

- <210> 22
- <211> 886
- <212> PRT
- <213> *Vibrio furnisii*

5

<400> 22
Met Ser Asp Met Lys His Asp Val Asp Ala Leu Glu Thr Gln Glu Trp
1 5 10 15

Leu Ala Ala Leu Glu Ser Val Val Arg Glu Glu Gly Val Glu Arg Ala
20 25 30

Gln Tyr Leu Leu Glu Glu Val Leu Glu Lys Ala Arg Leu Asp Gly Val
35 40 45

Asp Met Pro Thr Gly Ile Thr Thr Asn Tyr Ile Asn Thr Ile Pro Ala
50 55 60

Ala Gln Glu Pro Ala Tyr Pro Gly Asp Thr Thr Ile Glu Arg Arg Ile
65 70 75 80

Arg Ser Ile Ile Arg Trp Asn Ala Ile Met Ile Val Leu Arg Ala Ser
85 90 95

Lys Lys Asp Leu Asp Leu Gly Gly His Met Ala Ser Phe Gln Ser Ser
100 105 110

Ala Ala Phe Tyr Glu Thr Cys Phe Asn His Phe Phe Arg Ala Pro Asn
115 120 125

Glu Lys Asp Gly Gly Asp Leu Val Tyr Tyr Gln Gly His Ile Ser Pro
130 135 140

Gly Ile Tyr Ala Arg Ala Phe Val Glu Gly Arg Leu Thr Glu Glu Gln
 145 150 155 160
 Leu Asp Asn Phe Arg Gln Glu Val Asp Gly Lys Gly Ile Pro Ser Tyr
 165 170 175
 Pro His Pro Lys Leu Met Pro Glu Phe Trp Gln Phe Pro Thr Val Ser
 180 185 190
 Met Gly Leu Gly Pro Ile Ala Ser Ile Tyr Gln Ala Arg Phe Leu Lys
 195 200 205
 Tyr Leu Glu Gly Arg Gly Met Lys Asp Thr Ala Glu Gln Arg Val Tyr
 210 215 220
 Ala Phe Leu Gly Asp Gly Glu Met Asp Glu Pro Glu Ser Arg Gly Ala
 225 230 235 240
 Ile Ser Phe Ala Ala Arg Glu Lys Leu Asp Asn Leu Cys Phe Leu Ile
 245 250 255
 Asn Cys Asn Leu Gln Arg Leu Asp Gly Pro Val Met Gly Asn Gly Lys
 260 265 270
 Ile Ile Gln Glu Leu Glu Gly Leu Phe Lys Gly Ala Gly Trp Asn Val
 275 280 285
 Val Lys Val Ile Trp Gly Asn Asn Trp Asp Ser Leu Leu Ala Lys Asp
 290 295 300
 Thr Ser Gly Lys Leu Leu Gln Leu Met Asn Glu Thr Ile Asp Gly Asp
 305 310 315 320
 Tyr Gln Thr Phe Lys Ala Lys Asp Gly Ala Tyr Val Arg Glu His Phe
 325 330 335
 Phe Gly Lys Tyr Pro Glu Thr Ala Ala Leu Val Ala Asp Met Thr Asp
 340 345 350
 Asp Glu Val Phe Ala Leu Lys Arg Gly Gly His Glu Ser Ser Lys Leu
 355 360 365
 Tyr Ala Ala Phe Lys Asn Ala Gln Asp Thr Lys Gly Arg Pro Thr Val
 370 375 380
 Ile Leu Ala Lys Thr Val Lys Gly Tyr Gly Met Gly Asp Ala Ala Gln
 385 390 395 400
 Gly Lys Asn Ile Ala His Gln Val Lys Lys Met Asp Met Thr His Val
 405 410 415
 Ile Ala Met Arg Asn Arg Leu Gly Leu Gln Asp Ile Ile Ser Asp Glu
 420 425 430
 Glu Val Asn Asn Leu Pro Tyr Leu Lys Leu Glu Glu Gly Ser Lys Glu
 435 440 445

phe Glu Tyr Leu His Ala Arg Arg Lys Ala Leu His Gly Tyr Thr Pro
 450 455 460

Gln Arg Leu Pro Lys Phe Thr Gln Glu Leu Val Ile Pro Glu Leu Glu
 465 470 475 480

Glu Phe Lys Pro Leu Leu Glu Glu Gln Lys Arg Glu Ile Ser Ser Thr
 485 490 495

Met Ala Tyr Val Arg Ala Leu Asn Ile Leu Leu Lys Asp Lys Asn Ile
 500 505 510

Gly Lys Asn Ile Val Pro Ile Ile Ala Asp Glu Ala Arg Thr Phe Gly
 515 520 525

Met Glu Gly Leu Phe Arg Gln Ile Gly Ile Tyr Asn Pro His Gly Gln
 530 535 540

Thr Tyr Thr Pro Glu Asp Arg Gly Val Val Ser Tyr Tyr Lys Glu Asp
 545 550 555 560

Thr Ala Gly Gln Val Leu Gln Glu Gly Ile Asn Glu Leu Gly Ala Met
 565 570 575

Ser Ser Trp Val Ala Ala Ala Thr Ser Tyr Ser Thr Asn Asn Leu Pro
 580 585 590

Met Ile Pro Phe Tyr Ile Tyr Tyr Ser Met Phe Gly Phe Gln Arg Val
 595 600 605

Gly Asp Met Ala Trp Met Ala Gly Asp Gln Gln Ala Arg Gly Phe Leu
 610 615 620

Leu Gly Ala Thr Ala Gly Arg Thr Thr Leu Asn Gly Glu Gly Leu Gln
 625 630 635 640

His Glu Asp Gly His Ser His Ile Gln Ala Ala Thr Ile Pro Asn Cys
 645 650 655

Ile Ser Tyr Asp Pro Thr Phe Ala Tyr Glu Val Ala Val Ile Met Gln
 660 665 670

Asp Gly Ile Arg Arg Met Tyr Gly Asp Gln Glu Asn Val Phe Tyr Tyr
 675 680 685

Met Thr Leu Met Asn Glu Asn Tyr Ala His Pro Ala Met Pro Glu Gly
 690 695 700

Ala Glu Glu Gly Ile Arg Lys Gly Ile Tyr Lys Leu Glu Thr Leu Ser
 705 710 715 720

Gly Ser Lys Gly Lys Val Gln Leu Met Ser Ser Gly Thr Ile Met Asn
 725 730 735

Glu Val Arg Lys Ala Ala Val Ile Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Ile Ala
 740 745 750

Ser Asp Val Tyr Ser Val Thr Ser Phe Asn Glu Leu Ala Arg Asp Gly
 755 760 765

Gln Asn Val Glu Arg Tyr Asn Met Leu His Pro Glu Ala Glu Ala Gln
 770 775 780

Val Pro Tyr Ile Ala Ser Val Met Gly Thr Glu Pro Ala Ile Ala Ala
 785 790 795 800

Thr Asp Tyr Met Lys Asn Tyr Ala Asp Gln Val Arg Ala Phe Ile Pro
 805 810 815

Ala Glu Ser Tyr Lys Val Leu Gly Thr Asp Gly Phe Gly Arg Ser Asp
 820 825 830

Ser Arg Glu Asn Leu Arg Arg His Phe Glu Val Asn Ala Gly Tyr Val
 835 840 845

Val Val Ala Ala Leu Asn Glu Leu Ala Lys Arg Gly Glu Val Glu Lys
 850 855 860

Ser Val Val Ala Glu Ala Ile Lys Lys Phe Asp Ile Asp Thr Glu Lys
 865 870 875 880

Thr Asn Pro Leu Tyr Ala
 885

<210> 23
 <211> 630
 <212> PRT
 <213> *Vibrio furnisii*

5

<400> 23
 Met Ala Ile Glu Ile Tyr Val Pro Asp Ile Gly Ala Asp Glu Val Glu
 1 5 10 15

Val Thr Glu Ile Leu Val Ser Val Gly Asp Lys Val Glu Glu Glu Gln
 20 25 30

Ser Leu Ile Thr Val Glu Gly Asp Lys Ala Ser Met Glu Val Pro Ala
 35 40 45

Ser Gln Ala Gly Ile Val Lys Glu Ile Lys Val Val Thr Gly Asp Lys
 50 55 60

Val Thr Thr Gly Ser Leu Ile Met Val Phe Glu Ala Glu Gly Ala Ala
 65 70 75 80

Ala Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ala Glu Ala Ala Pro Val Ala Ala Ala
 85 90 95

Pro Ala Ala Val Glu Leu Lys Glu Val Asn Val Pro Asp Ile Gly Gly
 100 105 110

Asp Glu Val Glu Val Thr Glu Ile Met Val Ala Val Gly Asp Thr Val
 115 120 125

ser Glu Glu Gln ser Leu Ile Thr val Glu Gly Asp Lys Ala Ser Met
 130 135 140

Glu Val Pro Ala Pro Phe Ala Gly Thr Val Lys Glu Ile Lys Ile Ala
 145 150 155 160

ser Gly Asp Lys Val Thr Thr Gly Ser Leu Ile Met Val Phe Glu Val
 165 170 175

Ala Gly Ser Gly Ala Pro Ala Ala Ala Ala Pro Ala Gln Ala Ala Ala
 180 185 190

Pro Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala Ala Asp Lys Glu Val Asn Val Pro
 195 200 205

Asp Ile Gly Gly Asp Glu Val Glu Val Thr Glu Ile Met Val Ala Val
 210 215 220

Gly Asp Met Val Ser Glu Glu Gln Ser Leu Ile Thr Val Glu Gly Asp
 225 230 235 240

Lys Ala Ser Met Glu Val Pro Ala Pro Phe Ala Gly Lys Val Lys Ala
 245 250 255

Ile Lys Val Ala Ala Gly Asp Lys Val Ser Thr Gly Ser Leu Ile Met
 260 265 270

Val Phe Glu Val Ala Gly Ala Ala Pro Ala Ala Val Ser Ala Pro Ala
 275 280 285

Gln Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Pro Lys Ala Glu Ala Pro Ala
 290 295 300

Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Thr Gly Asp Phe Gln Glu Asn Asn Glu
 305 310 315 320

Tyr Ala His Ala Ser Pro Val Val Arg Arg Leu Ala Arg Glu Phe Gly
 325 330 335

Val Asn Leu Ser Lys Val Lys Gly Ser Gly Arg Lys Ser Arg Ile Leu
 340 345 350

Lys Glu Asp Val Gln Asn Tyr Val Lys Glu Ala Leu Lys Arg Leu Glu
 355 360 365

Ser Gly Ala Ala Ser Ala Ala Ser Gly Lys Gly Asp Gly Ala Ala Leu
 370 375 380

Gly Leu Leu Pro Trp Pro Lys Val Asp Phe Ser Lys Phe Gly Asp Thr
 385 390 395 400

Glu Ile Gln Pro Leu Ser Arg Ile Lys Lys Ile Ser Gly Ala Asn Leu
 405 410 415

His Arg Asn Trp Val Met Ile Pro His Val Thr Gln Trp Asp Asn Ala

50 55 60

Met Ala Gly Ile Asp Lys Asn Asp Ile Asp Leu Ile Ile Leu Ala Thr
65 70 75 80

Thr Ser Ser Ser His Thr Phe Pro Ser Ser Ala Cys Gln Val Gln Ala
85 90 95

Lys Leu Gly Ile Lys Gly Cys Pro Ala Phe Asp Leu Ala Ala Ala Cys
100 105 110

ser Gly phe Ile Tyr Gly Leu Ser Val Ala Asp Gln His Ile Lys ser
115 120 125

Gly Met Cys Lys Asn Val Leu Val Ile Gly Ala Asp Ala Leu Ser Lys
130 135 140

Thr Cys Asp Pro Thr Asp Arg Ser Thr Ile Ile Leu Phe Gly Asp Gly
145 150 155 160

Ala Gly Ala val val val Gly Ala Ser Glu Glu Pro Gly Ile Leu Ser
165 170 175

Thr His Val Tyr Ala Asp Gly Gln Phe Gly Asp Leu Leu Ser Leu Glu
180 185 190

val Pro Glu Arg Gly Gly Asp Val Asp Lys Trp Leu Tyr Met Ala Gly
195 200 205

Asn Glu val phe Lys val Ala val Thr Gln Leu Ser Lys Leu val Lys
210 215 220

Asp Thr Leu Ala Ala Asn Asn Met His Lys Ser Glu Leu Asp Trp Leu
225 230 235 240

val Pro His Gln Ala Asn Tyr Arg Ile Ile Ser Ala Thr Ala Lys Lys
245 250 255

Leu Ser Met Ser Leu Asp Gln val val Ile Thr Leu Asp Arg His Gly
260 265 270

Asn Thr Ser Ala Ala Thr val pro Thr Ala Leu Asp Glu Ala val Arg
275 280 285

Asp Gly Arg Ile Lys Arg Gly Gln Thr Leu Leu Leu Glu Ala Phe Gly
290 295 300

Gly Gly phe Thr Trp Gly ser Ala Leu Val Lys phe
305 310 315

<210> 25
 <211> 307
 <212> PRT
 <213> *Vibrio furnisii*

5

<400> 25
 Met Ser Lys phe Ala Ile val phe Pro Gly Gln Gly Ser Gln Ala Val

<211> 248
 <212> PRT
 <213> *Vibrio furnisii*

5

<400> 26
Met Ser Asn Phe Met Asn Leu Glu Gly Lys Ile Val Leu Val Thr Gly
1 5 10 15
Ala Ser Arg Gly Ile Gly Lys Ala Ile Ala Glu Leu Leu Val Glu Arg
20 25 30
Gly Ala Thr Val Ile Gly Thr Ala Thr Ser Glu Ser Gly Ala Asp Ala
35 40 45
Ile Ser Ala Tyr Leu Gly Asp Asn Gly Lys Gly Leu Ala Leu Asn Val
50 55 60
Thr Asp Val Ala Ser Ile Glu Ser Val Leu Lys Ser Ile Asn Asp Glu
65 70 75 80
Phe Gly Gly Val Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp
85 90 95
Asn Leu Leu Met Arg Met Lys Asp Asp Glu Trp Thr Asp Ile Leu Asp
100 105 110
Thr Asn Leu Thr Ser Ile Phe Arg Leu Ser Lys Ala Val Leu Arg Gly
115 120 125
Met Met Lys Lys Arg Gln Gly Arg Ile Ile Asn Val Gly Ser Val Val
130 135 140
Gly Thr Met Gly Asn Ala Gly Gln Thr Asn Tyr Ala Ala Ala Lys Ala
145 150 155 160
Gly Val Ile Gly Phe Thr Lys Ser Met Ala Arg Glu Val Ala Ser Arg
165 170 175
Gly Val Thr Val Asn Thr Val Ala Pro Gly Phe Ile Glu Thr Asp Met
180 185 190
Thr Lys Ala Leu Asn Asp Asp Gln Arg Ala Ala Thr Leu Ala Gln Val
195 200 205
Pro Ala Gly Arg Leu Gly Asp Pro Arg Glu Ile Ala Ser Ala Val Ala
210 215 220
Phe Leu Ala Ser Pro Glu Ala Ala Tyr Ile Thr Gly Glu Thr Leu His
225 230 235 240
Val Asn Gly Gly Met Tyr Met Val
245

10

<210> 27
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> *Vibrio furnisii*
 <400> 27

Met Ser Asn Ile Glu Glu Arg Val Lys Lys Ile Ile Val Glu Gln Leu
1 5 10 15

Gly Val Asp Glu Ala Glu Val Lys Asn Glu Ala Ser Phe Val Glu Asp
20 25 30

Leu Gly Ala Asp Ser Leu Asp Thr Val Glu Leu Val Met Ala Leu Glu
35 40 45

Glu Glu Phe Asp Thr Glu Ile Pro Asp Glu Glu Ala Glu Lys Ile Thr
50 55 60

Thr Val Gln Ala Ala Ile Asp Tyr Val Asn Ser Ala Gln
65 70 75

<210> 28

<211> 416

<212> PRT

<213> *Vibrio furnisii*

5

<400> 28

Met Ile Val Ser Lys Arg Arg Val Val Val Thr Gly Met Gly Met Leu
1 5 10 15

Ser Pro Val Gly Asn Thr Val Glu Ser Ser Trp Lys Ala Leu Leu Ala
20 25 30

Gly Gln Ser Gly Ile Val Asn Ile Glu His Phe Asp Thr Thr Asn Phe
35 40 45

Ser Thr Arg Phe Ala Gly Leu Val Lys Asp Phe Asn Cys Glu Glu Tyr
50 55 60

Met Ser Lys Lys Asp Ala Arg Lys Met Asp Leu Phe Ile Gln Tyr Gly
65 70 75 80

Ile Ala Ala Gly Ile Gln Ala Leu Asp Asp Ser Gly Leu Val Ile Thr
85 90 95

Glu Glu Asn Ala Pro Arg Val Gly Val Ala Ile Gly Ser Gly Ile Gly
100 105 110

Gly Leu Asp Leu Ile Glu Lys Gly His Gln Ala Leu Met Glu Lys Gly
115 120 125

Pro Arg Lys Val Ser Pro Phe Phe Val Pro Ser Thr Ile Val Asn Met
130 135 140

Val Ala Gly Asn Leu Ser Ile Met Arg Gly Leu Arg Gly Pro Asn Ile
145 150 155 160

Ala Ile Ser Thr Ala Cys Thr Thr Gly Leu His Asn Ile Gly His Ala

165 170 175
 Ala Arg Met Ile Ala Tyr Gly Asp Ala Glu Ala Met Val Ala Gly Gly
 180 185 190
 Ser Glu Lys Ala Ser Thr Pro Leu Gly Met Ala Gly Phe Gly Ala Ala
 195 200 205
 Lys Ala Leu Ser Thr Arg Asn Asp Glu Pro Ala Lys Ala Ser Arg Pro
 210 215 220
 Trp Asp Lys Asp Arg Asp Gly Phe Val Leu Gly Asp Gly Ala Gly Val
 225 230 235 240
 Met Val Leu Glu Gly Tyr Glu His Ala Lys Ala Arg Gly Ala Lys Ile
 245 250 255
 Tyr Ala Glu Ile Val Gly Phe Gly Met Ser Gly Asp Ala Tyr His Met
 260 265 270
 Thr Ser Pro Ser Glu Asp Gly Ser Gly Gly Ala Leu Ala Met Glu Ala
 275 280 285
 Ala Met Arg Asp Ala Ala Leu Ala Gly Thr Gln Ile Gly Tyr Val Asn
 290 295 300
 Ala His Gly Thr Ser Thr Pro Ala Gly Asp Val Ala Glu Val Lys Gly
 305 310 315 320
 Ile Lys Arg Ala Leu Gly Glu Asp Gly Ala Lys Gln Val Leu Ile Ser
 325 330 335
 Ser Thr Lys Ser Met Thr Gly His Leu Leu Gly Ala Ala Gly Ser Val
 340 345 350
 Glu Ala Ile Ile Thr Val Met Ser Leu Val Asp Gln Ile Val Pro Pro
 355 360 365
 Thr Ile Asn Leu Asp Asn Pro Glu Glu Gly Leu Gly Val Asp Leu Val
 370 375 380
 Pro His Thr Ala Arg Lys Val Glu Gly Met Glu Tyr Ala Met Cys Asn
 385 390 395 400
 Ser Phe Gly Phe Gly Gly Thr Asn Gly Ser Leu Ile Phe Lys Arg Val
 405 410 415

<210> 29
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> *Vibrio furnisii*

<400> 29
 Met Thr Asp Ser His Thr Asn Asn Ala Tyr Gly Lys Ala Ile Ala Met
 1 5 10 15

Thr Val Ile Gly Ala Gly Ser Tyr Gly Thr Ser Leu Ala Ile Ser Leu

				20					25					30	
Ala	Arg	Asn	Gly	Ala	Asn	Val	Val	Leu	Trp	Gly	His	Asp	Pro	Val	His
		35					40					45			
Met	Ala	Arg	Leu	Glu	Ala	Glu	Arg	Ala	Asn	His	Glu	Phe	Leu	Pro	Asp
	50					55					60				
Ile	Asp	Phe	Pro	Pro	Ser	Leu	Ile	Ile	Glu	Ser	Asp	Leu	Gln	Lys	Ala
65					70					75					80
Val	Gln	Ala	Ser	Arg	Asp	Leu	Leu	Val	Val	Val	Pro	Ser	His	Val	Phe
				85					90					95	
Ala	Ile	Val	Leu	Asn	Ser	Leu	Gln	Pro	Tyr	Leu	Arg	Glu	Asp	Thr	Arg
			100					105					110		
Ile	Cys	Trp	Ala	Thr	Lys	Gly	Leu	Glu	Pro	Asp	Thr	Gly	Arg	Leu	Leu
		115					120					125			
Gln	Asp	Val	Ala	His	Asp	Val	Leu	Gly	Glu	Ser	His	Pro	Leu	Ala	Val
	130					135					140				
Leu	Ser	Gly	Pro	Thr	Phe	Ala	Lys	Glu	Leu	Ala	Met	Gly	Met	Pro	Thr
145					150					155					160
Ala	Ile	Ser	Val	Ala	Ser	Pro	Asp	Ala	Gln	Phe	Val	Ala	Asp	Leu	Gln
				165					170					175	
Glu	Lys	Ile	His	Cys	Ser	Lys	Thr	Phe	Arg	Val	Tyr	Ala	Asn	Ser	Asp
			180					185					190		
Phe	Ile	Gly	Met	Gln	Leu	Gly	Gly	Ala	Val	Lys	Asn	Val	Ile	Ala	Ile
		195					200					205			
Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Asp	Gly	Ile	Gly	Phe	Gly	Ala	Asn	Ala	Arg	Thr
	210					215					220				
Ala	Leu	Ile	Thr	Arg	Gly	Leu	Ala	Glu	Met	Thr	Arg	Leu	Gly	Ala	Ala
225					230					235					240
Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Thr	Phe	Met	Gly	Met	Ala	Gly	Leu	Gly	Asp
				245					250					255	
Leu	Val	Leu	Thr	Cys	Thr	Asp	Asn	Gln	Ser	Arg	Asn	Arg	Arg	Phe	Gly
			260					265						270	
Leu	Ala	Leu	Gly	Gln	Gly	Lys	Asp	Val	Asp	Thr	Ala	Gln	Gln	Asp	Ile
		275					280					285			
Gly	Gln	Val	Val	Glu	Gly	Tyr	Arg	Asn	Thr	Lys	Glu	Val	Trp	Leu	Leu
	290					295					300				
Ala	Gln	Arg	Met	Gly	Val	Glu	Met	Pro	Ile	Val	Glu	Gln	Ile	Tyr	Gln
305					310					315					320

Val Leu Tyr Gln Gly Lys Asp Ala Arg Met Ala Ala Gln Asp Leu Leu
 325 330 335

Ala Arg Asp Lys Lys Ala Glu Arg
 340

<210> 30
 <211> 284
 <212> PRT
 <213> *Vibrio furnisii*

5

<400> 30
 Val Val Cys Ala Phe Val Asn Asp Asp Leu Ser Ala Thr Val Leu Glu
 1 5 10 15

Glu Leu Tyr Gln Gly Gly Thr Arg Leu Ile Ala Met Arg Cys Ala Gly
 20 25 30

Phe Asp Lys Val Asp Leu Asp Ala Ala Lys Arg Ile Gly Met Gln Val
 35 40 45

Val Arg Val Pro Ala Tyr Ser Pro Glu Ala Val Ala Glu His Ala Val
 50 55 60

Gly Leu Met Met Cys Leu Asn Arg Arg Tyr His Lys Ala Tyr Gln Arg
 65 70 75 80

Thr Arg Glu Ala Asn Phe Ser Leu Glu Gly Leu Val Gly Phe Asn Phe
 85 90 95

Tyr Gly Lys Thr Val Gly Val Ile Gly Ser Gly Lys Ile Gly Ile Ala
 100 105 110

Ala Met Arg Ile Leu Lys Gly Leu Gly Met Asn Ile Leu Cys Phe Asp
 115 120 125

Pro Tyr Glu Asn Pro Leu Ala Ile Glu Ile Gly Ala Lys Tyr Val Gln
 130 135 140

Leu Pro Glu Leu Tyr Ala Asn Ser Asp Ile Ile Thr Leu His Cys Pro
 145 150 155 160

Met Thr Lys Glu Asn Tyr His Leu Leu Asp Glu Gln Ala Phe Ala Gln
 165 170 175

Met Lys Asp Gly Val Met Ile Ile Asn Thr Ser Arg Gly Glu Leu Leu
 180 185 190

Asp Ser Val Ala Ala Ile Glu Ala Leu Lys Arg Gly Arg Ile Gly Ala
 195 200 205

Leu Gly Leu Asp Val Tyr Asp Asn Glu Lys Asp Leu Phe Phe Gln Asp
 210 215 220

Lys Ser Asn Asp Val Ile Val Asp Asp Val Phe Arg Arg Leu Ser Ala
 225 230 235 240

ES 2 528 482 T3

Cys His Asn Val Leu Phe Thr Gly His Gln Ala Phe Leu Thr Glu Asp
245 250 255

Ala Leu His Asn Ile Ala Gln Thr Thr Leu Asn Asn Val Leu Ala Phe
260 265 270

Glu Gln Gly Thr Lys Ser Gly Asn Glu Leu Val Asn
275 280

REIVINDICACIONES

1. Microorganismo que comprende una o más secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican para un polipéptido que comprende una éster de cera sintasa de EC 2.3.1.75, y una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que comprende una acetil-CoA carboxilasa de EC 6.4.1.2, en el que dichas secuencias de ácido nucleico se sobreexpresan.
2. Microorganismo según la reivindicación 1, en el que el microorganismo es una *E.coli*.
3. Microorganismo según la reivindicación 1, en el que el microorganismo comprende adicionalmente un derivado de ácido graso.
4. Microorganismo según la reivindicación 3, en el que el microorganismo expresa una o más secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican para una enzima seleccionada de uno o más componentes del complejo de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada de EC 1.2.4.4, Ilve de EC 2.6.1.42, lpd de EC 1.8.1.4, Ccr de EC 1.1.19, lcmA de EC 5.4.99.2, lcmB de 5.4.99.13, fabH de EC 2.3.1.180, fabF de EC 2.3.1.179, fabH3 de EC 2.3.1.180, fabC3 de registro NP_823468, beta-cetoacil-ACP sintasa II de EC 2.3.1.180, enoil-CoA reductasas de EC 1.3.1.34, enoil-CoA isomerasa de EC 4.2.1.-, y combinaciones de las mismas, en el que el derivado de ácido graso está ramificado.
5. Microorganismo según la reivindicación 3, en el que el microorganismo expresa una o más secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican para una tioesterasa de EC 3.1.2.- o EC 3.1.1.-.
6. Microorganismo según la reivindicación 3, en el que el microorganismo expresa una o más secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican para una enzima seleccionada de fabB de EC 2.3.1.41, fabK de EC 1.2.1.9, fabL de EC 1.2.1.9, fabM de EC 5.3.3.14, fadE de EC 1.3.99.3 o 1.3.99.-, y combinaciones de las mismas, en el que el derivado de ácido graso está insaturado.
7. Microorganismo según la reivindicación 1, en el que *fadE* está atenuado.
8. Microorganismo según la reivindicación 1, en el que *fadD* se sobreexpresa.
9. Microorganismo según la reivindicación 1, en el que el microorganismo está en un recipiente que comprende un caldo de fermentación que comprende al menos 10 mg/l de éster de ácido graso, o al menos 10 mg/l de cera.
10. Uso del microorganismo según la reivindicación 3, en la producción de un derivado de ácido graso que comprende de desde 1 hasta 5 dobles enlaces.
11. Uso del microorganismo según la reivindicación 3, en la producción de un derivado de ácido graso que comprende una longitud de cadena de carbono de desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 30.
12. Uso del microorganismo según la reivindicación 3, en la producción de un derivado de ácido graso que comprende de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 puntos ramificados.
13. Microorganismo según la reivindicación 1, en el que el microorganismo comprende adicionalmente un éster de ácido graso o cera que tiene un lado A aportado por un alcohol, y un lado B aportado por una acil-CoA.
14. Microorganismo según la reivindicación 13, en el que el lado A y el lado B se producen por el microorganismo.
15. Uso del microorganismo según la reivindicación 13, en la producción de un derivado de ácido graso, en el que el lado A, el lado B o tanto el lado A como el lado B de dicho derivado de ácido graso comprenden de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 dobles enlaces.
16. Uso del microorganismo según la reivindicación 13, en la producción de un derivado de ácido graso, en el que el lado A, el lado B o tanto el lado A como el lado B de dicho derivado de ácido graso comprenden una longitud de cadena de carbono de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 26.
17. Uso del microorganismo según la reivindicación 13, en la producción de un derivado de ácido graso, en el que el lado A, el lado B o tanto el lado A como el lado B de dicho derivado de ácido graso comprenden de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 puntos de ramificación.
18. Uso del microorganismo según la reivindicación 13, en la producción de un derivado de ácido graso, en el que el lado A, el lado B o tanto el lado A como el lado B de dicho derivado de ácido graso comprenden entre aproximadamente 1 y 5 restos ciclopropilo.
19. Microorganismo según la reivindicación 1, en el que el microorganismo es *Arthrobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Botryococcus braunii*, *Chromatium sp.*, *Cladosporium resina* (ATCC22711), *Clostridium pasteurianum* VKM,

- 5 *Clostridium tenanomorphum*, *Clostridium acidurici*, especies de *Corynebacterium*, especies de cianobacterias (*Nostoc muscorum*, *Anacystis (Synechococcus) nidulans*, *Phormidium luridum*, *Chlorogloea fritschii*, *Trichodesmium erythraeum*, *Oscillatoria williamsii*, *Microcoleus chthonoplasensis*, *Coccochloris elabens*, *Agmenellum quadruplicatum*, *Plectonema terebrans*, *M. vaginatus*, y *C. scopulorum*), *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC29577), *Kineococcus radiotolerans* (BAA-149), *Micrococcus luteus* (FD533, ATCC 272, 381, 382, ISU, 540, 4698, 7468, 27141), *Micrococcus sp.* (ATCC 146, 398, 401, 533), *Micrococcus roseus* (ATCC 412, 416, 516), *Micrococcus lysodeikticus*, especies de *Mycobacterium*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Trichoderma virida*, *Pullularia pullulans*, *Jeotgalicoccus sp. (M. candidans)* (ATCC 8456),
- 10 *Rhodospseudomonas spheroids Chlorobium sp.*, *Rhodospirillum rubrum* (ATCC 11170), *Rhodomicrobium vannielii*, *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 13637, 17444, 17445, 17666, 17668, 17673, 17674, 17679, 17677), *Saccharomyces ludwigii* (ATCC 22711), *Saccharomyces sp. (oviformus, ludwigii, tropicalis)*, *Vibrio furnissii* M1, *Vibrio marinus* MP-1, *Vibrio ponticus*, *Serratia marinorubra*, *Ustilago maydis*, *Ustilago nuda*, *Urocystis agropyri*, *Sphacelotheca reiliana* o *Tilletia sp. (foetida, caries, controversa)*.
- 15 20. Método de producción de un éster de ácido graso que comprende cultivar el microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-19 en condiciones suficientes para producir un éster de ácido graso; y separar el éster de ácido graso.
21. Método según la reivindicación 20, en el que el éster de ácido graso es un éster de cera.
22. Microorganismo según la reivindicación 19, en el que el microorganismo expresa adicionalmente una enzima seleccionada de una alcohol acetiltransferasa de EC 2.3.1.84, una alcohol deshidrogenasa de EC 1.1.1.1 y una acil-CoA reductasa que forma alcohol graso de EC 1.1.1.*.
- 20 23. Microorganismo según la reivindicación 19, en el que el microorganismo expresa una o más secuencias de ácido nucleico que codifican para una enzima seleccionada de uno o más componentes del complejo de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada de EC 1.2.4.4, *Iive* de EC 2.6.1.42, *lpd* de EC 1.8.1.4, *ccr* de EC 1.1.19, *lcmA* de EC 5.4.99.2, *lcmB* de EC 5.4.99.13, *fabH* de EC 2.3.1.180, ACP de registro NP_626635, *fabF* de EC 2.3.1.179, *fabH3* de EC 2.3.1.180, *fabC3* de registro NP_823468, beta-cetoacil-ACP sintasa II de EC 2.3.1.180, enoil-CoA reductasa de EC 1.3.1.34, enoil-CoA isomerasa de EC 4.2.1.-, y combinaciones de las mismas, en el que el derivado de ácido graso está ramificado.
- 25 24. Microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 y 22-23, en el que el microorganismo expresa una o más secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican para una tioesterasa de EC 3.1.2.- o EC 3.1.1.-.
- 30 25. Método según la reivindicación 20 ó 21, que comprende además permitir que el derivado de ácido graso se separe en una fase orgánica; y purificar el derivado de ácido graso de la fase orgánica.

FIG. 1

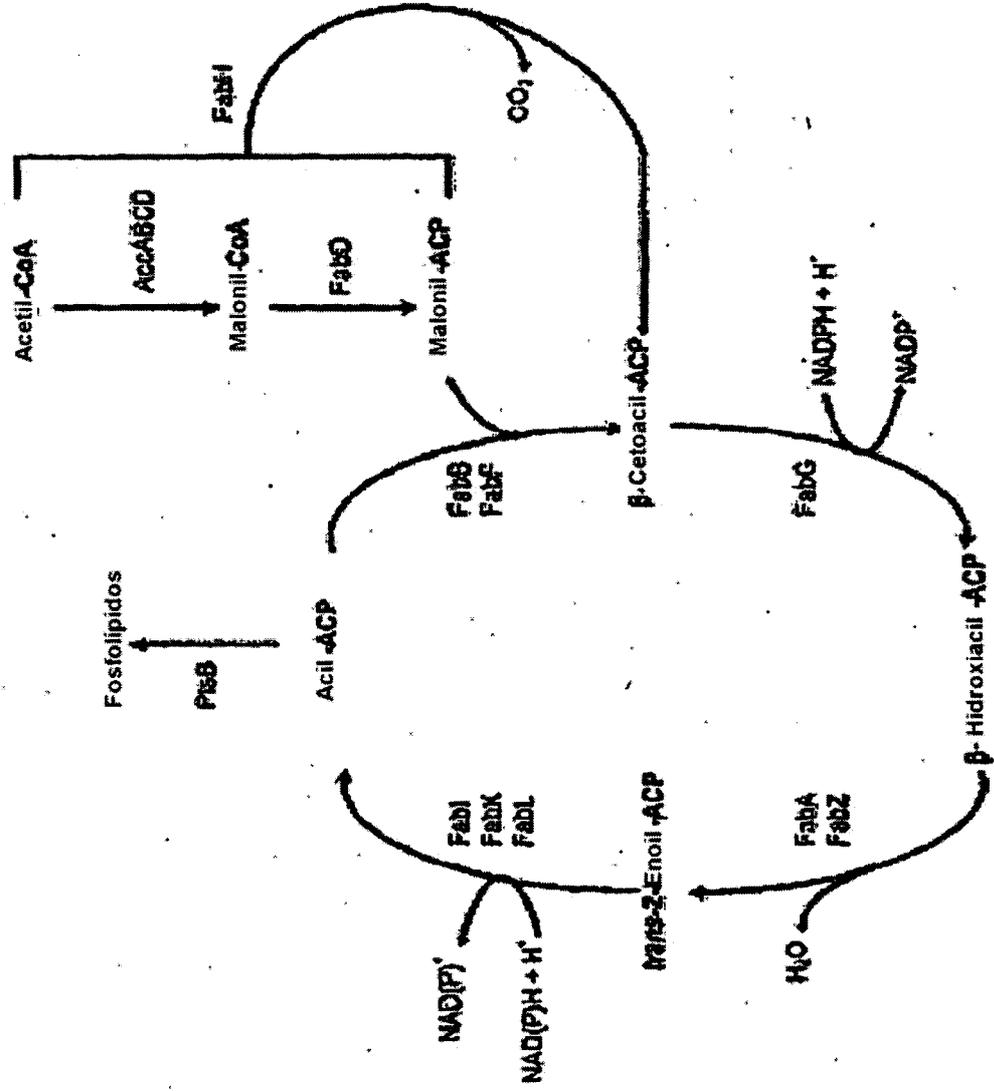
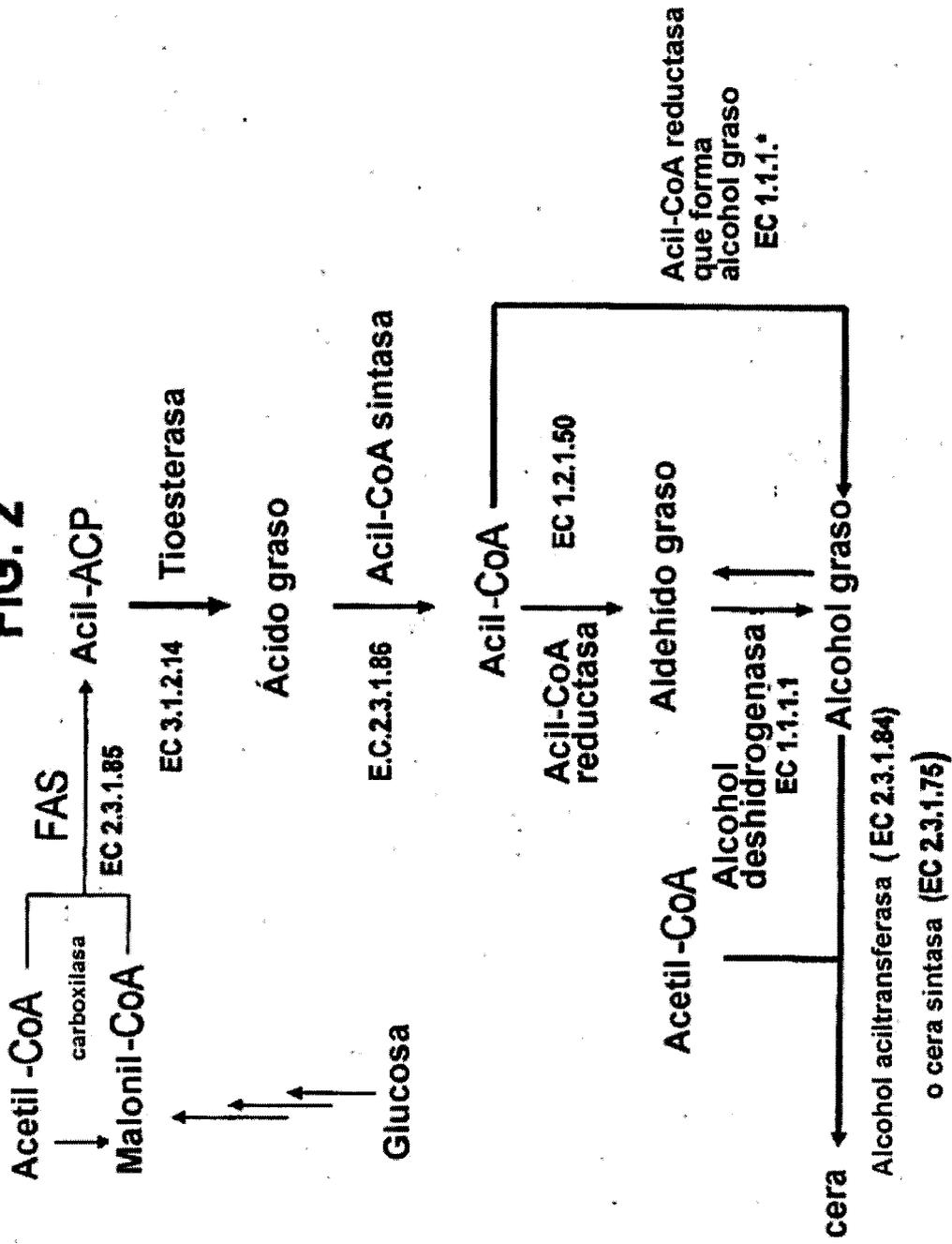


FIG. 2



Referencias de acil-CoA reductasa que forma alcohol graso:
 Kalscheurer 2006; Metz 2000; Cheng 2004a

FIG. 3

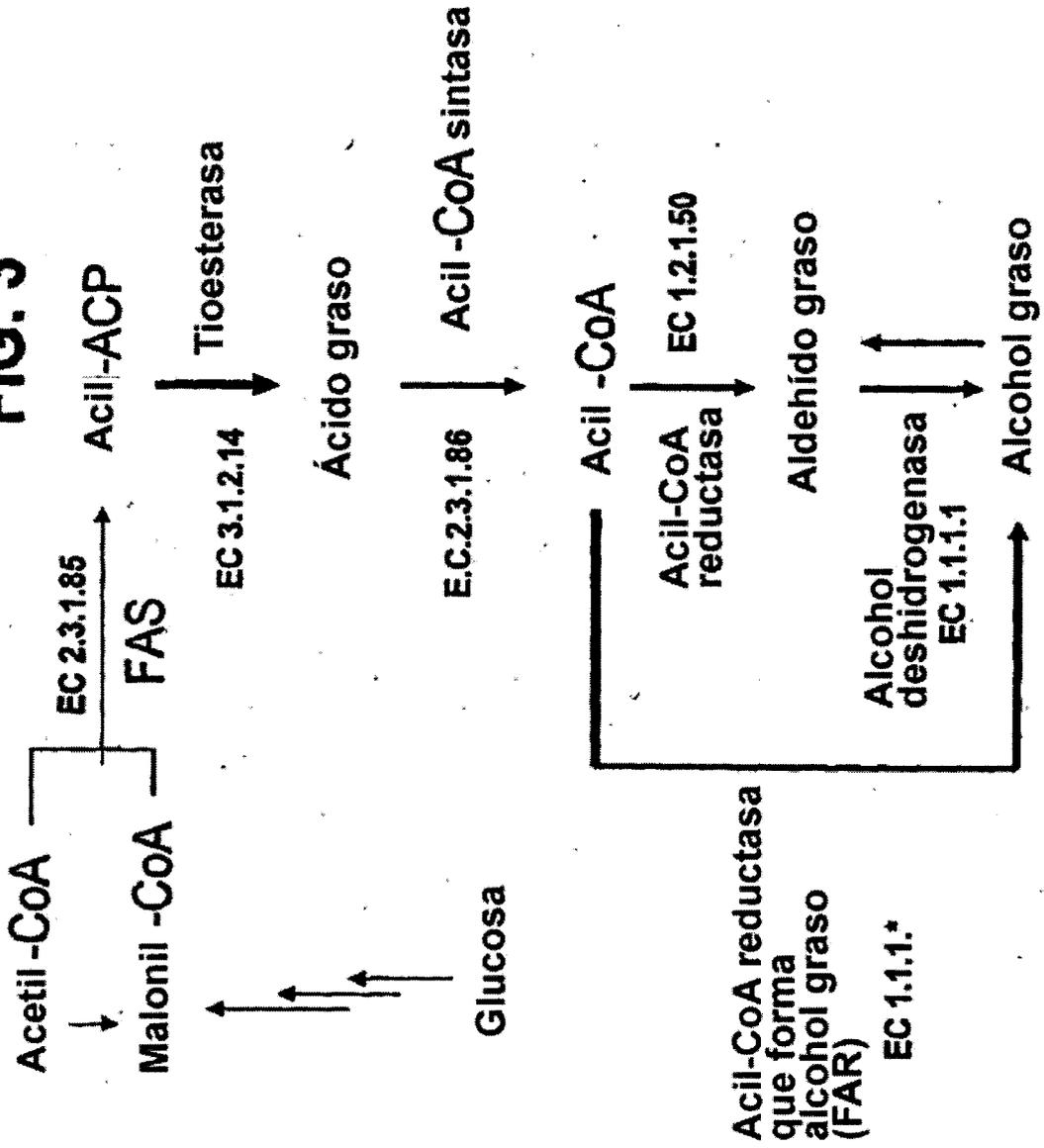


FIG. 4

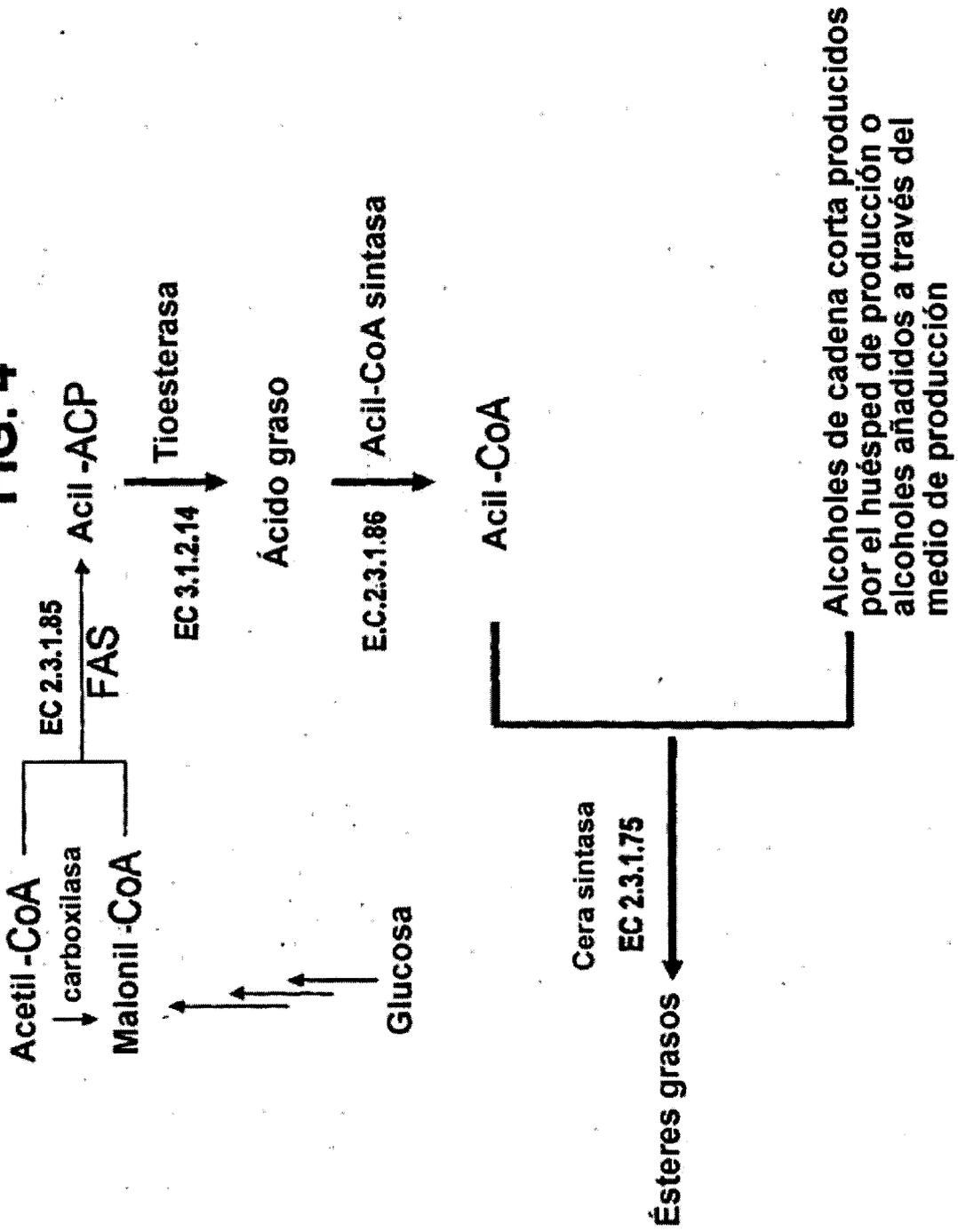


FIG. 5

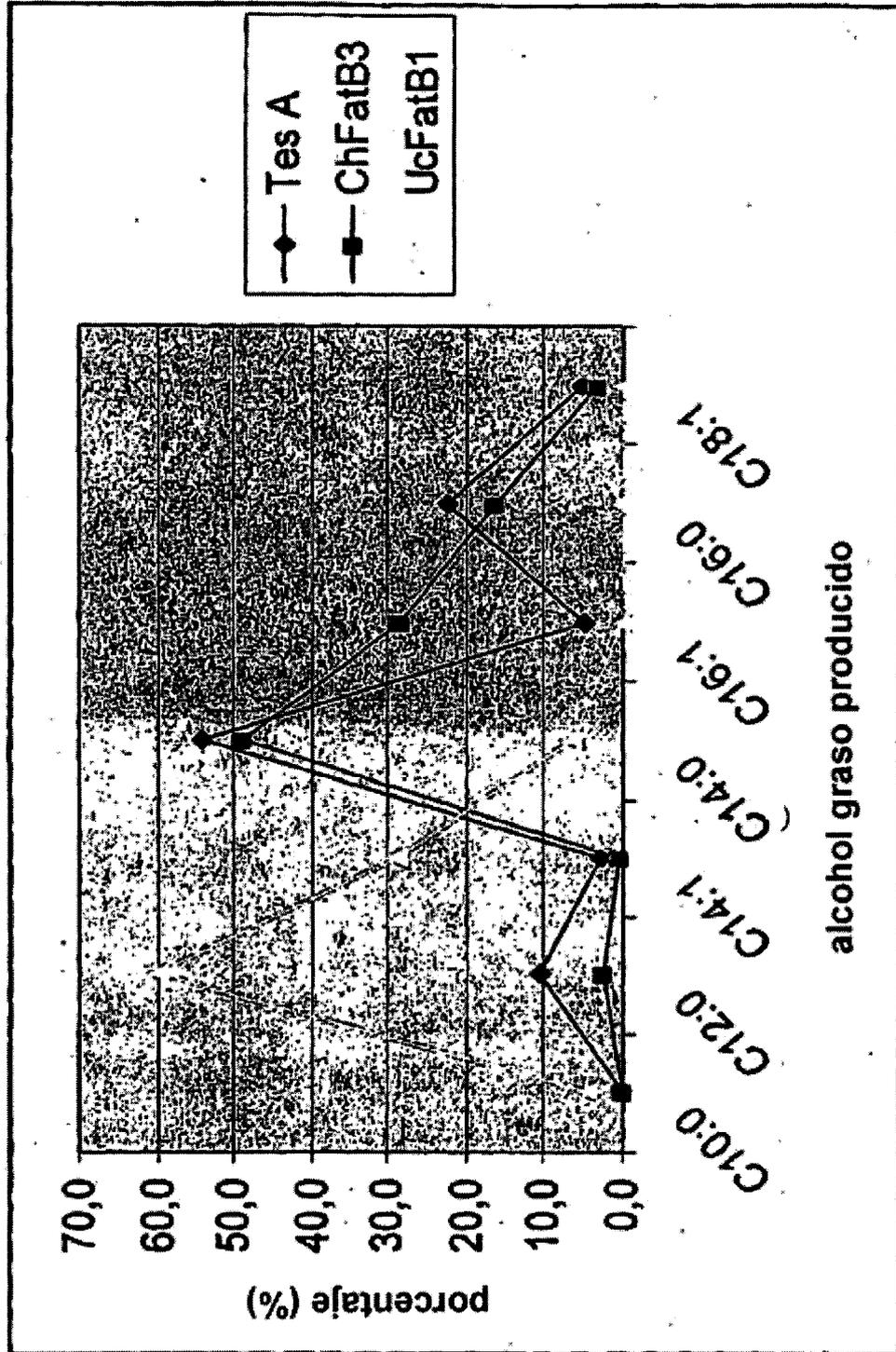
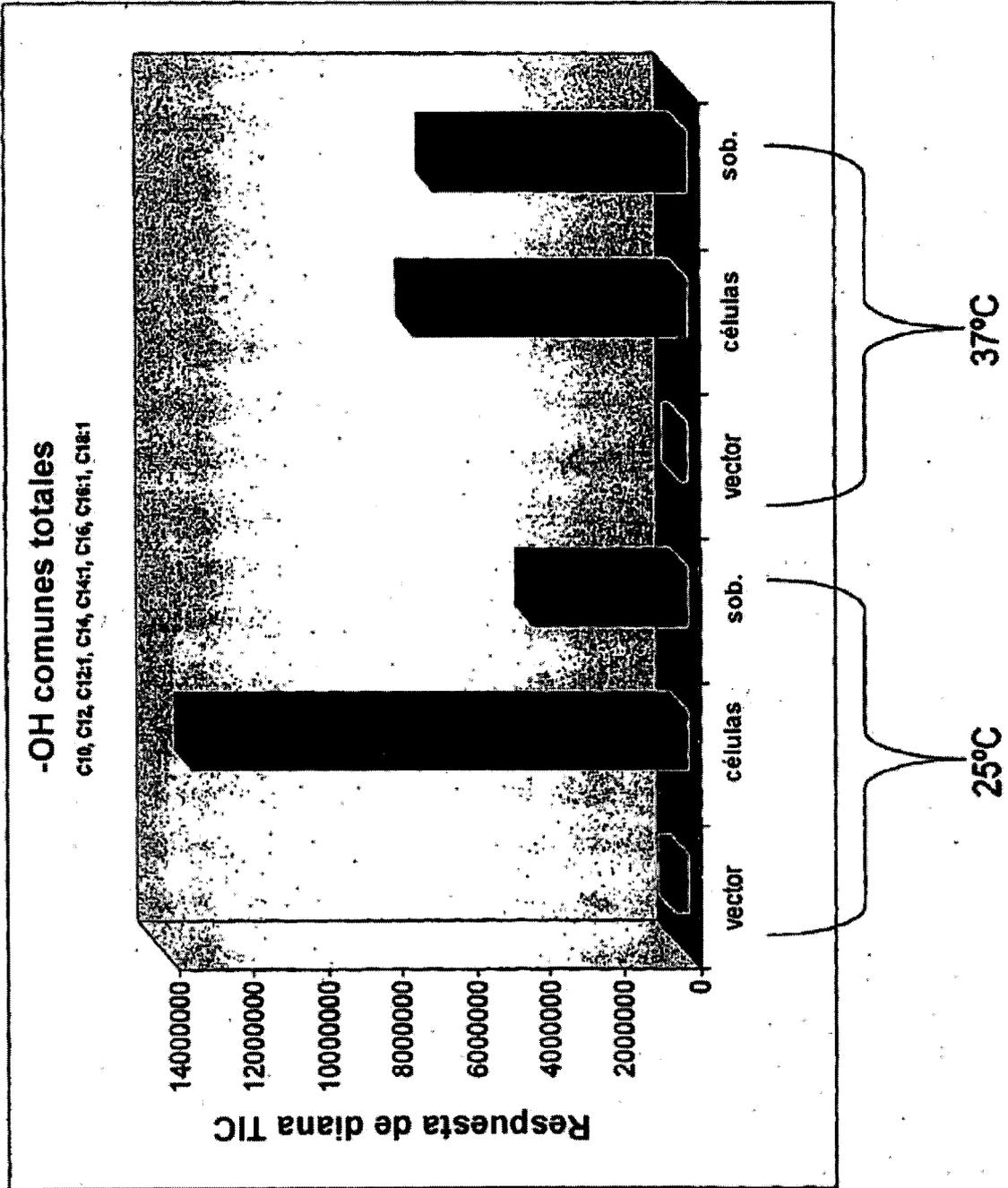


FIG. 6



FIGS. 7A-7D

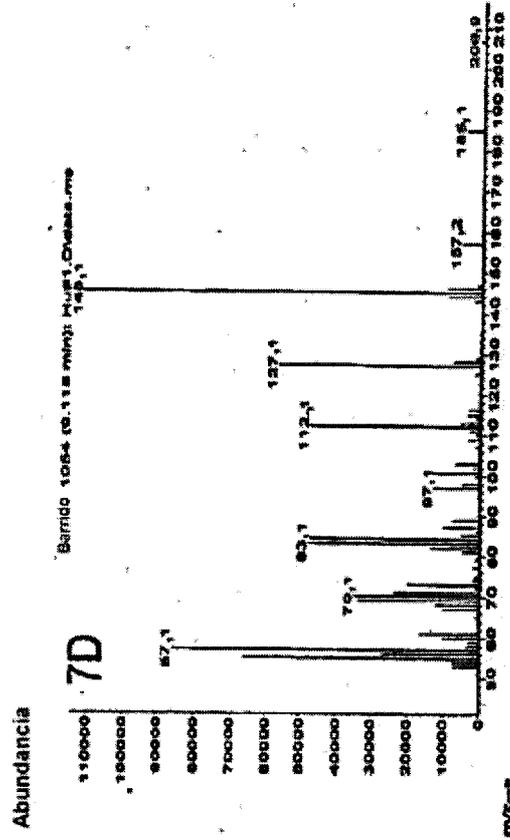
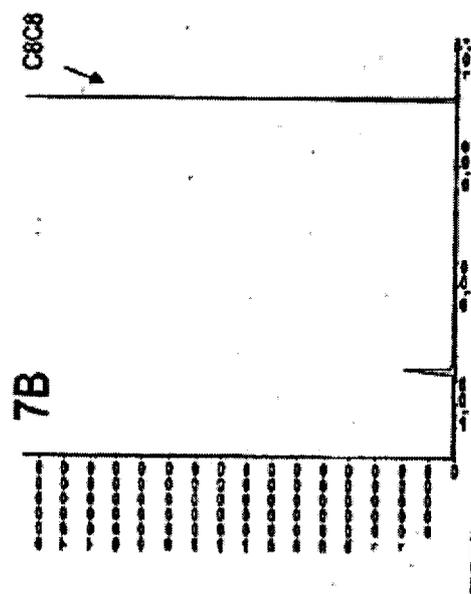
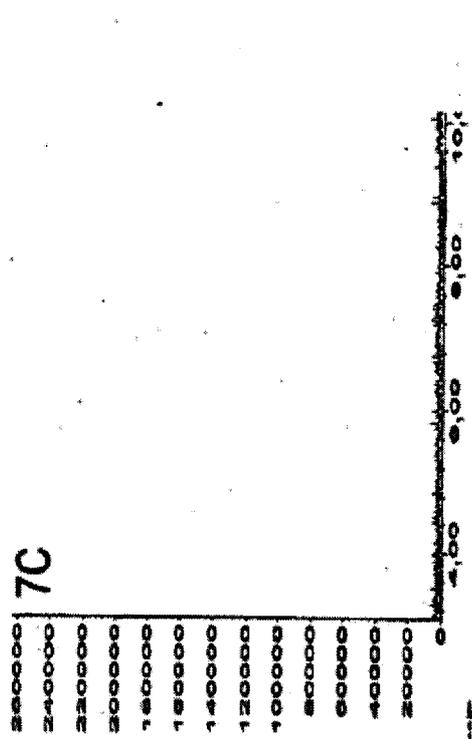
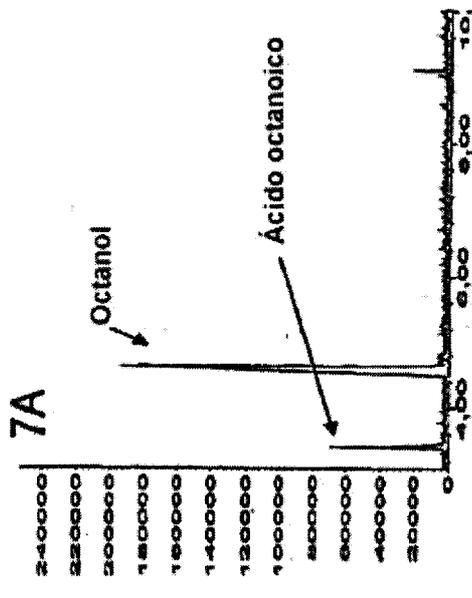


FIG. 8

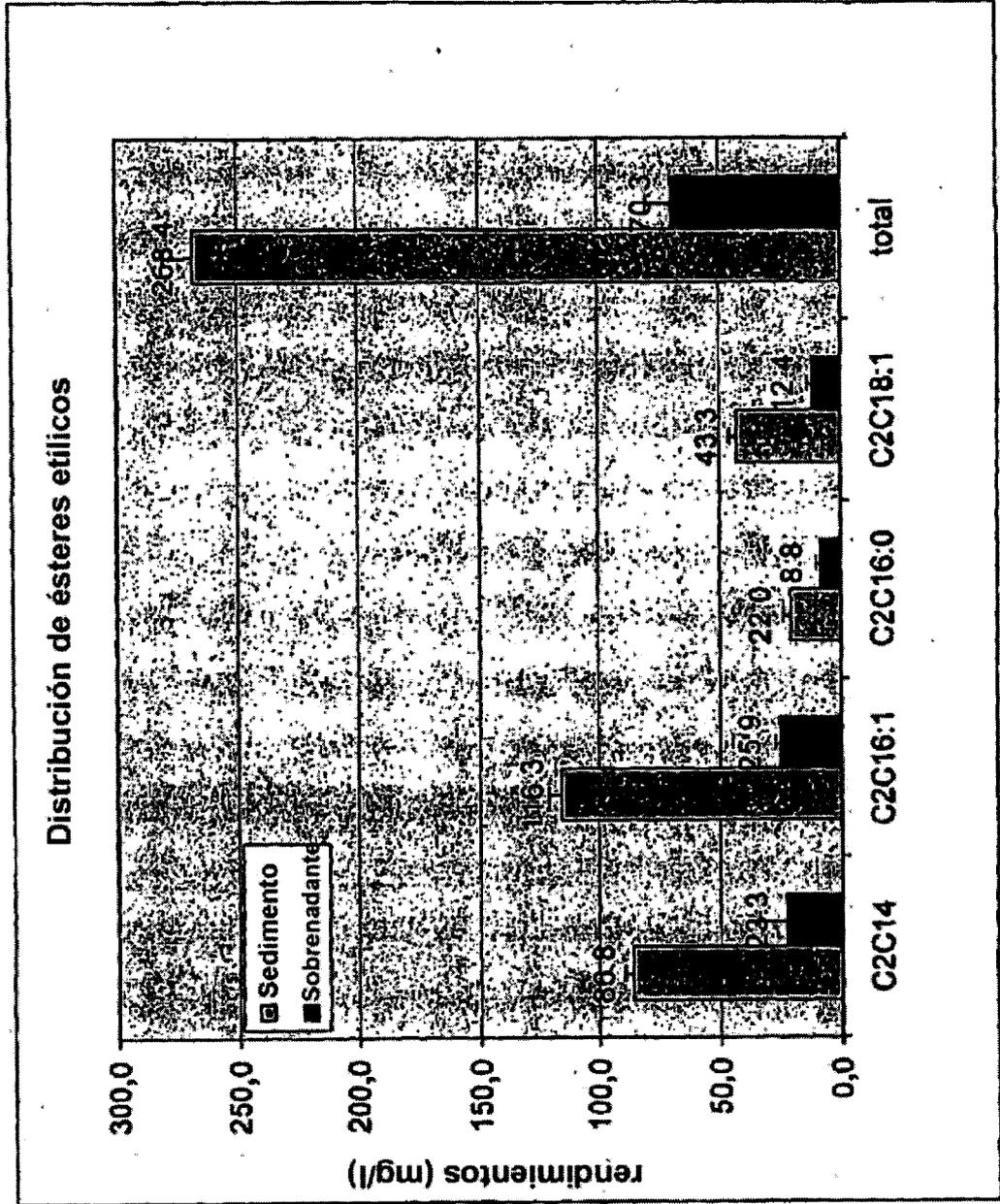


FIG. 9A

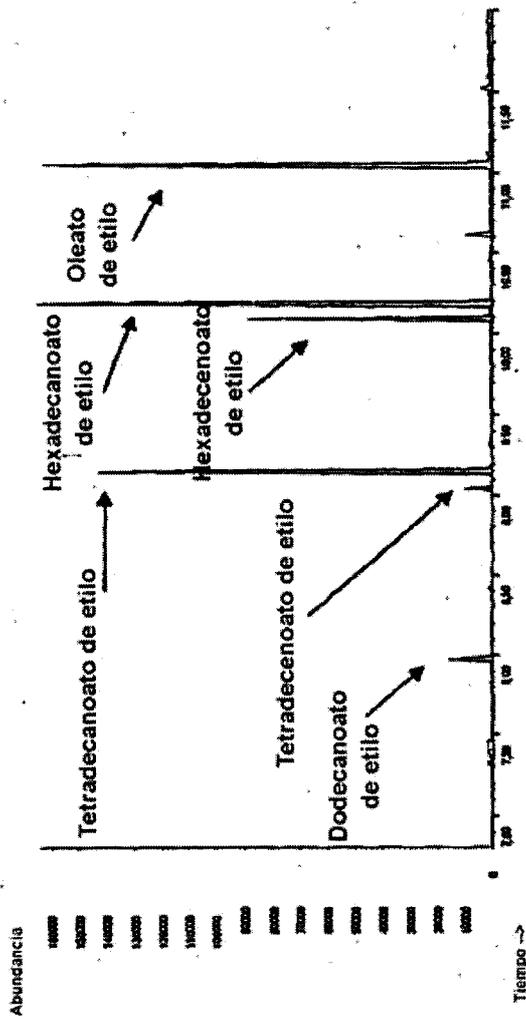


FIG. 9B

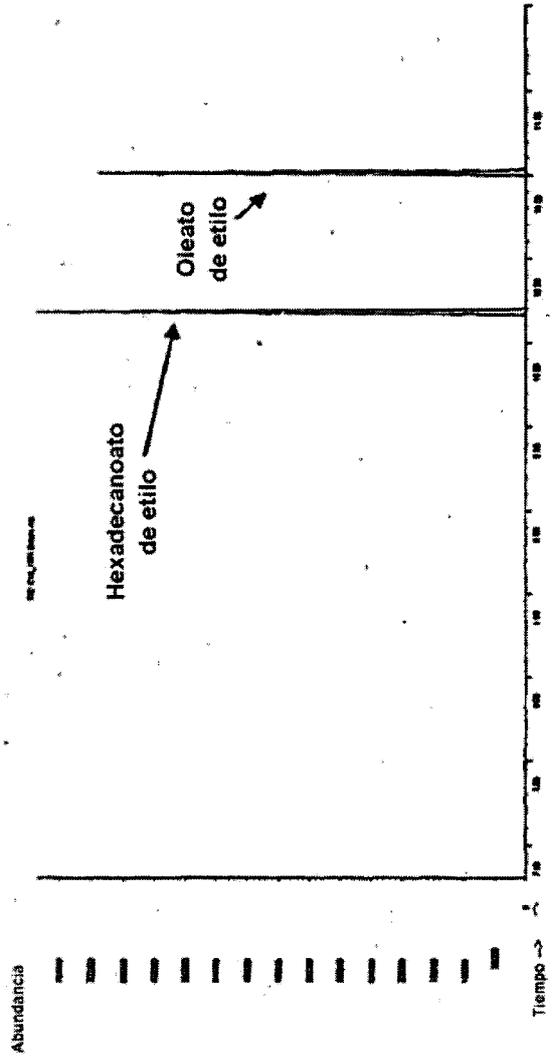


FIG. 10

Los números de registro son de NCBI, GenBank, versión 159.0 del 15 de Abril de 2007

Los números EC son de KEGG, versión 42.0 de abril de 2007 (más actualizaciones diarias hasta e incluyendo la fecha de esta patente)

<u>CATE-</u>	<u>GORIA</u>	<u>GEN</u>	<u>NOMBRE</u>	<u>REGISTRO</u>	<u>EC</u>	<u>MODIFICACIÓN</u>	<u>USO</u>	<u>ORGANISMO</u>
1. <u>Aumento de la producción de ácido graso/aumento de la producción de producto</u>								
<i>aumentar acil-CoA</i>								
<i>reducir el catabolismo de derivados y productos intermedios</i>								
<i>reducir la inhibición por retroalimentación</i>								
<i>afenuar otras rutas que consumen ácidos grasos</i>								
	accA		Acetil-CoA carboxilasa, subunidad	AAC73296, NP_414727	6.4.1.2	Sobreexpresar	aumentar la producción de malonil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
	accB		Acetil-CoA carboxilasa, subunidad	NP_417721	6.4.1.2	Sobreexpresar	aumentar la producción de malonil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
	accC		Acetil-CoA carboxilasa, subunidad	NP_417722	6.4.1.2	Sobreexpresar	aumentar la producción de malonil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
	accD		Acetil-CoA carboxilasa, subunidad	NP_416819	6.4.1.2 1.2.4.1,	Sobreexpresar	aumentar la producción de malonil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
	accE		piruvato deshidrogenasa, subunidad E1	NP_414656, AAC73226	2.3.1.61,2.3.1.1, 12	Sobreexpresar	aumentar la producción de acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
	accF		piruvato deshidrogenasa, subunidad E2	NP_414657, AAC73227	2.3.1.61,2.3.1.1, 12	Sobreexpresar	aumentar la producción de acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
	ackA		acetato cinasa	AAC79356, NP_416799	2.7.2.1	Delecionar o reducir	aumentar la producción de acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
	ackB		acetato cinasa AckB	BAB81430	2.7.2.1	Delecionar o reducir	aumentar la producción de acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
	ackP		proteína transportadora de acilo	AAC74178	NINGUNO	Sobreexpresar	aumentar la producción de acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
	fadD		acil-CoA sintasa	AP_002424	2.3.1.86	Sobreexpresar	aumentar la producción de ácidos grasos	<i>Escherichia coli</i> W3110

Gene	Protein Function	Accession	EC	Phenotype	Strain	Organism
adhE	alcohol deshidrogenasa	AAC74323, CAA47743	1.1.1.1, 1.2.1.10	Delecionar o reducir		<i>Escherichia coli</i> W3111
czrI	albehido descarbonilasa	BAA11024	4.1.99.5	Sobreexpresar		<i>Arabidopsis thaliana</i>
fabA	beta-hidroxicanoniol tioéster deshidrasa	NP_415474	4.2.1.60	Expresar		<i>E. coli</i> K12
fabD	[proteina transportadora de acilo] S-maloniltransferasa	AAC74176	2.3.1.39	Sobreexpresar		<i>E. coli</i> K12
fabF	3-oxoacil-[proteina transportadora de acilo] sintasa II	AAC74179	2.3.1.179	Delecionar o sobreexpresar		<i>E. coli</i> K12
fabG	3-oxoacil-[proteina transportadora de acilo] reductasa	AAC74177	1.1.1.100	Sobreexpresar		<i>E. coli</i> K12
fabH	3-oxoacil-[proteina transportadora de acilo] sintasa III	AAC74175	2.3.1.180	Sobreexpresar		<i>E. coli</i> K12
fabI	enoiil-[proteina transportadora de acilo] reductasa, dependiente de NADH	NP_415804	1.3.1.9	Expresar		<i>E. coli</i> K12
fabR	Represor transcripcional	NP_418398	NINGUNO	Delecionar o reducir		<i>E. coli</i> K12
fabZ	(3R)-hidroximiriitol proteina transportadora de acilo deshidratasa	NP_414722	4.2.1.- 1.3.99.3,			<i>E. coli</i> K12
fadE	acil-Co-A deshidrogenasa	AAC73325	1.3.99.-	Delecionar o reducir		<i>E. coli</i> K12
acrI	acil graso-CoA reductasa	AAC45217	1.2.1.-	Sobreexpresar		<i>E. coli</i> K12
GST	glutación sintasa	P04425	6.3.2.3	Delecionar o reducir		<i>E. coli</i> K12
epsA	sn-glicerol 3-fosfato deshidrogenasa biosintética	AAC76632, NP_418065	EC: 1.1.1.94	Delecionar o reducir		<i>E. coli</i> K12
ldhA	lactato deshidrogenasa	AAC74462, NP_415898	EC: 1.1.1.28	Delecionar o reducir		<i>E. coli</i> K12
Lipasa	triglicérido lipasa	CAA89087, CAA98876	3.1.1.3 4.1.1.9,	Expresar		<i>E. coli</i> K12
	maloniil-CoA descarboxilasa	AAA26500	4.1.1.41	Sobreexpresar		<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
panD	aspartato 1-descarboxilasa	BAB95708	4.1.1.11	Sobreexpresar		<i>Escherichia coli</i> W3110
panK a.k.a. <i>cpxA</i>	pantotenato cinasa	AAC76952	2.7.1.33	Sobreexpresar		aumentar la producción de acetyl-CoA

pdh	piruvato deshidrogenasa	BAB34380, AAC73227, AAC73226 AAC73989, P09373 AAC77011 AAC73958, NP_415392 AAC75357, NP_416800 CAA46822	1.2.4.1 EC: 2.3.1.54 2.3.1.15 1.2.2.2 2.3.1.8 1.6.1.1	Sobreexpresar Delecionar o reducir Mutación D311E Delecionar o reducir Delecionar o reducir Sobreexpresar	aumentar la producción de acetil-CoA aumentar la producción de acetil-CoA reducir los límites en la reserva de acil-CoA aumentar la producción de acetil-CoA aumentar la producción de acetil-CoA conversión de NADH en NADPH o viceversa	<i>E. coli</i> K12
fadB	3-hidroxitubutil-CoA epimerasa/delta(3)-cis-delta(2)-trans-enoil-CoA isomerasa/ enoil-CoA hidratasa y 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa fusionadas	AP_003956	1.1.1.35	Delecionar o reducir	bloquear la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
fadJ	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa: K01692 enoil-CoA hidratasa: K01782	1.1.1.35, 4.2.1.17, 5.1.2.3, 5.3.3.8, 1.1.1.35				
fadA	3-hidroxitubutil-CoA epimerasa	AAC75401	1.1.1.35, 4.2.1.17, 5.1.2.3	Delecionar o reducir	bloquear la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
fadI	3-cetoacil-CoA tiolasa	BAE77458	2.3.1.16	Delecionar o reducir	bloquear la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
Y60	beta-cetoacil-CoA tiolasa	AAC75402	1.5.1.29, 1.16,	Delecionar o reducir	bloquear la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
	acil-coA deshidrogenasa	YP_852786	1.3.99.-	Delecionar o reducir	bloquear la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
2. Control de estructura						
2A. Control de longitud de cadena						
2	tesA	tesA	3.1.2.-	Delecionar 1 y expresar	longitud de cadena C18	
	tesA sin secuencia líder	AAC73596, NP_415027	3.1.1.-	Expresar o sobreexpresar	C18:1	<i>E. coli</i> <i>Umbellularia californica</i>
	fabB (umbellularia)	Q41635	3.1.1.-	Expresar o sobreexpresar	C12:0	
	fabB2 (umbellularia)	AAC49269	3.1.1.-	Expresar o sobreexpresar	C8:0 - C10:0	<i>Cuphea hockertiana</i>

fatB3	tiosterasa	AACT2881	3.1.1.-	expresar o sobreexpresar	C14:0 - C16:0	<i>Cuphea hookeri</i> <i>Cinnamomum camphora</i>
fatB (<i>cinnamomum</i>)	tiosterasa	Q39473	3.1.1.-	expresar o sobreexpresar	C14:0	
fatB[M1417]* fatA1 (<i>Helianthus</i>)	tiosterasa	CAA85388	3.1.1.-	expresar o sobreexpresar	C16:1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	tiosterasa	AAL79361 NP 189147,	3.1.1.-	expresar o sobreexpresar	C18:1	<i>Helianthus annuus</i>
afata	tiosterasa	NP 193041	3.1.1.-	expresar o sobreexpresar	C18:1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
fatA	tiosterasa	CAC39106	3.1.1.-	expresar o sobreexpresar	C18:1	<i>Brassica juncea</i>
fatA (<i>cuphea</i>)	tiosterasa	AACT2883	3.1.1.-	expresar o sobreexpresar	C18:1	<i>Cuphea hookeri</i>

28. Control de ramificación

atenuar FabH						
expresar FabH a partir de						
<i>S. glaucescens</i> o <i>S. coelicolor</i> y desactivar						
FabH endógeno						aumentar los derivados de ácidos grasos ramificados
expresar FabH a partir de						
<i>B. subtilis</i> y desactivar						
FabH endógeno						
subunidad de bdk-E3-dihidro-						
lipoides hidrogenasa						
subunidad de bkd-E 1-alfa/beta						
						EC 1.2.4.4
						EC 1.2.4.4

subunidad de bkd-E2-dihidro- lipol transacetilasa	EC 1.2.4.4					
bkdA1	NP_628006	EC 1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Streptomyces coelicolor</i>	
bkdB1	NP_628005	EC 1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Streptomyces coelicolor</i>	
bkdC1	NP_638004	EC 1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Streptomyces coelicolor</i>	
bkdA2	NP_733618	EC 1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Streptomyces coelicolor</i>	
bkdB2	NP_628019	EC 1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Streptomyces coelicolor</i>	
bkdC2	NP_628018	EC 1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Streptomyces coelicolor</i>	
bkdA	BACT7074	EC 1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Streptomyces avermitilis</i>	
bkdB	BACT7075	EC 1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Streptomyces avermitilis</i>	
bkdC	BACT7076	EC 1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Streptomyces avermitilis</i>	
bkdF	BACT7088	EC 1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Streptomyces avermitilis</i>	
bkdG	BACT7089	EC 1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Streptomyces avermitilis</i>	
bkdH	BACT7090	EC 1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Streptomyces avermitilis</i>	
bkdAA	NP_390285	EC 1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Bacillus subtilis</i>	
bkdAB	NP_390284	EC 1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Bacillus subtilis</i>	
bkdB	NP_390283	EC 1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Bacillus subtilis</i>	
bkdA1	AAAG5614	EC 1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Pseudomonas putida</i>	
bkdA2	AAAG5615	EC 1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Pseudomonas putida</i>	

bkdC	dihidrolipoli transacetilasa (E2)	AAA65617	BC1.2.4.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Pseudomonas putida</i>
lpd	dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3)	NP_414658	1.8.1.4	expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Escherichia coli</i>
lve	aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa	YP_026247	2.6.1.42	expresar o sobreexpresar	preparar a-cetoácidos ramificados	<i>Escherichia coli</i>
lve	aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa	AAF34406	2.6.1.42	expresar o sobreexpresar	preparar a-cetoácidos ramificados	<i>Lactococcus lactis</i>
lve	aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa	NP_745648	2.6.1.43	expresar o sobreexpresar	preparar a-cetoácidos ramificados	<i>Pseudomonas putida</i>
lve	aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa	NP_629657	2.6.1.42	expresar o sobreexpresar	preparar a-cetoácidos ramificados	<i>Streptomyces coelicolor</i>
ocr	crotonil-CoA reductasa	NP_630556	1.1.1.9	expresar o sobreexpresar	convertir crotonil-CoA en butiril-CoA	<i>Streptomyces coelicolor</i>
ocr	crotonil-CoA reductasa	AAD53915	1.1.1.9	expresar o sobreexpresar	convertir crotonil-CoA en butiril-CoA	<i>Streptomyces cinnamomeus</i>
lcmA, isobutiril-CoA mutasa	isobutiril-CoA mutasa, subunidad A	NP_629554	5.4.99.2	expresar o sobreexpresar	convertir butiril-CoA en isobutiril-CoA	<i>Streptomyces coelicolor</i>
lcmA, isobutiril-CoA mutasa	isobutiril-CoA mutasa, subunidad A	AAC08713	5.4.99.2	expresar o sobreexpresar	convertir butiril-CoA en isobutiril-CoA	<i>Streptomyces cinnamomeus</i>
lcmB, isobutiril-CoA mutasa	isobutiril-CoA mutasa, subunidad B	NP_630904	5.4.99.13	expresar o sobreexpresar	convertir butiril-CoA en isobutiril-CoA	<i>Streptomyces coelicolor</i>
lcmB, isobutiril-CoA mutasa	isobutiril-CoA mutasa, subunidad B	AJ246005	5.4.99.13	expresar o sobreexpresar	convertir butiril-CoA en isobutiril-CoA	<i>Streptomyces cinnamomeus</i>
Genes de FabH, ACP y fabF con especificidad por acil-CoA de cadena ramificada						
lve		CAC12788	EC2.6.1.42	sobreexpresar	aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa	<i>S. carnosus</i>
FabH1	beta-cetoacil-ACP sintasa III	NP_626634	2.3.1.180	expresar o sobreexpresar	iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Streptomyces coelicolor</i>

ACP	proteína transportadora de acilo	NP_626635	NINGUNO	expresar o sobreexpresar	iniciación y elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Streptomyces coelicolor</i>
FabF	beta-cetoacil-ACP sintasa II	NP_626636	2.3.1.179	expresar o sobreexpresar	elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Streptomyces coelicolor</i>
FabH	beta-cetoacil-ACP sintasa III	NP_623466	2.3.1.180	expresar o sobreexpresar	iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Streptomyces avermitilis</i>
FabC3 (ACP)	proteína transportadora de acilo	NP_823467	NINGUNO	expresar o sobreexpresar	iniciación y elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Streptomyces avermitilis</i>
FabF	beta-cetoacil-ACP sintasa II	NP_823468	2.3.1.179	expresar o sobreexpresar	elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Streptomyces avermitilis</i>
FabH_A	beta-cetoacil-ACP sintasa III	NP_389015	2.3.1.180	expresar o sobreexpresar	iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Bacillus subtilis</i>
FabH_B	beta-cetoacil-ACP sintasa III	NP_388898	2.3.1.180	expresar o sobreexpresar	iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Bacillus subtilis</i>
ACP	proteína transportadora de acilo	NP_389474	NINGUNO	expresar o sobreexpresar	iniciación y elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Bacillus subtilis</i>
FabF	beta-cetoacil-ACP sintasa II	NP_389016	2.3.1.179	expresar o sobreexpresar	elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Bacillus subtilis</i>
SmaIDRAFT_08 18	beta-cetoacil-ACP sintasa III	ZP_01643059	2.3.1.180	expresar o sobreexpresar	iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SmaIDRAFT_08 21	proteína transportadora de acilo	ZP_01643063	NINGUNO	expresar o sobreexpresar	iniciación y elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SmaIDRAFT_08 22	beta-cetoacil-ACP sintasa II	ZP_01643064	2.3.1.179	expresar o sobreexpresar	elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
FabH	beta-cetoacil-ACP sintasa III	YP_123672	2.3.1.180	expresar o sobreexpresar	iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Legionella pneumophila</i>
ACP	proteína transportadora de acilo	YP_123673	NINGUNO	expresar o sobreexpresar	iniciación y elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Legionella pneumophila</i>
FabF	beta-cetoacil-ACP sintasa II	YP_123676	2.3.1.179	expresar o sobreexpresar	elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Legionella pneumophila</i>
FabH	beta-cetoacil-ACP sintasa III	NP_415609	2.3.1.180	delecionar o reducir	iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Escherichia coli</i>

FabF	beta-cetoacil-ACP sintasa II	NP_415613	2.3.1.179	elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Escherichia coli</i>
<i>Para producir ácidos grasos cíclicos</i>					
AnsJ	deshidratasa (supuesta)	no disponible	no disponible	expresar o sobreexpresar	<i>Streptomyces collinus</i>
AnsK	CoA ligasa (supuesta)	no disponible	no disponible	expresar o sobreexpresar	<i>Streptomyces collinus</i>
AnsL	deshidrogenasa (supuesta)	no disponible	no disponible	expresar o sobreexpresar	<i>Streptomyces collinus</i>
ChcA	enoiil-CoA reductasa	U72144	E1.3.1.34	expresar o sobreexpresar	<i>Streptomyces collinus</i>
AnsM	oxidorreductasa (supuesta)	no disponible	no disponible	expresar o sobreexpresar	<i>Streptomyces collinus</i>
PimJ	deshidratasa (supuesta)	AA084158	no disponible	expresar o sobreexpresar	<i>Streptomyces sp. HK803</i>
PimK	CoA ligasa (supuesta)	AA084158	no disponible	expresar o sobreexpresar	<i>Streptomyces sp. HK803</i>
PimL	deshidrogenasa (supuesta)	AA084159	no disponible	expresar o sobreexpresar	<i>Streptomyces sp. HK803</i>
ChcA	enoiil-CoA reductasa	AA084160	E1.3.1.34	expresar o sobreexpresar	<i>Streptomyces sp. HK803</i>
PimM	oxidorreductasa (supuesta)	AA084161	no disponible	expresar o sobreexpresar	<i>Streptomyces sp. HK803</i>
ChcB	enoiil-CoA isomerasa	AF268489	no disponible	expresar o sobreexpresar	<i>Streptomyces collinus</i>
ChcB/CaID	enoiil-CoA isomerasa	NP_629292	4.2.1.-	expresar o sobreexpresar	<i>Streptomyces coelicolor</i>
ChcB/CaID	enoiil-CoA isomerasa	NP_824296	4.2.1.-	expresar o sobreexpresar	<i>Streptomyces avermitilis</i>
2C...Control de nivel de saturación					
Sfa	supresor de FabA	AA079392,	no puede encontrarse	sobreexpresar	<i>E.coli</i>
véase también					
FabA en sec. 1	supresores de la mutación nula secG	AA044390		expresar	aumentar ácidos grasos insaturados aumentar ésteres de ácidos grasos insaturados
GnsA	nula secG	ABD18647.1	NINGUNO	sobreexpresar	<i>E.coli</i>

GenB	supresores de la mutación nula secG	AACT4076J NINGUNO sobreexpresar	aumentar ésteres de ácidos grasos insaturados	<i>E. coli</i>
véase también la sección 2A- artículos con 0 están insaturados (sin dobles enlaces) y con 1 están saturados (1 doble enlace)				
fabB	3-oxoacil-(proteína transportadora de acil) sintasa I	BAA16180 EC.2.3.1.41 sobreexpresar	modular la producción de ácidos grasos insaturados	<i>Escherichia coli</i>
fabK	trans-2-enoil-ACP reductasa II	AAF98273 1.3.1.9 expresar	modular la producción de ácidos grasos insaturados	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Bacillus</i>
fabL	enoil-(proteína transportadora de acil) reductasa	AAU39821 1.3.1.9 expresar	modular la producción de ácidos grasos insaturados	<i>licheniformis DSM 13</i>
fabM	trans-2, cis-3-decenoil-ACP isomerasa	DAA05501 5.3.3.14 sobreexpresar	modular la producción de ácidos grasos insaturados	<i>Streptococcus mutans</i>
3. Salida de producto final				
3A. Salida de cera				
ATCG51970	alcohol de cadena larga O-acil graso aciltransferasa	NP_190765 2.3.1.75 expresar	producción de cera	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	lioesterasa (véase la sección de control de longitud de cadena)	3.1.2.14 expresar	aumentar la producción de ácidos grasos	
	acil-CoA reductasa que forma alcohol graso	1.1.1.* expresar	convertir acil-CoA en alcohol graso	<i>Acinetobacter sp.</i>
acr1	acil-CoA reductasa (ACR1)	YP_047869 1.2.1.50 expresar	convertir acil-CoA en alcohol graso	<i>ADP1</i>
ychD	alcohol deshidrogenasa	AP_003562 1.1.1.1 expresar	aumentar	<i>E. coli W3110</i>
ELO1	ácido graso elongasa	BAD98251 2.3.1.74 expresar	producir ácidos grasos de cadena muy larga	<i>Pichia angusta</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
plsC	aciltransferasa	AAA16514 2.3.1.- expresar	producción de cera	<i>Arabidopsis thaliana</i>
DAGAT	diacilglicerol aciltransferasa	AAF19262 2.3.1.20 expresar		

hws	acil-CoA cera alcohol aciltransferasa	AAx48018	No puede encontrarse	expresar	producción de cera	<i>Homo sapiens</i>
afi	éster de cera sintasa bifuncional/ acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa	AAO17391	2.3.1.20	expresar	producción de cera	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>
mWS	éster de cera sintasa (simmondsia) aciltransferasa	AAJ38041	2.3.1.75	expresar	producción de cera	<i>Simmondsia chinensis</i>
3B. Salida de alcohol graso						
scr1	diversas tioesterasas (en referencia a sec. 2A) acil-CoA reductasa	YP_047869	3.1.2.14	expresar	producir	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>
yqhD	alcohol deshidrogenasa	AP_003562	1.1.1.1	expresar	producir	<i>Escherichia coli W3110</i>
BmfAR	FAR (acil-CoA que forma alcohol graso reductasa)	BAC79425	1.1.1.*	expresar	reducir acil graso-CoA a alcohol graso	<i>Bombyx mori</i>
Akr1a4	aldehído reductasa microsómica de mamíferos	NP_067448	1.1.1.21	expresar	producir	<i>Mus musculus Geobacillus thermomodentificans JG80-2 E. Coli K12</i>
GTNG_1865	aldehído de cadena larga deshidrogenasa	YP_00112597		expresar	producir	
FadD	acil-CoA sintetasa	NP_416319	EC 6.2.1.3	expresar	producir más	
Preparar butanol						
hobB	acetil-CoA acetiltransferasa	YP_049388	2.3.1.9	expresar	producir	<i>Erwinia carotovora</i>
hbd	beta-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa	BAD51424	1.1.1.157	expresar	producir	<i>Butyrvibrio fibrisolvens Clostridium perfringens Clostridium beijerinckii Clostridium beijerinckii Escherichia coli CFT073</i>
CPE0095	crotonasa	BAB79801	4.2.1.17	expresar	producir	
bdh	butiril-CoA deshidrogenasa	AAM14583	No puede encontrarse	expresar	producir	
ALDH	CoA-acilante deshidrogenasa	AAT66436	No puede encontrarse	expresar	producir	
AdhE	aldehído-alcohol deshidrogenasa	AAJ80172	1.1.1.1	expresar	producir	
			1.2.1.10	expresar	producir	

3.C. Salida de ésteres de ácidos grasos							
tiosterasa	vése la sección de control de longitud de cadena		3.1.2.14	expresar		producir	<i>Acinetobacter sp.</i>
acr1	acil-CoA reductasa	YP_047869	1.2.1.50	expresar		producir	ADPI
ypbD	alcohol deshidrogenasa	AP_003562	1.1.1.1	expresar		producir	E. Coli K12
AAT	alcohol O-acetiltransferasa	AAG13130	2.3.1.84	expresar		producir	<i>Fragaria x ananassa</i>
4. Exportar							
exportador de éster de cera (familia FATP, proteína transportadora de ácidos grasos (cadena larga))						exportar cera	<i>Drasophila melanogaster</i>
Transportador ABC	transportador de alcanos supuesto	NP_524723	NINGUNO	expresar		exportar productos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
CERS	transportador de cera asociado a resistencia a múltiples fármacos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	AAN73268 AIG51500, AY734542, A3221090, AIG51460	NINGUNO	expresar		exportar productos	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AMRP5 AmiS2	Transportador ABC AmiS2	NP_171908 JCS491	NINGUNO	expresar		exportar productos	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AIP0P1	GLICOPORTEINA 1 DE ARABIDOPSIS THALIANA P		No puede encontrarse	expresar		exportar productos	<i>Rhodococcus sp.</i>
AcrA	proteína acrA supuesta de transporte de flujo de salida de múltiples fármacos	NP_181228	NINGUNO	expresar		exportar productos	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Candidatus</i> <i>Prochloromydia</i> <i>amosobophila</i> UWFE25 <i>Candidatus</i> <i>Prochloromydia</i> <i>amosobophila</i> UWFE25 <i>Franscella</i> <i>tularensis</i> subsp. <i>novitida</i>
AcrB	proteína de transporte de flujo de salida de múltiples fármacos probable, acrB	CAF23274 CAF23275	NINGUNO	expresar		exportar productos	
ToxC	proteína de la membrana externa [envuelta celular], biogénesis	ABD59001	NINGUNO	expresar		exportar productos	

	proteína transmembrana que afecta a la formación del septo y a la permeabilidad de la membrana celular							<i>Shigella sonnei</i> S5046 <i>Escherichia coli</i>	
AcrE	proteína F de resistencia a acriflavina	YP_312213 P24181	NINGUNO NINGUNO	expresar expresar	exportar productos exportar productos				
U11618	transportador de flujo de salida de múltiples fármacos	NP_682408.1		expresar	exportar productos			<i>Thermosynechococcus elongatus BP-1J</i>	
U11619	transportador de flujo de salida de múltiples fármacos	NP_682409.1		expresar	exportar productos			<i>Thermosynechococcus elongatus BP-1J</i>	
U110139	transportador de flujo de salida de múltiples fármacos	NP_680930.1		expresar	exportar productos			<i>Thermosynechococcus elongatus BP-1J</i>	
5. Fermentación									
genes de punto de control de la replicación									
umuD	ADN polimerasa V, subunidad	YP_310132	3.4.21.-	sobreexpresar	aumentar la eficacia de salida			<i>Shigella sonnei</i> S5046	
umuC	ADN polimerasa V, subunidad	ABC42261	3.4.21.-	sobreexpresar	aumentar la eficacia de salida			<i>Escherichia coli</i>	
NADH:NADPH transhidrogenasa (subunidades alfa y beta)									
		<u>P07001</u>	1.6.1.1.						
		<u>P0AB70</u>	1.6.1.2	expresar	aumentar la eficacia de salida			<i>Shigella flexneri</i>	