

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 529 176**

(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 11005423 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2395074**

(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:  
**17.02.2015**

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

ES 2 529 176 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 20 ineficiencias económicas.

**Sumario**

25 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.

30 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.

35 En un ejemplo, la descripción proporciona 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.

45 Se proporcionan 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 proporcionan 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 proporcionan 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 proporcionan 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 proporcionan 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 acidiurici*, especies de *Corynebacterium*, especies de cianobacterias (*Nostoc muscorum*, *Anacystis (Synechococcus) nidulans*, *Phormidium luridum*, *Clorogloea fritschii*, *Trichodesmium erythraeum*, *Oscillatoria williamsii*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Coccochloris elabens*, *Agmenellum quadruplicatum*, *Plectonema terebrans*, *M. vaginatus* y *C. scopolorum*), *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 sphaeroids* *Clorobium* sp., *Rhodospirillum rubrum* (ATCC 11170), *Rhodomicrombium vannielii*, *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 13637, 17444, 17445, 17666, 17668, 17673, 17674, 17679, 17677), *Saccharomyces ludwigii* (ATCC 22711), *Saccharomyces* sp. (*oviformus*, *ludwigii*, *tropicalis*), *Vibrio fumissii* M1, *Vibrio marinus* MP-1, *Vibrio ponticus*, *Serratia marinorubra*, *Ustilago maydis*, *Ustilago nuda*, *Urocystis agropyri*, *Sphaelotheca 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 pueden 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 pueden 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/fabD/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 el microorganismo produce 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 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 proporcionan 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.

#### 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).

5 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 10 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).

15 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).

20 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.

25 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.

30 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,  $\Delta$ fadE/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,  $\Delta$ fadE/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,  $\Delta$ fadE/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,  $\Delta$ fadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B) en la que el plásmido pHZ1.43 expresaba SAAT).

35 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.

40 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.

45 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

50 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.

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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 25 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.

30 35 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.

40 45 Fuente de carbono: Generalmente se refiere a un sustrato o compuesto adecuado para usarse como fuente de carbono para el crecimiento de células procariotas o eucariotas 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.

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.

50 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.

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.

55 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.

5 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.

10 10 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.

15 15 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).

20 20 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.

25 30 30 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.

35 35 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.

40 45 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 alkanos, 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.

55 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.

- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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 transcritos usando rtPCR y pueden evaluarse los niveles de proteínas usando análisis en gel de SDS page.
- 25 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, hidrato 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 45 Una célula o un microorganismo recombinante es uno que contiene una molécula de ácido nucleico exógeno, tal como una molécula de ácido nucleico recombinante.
- 50 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.
- 55 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.

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.

**5** 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.

**10** **15** 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 aeration 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 proporcionados en los ejemplos a continuación.

**20** **25** **30** **35** 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.

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.

### **35** 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.

#### **45** 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.

**50** **55** 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 descarbonilasas, 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).
- 5 10 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).
- 15 20 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*.
- 25 30 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.
- 35 40 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 deleciónarse 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 P0ADA1), 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 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.

45

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.

#### 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).

5 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.

#### D. Acil-CoA para dar alcohol graso

15 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.

20 25 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.

30 35 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*.

40 45 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 *Apotrichum curvatum*), *Alcanivorax jadensis* (T9T = DSM 12718 = ATCC 700854), *Acinetobacter sp* HO1-N, (ATCC 14987) y *Rhodococcus opacus* (PD630 DSMZ 44193).

50 55 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.

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

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). Éstos 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.

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 (biodiéseles y ceras)

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/acyl-CoA:diacylglycerol aciltransferasa bifuncional seleccionada de un complejo multienzimático de

*Simmondsia chinensis*, *Acinetobacter* sp. cepa ADP1 (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.

5 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 *Apotriicum 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).

10 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.

15 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.

20 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. 279:8075-8082, 2003). En otro ejemplo se usa la éster de cera sintasa de *Simmondsia chinensis*, en el locus AAD38041.

25 Opcionalmente puede usarse un exportador de éster de cera tal como un miembro de la familia F ATP 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

30 Se sabe que una diversidad de microorganismos produce hidrocarburos, tales como alkanos, olefinas e isoprenoïdes. 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 descarbonilación 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 alkanos 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 alkanos. 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 alkanos 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 estos enfoques puede aplicarse a la producción de alkanos en *Vibrio furnissii* M1 y sus homólogos funcionales, que produce alkanos 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.

55 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 alkanos 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 oxidoreductasas 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 alkanos se monitoriza mediante CG/EM, CCF u otros métodos. Se usa una óxido/reductasa identificada de esta manera para producir alkanos, 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 alkanos. 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

20 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.

25 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, fósvidos, 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*).

30 35 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 procariota, tal como *E. coli*).

40 45 50 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).

55 60 Los promotores adecuados para su uso en células huésped procariotas 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 procariotas por Glick, J. *Ind Microbiol.* 1:277, 1987; Watson *et al.*, MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, 4<sup>a</sup> 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 (Foecking *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.

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 pantoténato (*panD*) o desactivando los genes asociados con la biosíntesis de glutatión (glutatión sintasa).

### III. Características de la cadena de carbono

Usando las enseñas 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).

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.

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

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*- $\delta^3$ -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 deleccionarse 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 delecciona *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  $\beta$ -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).

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 cílicos

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

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 deleccionar los genes de *E. coli* correspondientes que normalmente conducen a sFA y competirían con los genes introducidos (por ejemplo *FabH*, *FabF*).

Los acil-CoA, 2-metil-buturil-CoA, isovaleril-CoA e isobuturil-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.

5 La primera etapa en la formación de ácidos grasos ramificados es la producción de los  $\alpha$ -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

10 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.

15 La segunda etapa, la descarboxilación oxidativa de los  $\alpha$ -cetoácidos para dar el acil-CoA de cadena ramificada correspondiente, se cataliza mediante complejos de  $\alpha$ -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 $\alpha$ / $\beta$  (descarboxilasa), E2 (dihidrolipoil transacilasa) y E3 (dihidrolipoil deshidrogenasa) y son similares a complejos de piruvato y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa. La tabla 2 muestra posibles genes *bkd* de varios microorganismos, que 20 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*  $\alpha$ / $\beta$  y 25 *E2*.

Tabla 2

Genes *bkd* de microorganismos seleccionados

Organismo	Gen	N.º de registro de Genbank
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>bkdA1</i> (E1 $\alpha$ )	NP_628006
	<i>bkdB1</i> (E1 $\beta$ )	NP_628005
	<i>bkdC1</i> (E2)	NP_638004
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>bkdA2</i> (E1 $\alpha$ )	NP_733618
	<i>bkdB2</i> (E1 $\beta$ )	NP_628019
	<i>bkdC2</i> (E2)	NP_628018
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>bkdA</i> (E1a)	BAC72074
	<i>bkdB</i> (E1b)	BAC72075
	<i>bkdC</i> (E2)	BAC72076
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>bkdF</i> (E1 $\alpha$ )	BAC72088
	<i>bkdG</i> (E1 $\beta$ )	BAC72089
	<i>bkdh</i> (E2)	BAC72090
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>bkdAA</i> (E1 $\alpha$ )	NP_390288
	<i>bkdAB</i> (E1 $\beta$ )	NP_390288
	<i>bkdB</i> (E2)	NP_390288
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>bkdA1</i> (E1 $\alpha$ )	AAA65614
	<i>bkdA2</i> (E1 $\beta$ )	AAA65615
	<i>bkdC</i> (E2)	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 lcmA, EC 5.4.99.2; subunidad pequeña lcmB, 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 *lcm* de microorganismos seleccionados.

Tabla 3

Genes *ccr* e *lcm* de microorganismos seleccionados

Organismo	Gen	N.º de registro de Genbank
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>ccr</i>	NP_630556
	<i>lcmA</i>	NP_629554
	<i>lcmB</i>	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  $\beta$ -cetoacil-acil-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  $\beta$ -cetoacil-acil-proteína transportadora sintasa II son proteínas transportadoras de acilo (ACP) y  $\beta$ -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* (nº de registro de Genbank NP\_415609) y/o *fabF* (n.º de registro de Genbank NP\_415613).
- 5 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.
- 10 Con el fin de convertir un huésped de producción tal como *E. coli* en un organismo que pueda sintetizar ácidos grasos cílicos  $\omega$  (cyFA), es necesario introducir y expresar varios genes que proporcionan el precursor cílico 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 cílicos  $\omega$ . Alternativamente, los genes homólogos pueden aislarse a partir de microorganismos que producen cyFA y se expresan en *E. coli*.
- 15
- 20
- 25

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>	NP_626634
	<i>ACP</i>	NP_626635
	<i>fabF</i>	NP_626636
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>fabH3</i>	NP_823466
	<i>fabC3 (ACP)</i>	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>	SmalDRAFT_0818 ( <i>FabH</i> )	ZP_01643059
	SmalDRAFT_0821 ( <i>ACP</i> )	ZP_01643063
	SmalDRAFT_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).
- 30

Tabla 5

## Genes para la síntesis de ciclohexilcarbonil-CoA

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

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

5 Los genes enumerados en la tabla 4 (*fabH*, *ACP* y *fabF*) son suficientes para permitir la iniciación y el alargamiento de ácidos grasos cíclicos  $\omega$  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 *pmlJKLR4/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  $\omega$ .

Tabla 6

10 Ejemplos de microorganismos que contienen ácidos grasos cíclicos  $\omega$

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.

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

#### C. Características de ésteres

15 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 proporcionan 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 proporciona 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.

20 30 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,  $\beta$ -hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa de *Butyrivibrio fibrisolvens*, crotonasa de *Clostridium beijerinckii*, butiril CoA deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii*, aldehído deshidrogenasa (ALDH) CoA-aciilante 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, que es.

35 40 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, 5 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 10 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 15 polimerasa que puede llevar a cabo síntesis translesión a lo largo de lesiones no codificantes, la base mecanística 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 20 producen producto se activarán, 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 25 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 30 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 sometiéndose 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.
- 40 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.
- 45 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 50 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).
- 55 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) 60 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.

5 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.

10 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.

15 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

20 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 proporcionado 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.

25 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.

40 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.

45 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.

#### V. Composiciones de combustible

55 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.

5 A. Huella de carbono

10 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).

15 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,  $^{14}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$ , aportan información complementaria a este problema. El isótopo de datación de radiocarbono ( $^{14}\text{C}$ ), 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. Buffe 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  $^{14}\text{C}$  en la atmósfera conduce a la constancia de  $^{14}\text{C}$  en los organismos vivos. Cuando se trata con una muestra aislada, la edad de una muestra puede deducirse aproximadamente mediante la relación  $t=(-5730/0,693)\ln(A/\text{A.sub.O})$  (ecuación 5) donde  $t$ =edad, 5730 años es la semivida del radiocarbono, y  $A$  y  $\text{A.sub.O}$  son la actividad de  $^{14}\text{C}$  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  $^{14}\text{C}$  ha adquirido una segunda característica temporal geoquímica. Su concentración en  $\text{CO}_2$  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 returned 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  $^{14}\text{C}$  atmosférico y biosférico desde el inicio de la era nuclear). Es esta última característica temporal del  $^{14}\text{C}$  biosférico la que ofrece la promesa de la datación anual del carbono biosférico reciente. Puede medirse el  $^{14}\text{C}$  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.

40 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 todos diferencias significativas en  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  y los correspondientes valores de delta  $^{13}\text{C}$ . 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,  $^{13}\text{C}$  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  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$  así liberado vuelve a fijarse mediante el ciclo C3.

50 55 60 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  $^{13}\text{C}$  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:

$$5 \quad \delta^{13}\text{C} = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{muestra}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{patrón}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{patrón}}} \times 100\% \quad (\text{Ecuación 6})$$

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  $\text{CO}_2$  mediante espectrometría de masas de razón estable de alta precisión (IRMS) sobre iones moleculares de masas 44, 45 y 46.

10 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  $^{14}\text{C}$  (fM) y determinación de la huella isotópica del carbono, indicando nuevas composiciones de materia.

15 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 proporcionadas 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.

20 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  $\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{OR}^1$ ;  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^2$ ; o  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^3\text{R}^4$ ;

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

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

35  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$  y  $\text{R}^4$  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 (fM  $^{14}\text{C}$ ) de al menos aproximadamente 1,003, 1,010 ó 1,5.

#### B. Derivados de ácidos grasos

40 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.

45 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.

50 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).

5 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.

10 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.

15 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.

20 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.

25 30 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

35 40 45 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.

50 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.

55 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 deleciónarse 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.

- 5 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 10 por ingeniería genética o pueden modificarse por ingeniería genética para producir alcoholes grasos y ésteres de ácidos grasos/ceras e hidrocarburos específicos.
- 15

#### 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 deleciónar funcionalmente el gen *fadE* (acil-CoA deshidrogenasa).

- 20 En resumen, se preparó la cepa de *E. coli* con desactivación de *fadE* usando los cebadores *YafV\_NotI* y *lvry\_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 deleción en marco del gen *fadE* completo. Se clonó el constructo de deleción de *fadE* en el 25 plásmido sensible a la temperatura pKOV3, que contenía un gen *SacB* para la contraselección, y se realizó una deleción 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 deleción funcional se designa en el presente documento como  $\Delta fadE$ ).

- 30 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 *Ncol/HindIII* y *Ndel/AvrII* de pACYCDuet-1 (Novagen, Madison, WI), el plásmido resultante se denominó pAS004.126.

- 35 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/fabP/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 europaea* (ATCC 19718), *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces spp*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Corynebacteria*, *Brevibacteria*, *Mycobacteria*, levaduras oleaginosas, y similares. De manera similar, pueden 40 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*.

- 45 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); *pflb* (que codifica para formato 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.

- 50 De manera similar, puede introducirse la mutación *PlsB[D311E]* en LS9001 para atenuar *PlsB* usando el método descrito anteriormente para la deleción 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 genética y se intercambia el alelo silvestre *plsB* cromosómico por el alelo *plsB[D311E]* mutante usando el método de Link *et al.* (véase anteriormente).

#### 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).

5 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 *Nde*I/*Avr*II (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=AAA34213, ChFatB2=AAC49269, ChFatB3=AAC72881, CcFatB=AAC49151 en tres vectores diferentes: (i) pETDuet-1 digerido con *Nde*I/*Avr*II, (ii) pBluescript KS+ digerido

10 con *Xba*I/*Hind*III (Stratagene, La Jolla, CA) (usado para crear proteínas de fusión lacZ::TE N-terminales) y (iii) pMAL-c2X digerido con *Xba*I/*Hind*III (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 *Nco*I/*Hind*III que contenía el gen *acr1* (acil-CoA reductasa) de *Acinetobacter baylyi* ADP1 dentro de sus sitios *Nde*I/*Avr*II. 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.

15

Tabla 7

## Resumen de plásmidos usados en huéspedes de producción

Plásmido	Organismo fuente Producto génico	N.º de registro, número EC
pETDuet-1-tesA	<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>	fadD: Registros NP_416319, EC 6.2.1.3 acr1: Registros YP_047869

20 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.

25

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

30 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 espechinomicina 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 espechinomicina. Se hicieron crecer las muestras que contenían los transformantes a 25°C en un agitador (250 rpm) hasta que alcanzaron una  $DO_{600}$  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  $DO_{600}$  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.

35

40 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  $H_2O$  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

5 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.

10 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  $\Delta$ *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 californicain* en pMAL-c2X-TEuc), la producción de alcohol graso aumentó aproximadamente 20 veces y C12:0-OH era el alcohol graso predominante.

15 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

20 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.

25 En este ejemplo, se coexpresó un gen de SAAT en un huésped de producción C41 (DE3,  $\Delta$ *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.

30 35 Se sintetizó un gen de SAAT recombinante usando DNA 2.0 (Meme Park, CA 94025). El ADN sintetizado se basaba en la secuencia génica publicada (número de registro AF193789) y se modificó para eliminar el sitio *Ncol*. Se clonó el gen SAAT sintetizado (como un fragmento de BamHI-HindIII) en pRSET B (Invitrogen, Carlsbad, California), linealizado con *Bam*HI y *Hind*III. 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.

40 45 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,  $\Delta$ *fadE*)/pRSET B+pAS004.114B] no produjo octanoato de octilo. Además, la cepa [C41 (DE3,  $\Delta$ *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).

50 55 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

55 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\_NdeI, 5'-TCATATGCGCCCATTACATCCG-3' y (2) WSadp1\_Avr, 5'-TCCTAGGAGGGCTAATTTAGCCCTTAGTT-3'. Se digirió el producto de PCR con *Nde*I y *Avr*I 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 DO<sub>600</sub> 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 DO<sub>600</sub> 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 C16C16, 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 trajeron 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, ΔfadE) que contenía pCOLADuet-1 (vector vacío para el gen de cera sintasa), pMAL-c2X-TEuc (que contenía *fatB* de *U. californica*) y pCDFDuet-1-fadD (gen *fadD* de *E. coli*) no pudo producir cantidades detectables ésteres etílicos gramos. Se cuantificaron los ésteres de ácidos gramos usando éster etílico de ácido palmitíco comercial como referencia. También se prepararon ésteres de ácidos gramos 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 gramos esperados.

Ejemplo 8, la influencia de diversas tioesterasas sobre la composición de ésteres etílicos gramos 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 *Nof*I-*Avr*I (que portaba el gen *acr1*) por el fragmento de *Nof*I-*Avr*I 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, ΔfadE) con uno de los diversos plásmidos que portan los diferentes genes de tioesterasa establecidos anteriormente.

Se evaluaron los ésteres etílicos de ácidos gramos totales (ésteres etílicos de ácidos gramos 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 gramos se resumen en la tabla 8.

Tabla 8

Los rendimientos (mg/l) y la composición de ésteres etílicos de ácidos gramos por *E. coli* C41(DE3, ΔfadE)/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 beta (carboxiltransferasa) (accD/ZP\_00618306). Se cloran 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			
	accA	YP_388034	6.4.1.2
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G22	accC	YP_388573/YP_388033	63.4.14, 6.4.1.2
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G23	accD	YP_388034	6.4.1.2
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G28	fabH	YP_388920	23.1.180
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G29	fabD	YP_388786	23.1.39
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G30	fabG	YP_388921	1.1.1.100 3.1.26.3,
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G31	acpP	YP_388922/YP_389150	1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G32	fabF	YP_388923	2.3.1.179
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G33	gpsA	YP_389667	1.1.1.94 1.1.127,
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G34	ldhA	YP_388173/YP_390177	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	1580826-1381749	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	1936806-1957789	1.1.1.28
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	accA	ZP_00618306	6.4.1.2

<i>Kineococcus radiotolerans SRS30216</i>	accB	ZP_00618397	6.4.1.2
<i>Kineococcus radiotolerans SRS30216</i>	accC	ZP_00618040/ZP_00618387	6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Kineococcus radiotolerans SRS30216</i>	accD	ZP_00618306	6.4.1.2
<i>Kineococcus radiotolerans SRS30216</i>	fadE	ZP_00617773	1.3.99.-
<i>Kineococcus radiotolerans SRS30216</i>	plsB(D311E)	ZP_00617279	2.3.1.15
<i>Kineococcus radiotolerans SRS30216</i>	aceE	ZP_00617600	1.2.4.1
<i>Kineococcus radiotolerans SRS30216</i>	aceF	ZP_00619307	2.3.1.12
<i>Kineococcus radiotolerans SRS30216</i>	fabH	ZP_00618003	2.3.1.180
<i>Kineococcus radiotolerans SRS30216</i>	fabD	ZP_00617602	2.3.1.39
<i>Kineococcus radiotolerans SRS30216</i>	fabG	ZP_00615651	1.1.1.100
<i>Kineococcus radiotolerans SRS30216</i>	acpP	ZP_00617604	3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Kineococcus radiotolerans SRS30216</i>	fabF	ZP_00617605	2.3.1.179
<i>Kineococcus radiotolerans SRS30216</i>	gpsA	ZP_00618825	1.1.1.94
<i>Kineococcus radiotolerans SR530216</i>	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</i> R551-3	fabF	ZP_01643064	2.3.1.179
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	gpsA	ZP_01643216	1.1.1.94.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	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 furnisii* 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
	<i>E. coli</i>	tesA	X		X		X	X
tioesterasa	<i>Cinnamomum camphora</i>	ccFatB						
	<i>Umbellularia californica</i>	umFatB		X		X		
	<i>Cuphea hookeriana</i>	chFatB2						
	<i>Cuphea hookeriana</i>	chFatB3						
	<i>Cuphea hookeriana</i>	chFatA						
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AlFatA1						
	<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 ADP1</i>	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 M1</i>	acr M1						
	<i>Homo sapiens</i>	hFAR						
	<i>Fundibacter jadensis</i> DSM 12178	WST9						

transferasa	<i>Acinetobacter</i> sp. HO1-N	WSHN					X	
	<i>Acinetobacter</i> <i>baylyi</i> ADP1	WSadp1						X
	<i>Mus</i> <i>musculus</i>	mWS						
	<i>Homo</i> <i>sapiens</i>	hWS						
	<i>Fragaria</i> <i>ananassa</i>	X SAAT						
	<i>Malus</i> <i>domestica</i>	X MpAAT						
	<i>Simmondsia</i> <i>chinensis</i>	JjWS (AAD38041)						
5	Descar- boxilasa	<i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>	cer1					
10		<i>Oryza sativa</i>	cer1					
15	Trans- portador	<i>Acinetobacter</i> sp. HO1-N					X	X
20		<i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>	Cer5					

## Ejemplo 11, fermentación

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 DO<sub>600</sub> de > 0,8. Tras lograr una DO<sub>600</sub> de > 0,8, se complementan las células con 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 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).

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 DO<sub>600</sub> 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 DO<sub>600</sub> cae por debajo de 0,6, se reemplazan las células por un nuevo lote hecho crecer a partir de un cultivo de simiente.

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.

## 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

5 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.

10 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.

15 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.

#### EQUIVALENTES

15 Aunque se dan a conocer explícitamente ejemplos específicos de las invenciones objeto en el presente documento, la memoria descriptiva anterior y los ejemplos en el presente documento son ilustrativos y no restrictivos. Muchas variaciones de las invenciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras la revisión de esta memoria descriptiva incluyendo los ejemplos.

#### Lista de secuencias

- 20 <110> LS9, Inc  
     <120> Producción de ácidos grasos y derivados de los mismos  
     <130> EP61667IIIFZ210pau  
 25    <140> aún no asignado  
       <141> adjunta  
     <150> 07 809 099.0  
 30    <151> 18-05-2007  
     <150> PCT/US2007/011923  
     <151> 18-05-2007  
     <150> 60/908.547  
 35    <151> 28-03-2007  
     <150> PCT/US2007/003736  
     <151> 13-02-2007  
 40    <150> 60/802.016  
     <151> 19-05-2006  
     <150> 60/801.955  
 45    <151> 19-05-2006  
     <160> 30  
     <170> PatentIn versión 3.3  
     <210> 1  
     <211> 498  
     <212> ADN  
     <213> *Vibrio furnisii*  
 50    <400> 1

gttagatgagc ctaaattttc tagaaatttag aaaaacctat tgtagaactg gaagctaaaa	60
ttcaggcgct tcgtgacgtg tctcgtcatg gcgggtggAAC ttccgttagat cttgaaaaAG	120
agatcgaaca gctagaaaaAG aaaagcctag agctaaaaAA gaaaattttc ggtgattttAG	180
gggcatggca agtggcacAG atggctcgCC atccacaACg tccttacACC ttAGattACA	240
tcaacaacat gtttacggag ttcgatgaac tagccggta ccgtgcattt gctgacgaca	300
aagcgatcgt gggcggtatg gcccgttag atggtcgccc tgtgatggtg attggtcatc	360
agaaaaggccg tgaaacccgt gaaaaagtaa aacgttaactt tggatgcca aagccagaag	420
gttaccgtaa agccctgcgt ttgatggaaa tggctgagcg tttcaacatg ccaatcatta	480
ccttcatcga cacggcgG	498

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

5

<400> 2	atgaattcgc ttgtcggca ggcgttcgcg cgctgcaagc aaagtaaacc caaacactct	60
gcagctcaat tgagctgtct tattcacaag ataaaaagaga aagaaaacaat ggatattcgt	120	
aaaatcaaga agcttatacg attgggtgaa gagtcaggca ttgctgagct agaaaatttct	180	
gaagggtgaag aatcggtacg catcagtctg cacggtgtcg ccccgagttgc acctatccag	240	
tatgcagcac ctgcaccaat ggcagcgcca gtagcagcac ctgcagcagc gccagtcgt	300	
gaagcaccag cagcagccaa aacgcctgcg ggccacatgg ttctttctcc aatggtggt	360	
acgttctacc gttcaccaag tccagatgca aaatcattca tcgaagtggg tcaaactgtg	420	
aaagcgggtg acacattgtg catcggtgaa gcgatgaaaa tgatgaacca aatcgaaagca	480	
gacaagtctg gtgtatgtac cgagatcctt gttgaagacg gtcaggccgt agaattcgac	540	
cagccacttg ttgtcattcgataaa	564	

10

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

15

atgcttagata	agttagtcat	cgcgaaccga	ggcgaattg	cgcttcgtat	tcttcgtgca	60
tgtaaagagt	tgggcatcaa	aactgttgcc	gttcactcca	cagcagacccg	cgatctaaaa	120
cacgtcctgc	tggcggatga	aaccgtatgt	atcggccctg	caaaaggcat	cgatagctac	180
ttgaacattc	cacgcatcat	ttcagccgct	gaagtgaccg	gcmcagtggc	catccacccg	240
ggttacggct	tcctgtctga	aaatgcggac	tttgcgtgaac	aagttgagcg	cagcggcttt	300
atcttcgtgg	gtccaaaagc	cgacaccatc	cgcctgatgg	gcmataaagt	gtcagccatc	360
accgcgatga	agaaagcagg	cgttccttgc	gtaccgggtt	ctgacggtcc	tctggacaac	420
gatgaagtga	aaaaccgtgc	acacgcgaaa	cgcattggtt	acccagtgtat	catcaaagcc	480
tctggtggcg	gcggcggtcg	cgttatgcgt	gtggttcgca	gcgaagcgga	actggtaat	540
gccatcagca	tgacccgtgc	agaagcgaaa	gcggcggtca	acaacgacat	ggtttacatg	600
gagaatacc	tcgaaaaaccc	acgtcacgtt	gaagtccaag	ttctggccga	tggcaggc	660
agcgcgatcc	acttgggtga	acgcgactgt	tccatgcagc	gtcgtcacca	gaaagttagtg	720
gaagaagcgc	cagcaccagg	cattactgaa	gagatgcgta	agtacatcg	tgaacgctgt	780
acccgtgcgt	gtatcgaaat	cgttaccgc	ggcgcaggta	cgtttagttt	cctgtacgaa	840
aacggcgaat	tctacttcat	cggaaatgaac	acacgtattc	aggtaaca	cccagtgtact	900
gaaaatggtca	caggcggtga	cttgatcaaa	gaacagctgc	gcacgcgc	aggccaaccg	960
ctgtcggtca	cacaagacga	catcaaaatt	cgtggccatg	cgatggatg	ccgtatcaac	1020
gcggaagacc	cagaacgcgtt	cctaccttgc	ccaggcaaga	tcacccgttt	ccactcacca	1080
ggtggcatgg	gcgtgcgttg	ggaatcacac	atctactcag	gctacaccgt	accggcgatc	1140
tacgactcga	tgatcggtca	actgatcacc	tttggtgaga	accgtgacgt	cgcgattgca	1200
cggatgcgt	acgcgcgtcg	tgagatgatt	gtggaaaggta	tcaaaaccaa	cattccactg	1260
cagcaagtta	tcatgaaaga	tgagaacttc	caacacggtg	gcaccaacat	ccactatctg	1320
gagaaaaaagc	tggggctgca	ataaa				1344

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 927

&lt;212&gt; ADN

<213> *Vibrio furnisii*

&lt;400&gt; 4

atgagctggc	ttgagaagat	tttagaaaaa	agcaacatcg	gaagttcacg	taaagcgtct	60
atccctgaag	gggtttggac	caaatgtaca	tcgtgtgaac	aggtgcttta	ttacgctgaa	120
ctagagcgca	atcttgaagt	ttgtccgaag	tgtatcatc	acatgcgtat	gaaggcgcgc	180

cgtcgctttg	aaacgttctt	ggacgaagca	aaccgttacg	aaatcgccga	cgaaactcgaa	240
ccgcaagata	aactgaaatt	taaagactcc	aaacgttaca	aagagcgtct	tgcgactgcg	300
cagaagagca	gtggcgaaaa	agatgcgctg	attgtatga	aaggcgagtt	gatgacgatt	360
ccagtcgtgg	cgtgtgcgtt	tgaattctcg	ttcatggcg	gttcaatggg	gtcggttgc	420
ggtgcgcgtt	tcgtgcgtgc	agttgaagcg	gcgattgaag	cgaactgtgg	tctggtctgt	480
ttctctgcca	gtggtggcg	acgtatgcaa	gaagcgctga	tgtcgctgat	gcagatggcc	540
aaaaccagtg	cagcgctcga	gcgtctaacf	gcgaaaggc	tcccgtttat	ctccgtgatg	600
acagacccaa	ccatgggtgg	ggtgtctgcg	agtctggcaa	tgctggcg	catcaacatc	660
ggtagccga	aagcaactgat	cggtttcg	ggtcgtcg	tgatcgagca	gaccgtgcgc	720
gaagagctgc	cggaaaggttt	ccaaacgcagc	gaattcctgc	tggagcacgg	tgcgattgat	780
atgatcgttt	accgtcgta	aatgcgtcag	cgtgtggctg	gcctgctggc	aaaaatgaca	840
cgtcaggagt	cggcgctgg	ggtttctgtg	aacgatgcgc	caaatacg	cgcatattct	900
gtaccagaag	cgaacaaaaa	aggtaa				927

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 2445

&lt;212&gt; ADN

<213> *Vibrio furnisii*

&lt;400&gt; 5

atggacatct	tgctctcaat	cttagggttc	gtggtcgtgt	taagcggtcg	cctgtaccac	60
agaacctcat	taatgactgc	cttagccgca	ctgaccgtga	ccatgttgggt	cctgtcggtt	120
tttggcccaag	tgggtatcat	cagctggcg	ctgtacttag	ccgctatcg	gttattggca	180
gtcccgtcaa	tccgtcaaag	tctcatcagc	ggtaagacac	taaaggtatt	caaaaaagta	240
ctgcctgcga	tgtcgacagac	agaaaaagaa	gcgcggatg	ctggcaccgt	gtggtggaa	300
gccgaactgt	tcaaaggcaa	accggactgg	caacagctga	gccatataaa	agcgccccaca	360
ctttctgccc	aagaacaggc	gttcctcgat	ggcccaagtga	acgaagtgtg	cgccatggtg	420
aacgactatc	aggtaactca	cgaattggcg	gatggcttc	cgaaagtgtg	gcaataacctg	480
aaagaccaca	aattttcgc	catgatcatt	aagaagcagt	acggcggtt	ggaattttcc	540
gcgtacgcgc	aatcgctgg	gtcacaaaag	ctgacggcg	tatcgccgt	gctctttcc	600
accgtcgccg	tgccgaactc	tctcgccccg	ggcgaactgc	tgcaacatta	cgccacccgac	660
gatcagaaag	attactacct	ccctcgtttg	gcggaaaggca	aagagattcc	atgtttcg	720
ctgaccagcc	cagaagcg	ctctgatgcg	ggctcgattc	cggattacgg	catcgatgc	780
aaagacgaat	gggaaggcaa	agaagtgcg	ggcatgcgc	tgacatggaa	caaacgcctac	840
atcacgctgg	cggcaggatgc	gacggttttt	ggtttggcct	ttaaactgcg	cgaccctgac	900
gggctattgg	gcgacaaaaa	agagattggc	atcacgtgt	cttgcattccc	gacacaccc	960
aaaggggtgg	aaatcgccaa	tcgtcacttc	ccattgaacg	tgccgttcca	aaatggcccg	1020
acgcgcgcga	acgatctatt	tgtgccgtc	gacttcatca	tcggtggccc	atcgatggcc	1080
ggccaagggtt	ggcgcatgc	ggtggaaatgt	ttatcagtgg	gtcgccgtat	tacgatgc	1140
tcgaactcaa	ctggcgccat	caaagcgccg	gcaatggcaa	cggcgctta	tgcgcgcatt	1200
cgtcgctagt	tcaagcaacc	cattggtcac	atgaaaggga	ttgaagaacc	tttggcgcc	1260

cttgcaggga acgcttacgt gatggatgca gcgagcaacc tcactgtcgc gggattgat	1320
gccggcgaaa aaccatcggt tatttctgcg attgtaaatg atcactgtac ccaccgcggc	1380
caacgctcaa tcatcgatgc aatggacatc gtcggcgca aaggcatctg tttgggcca	1440
tcgaacttcc ttgcgcgagg ttaccaaggt tccctatcg cgatcaccgt ggaaggcgcc	1500
aacattctga cccgctccat gatcatctt ggtcagggtg ctattcgctg ccatccgtac	1560
gttttgaag agatgaaagc agcgtattca gacagcgca atgcggtcg acaatttgc	1620
gccgcgctgg ctggccatgt cagcttacc atgagtaact tggtgcgctg catctggttt	1680
ggtctgaccg acgggttagg ctctgcccga ccaaccaaag atgccaccaa acgttactat	1740
cagcaactca accgttacag tgcaaacctt gccctgtgg ccgatatttc catggccgt	1800
ctgggtggct ccctgaaaacg taaagagcgc ctgtccgcgc gtttgggtga tattttaa	1860
caactttatc tcagctcagc aacgctgaag cgcttgaga atgatggtcg cccagcagaa	1920
gatttggcct tggtacactg ggggctgcaaa gacagcttga aacagaccg agtggcgatt	1980
gatgagttct tggcgaactt cccgaacaag gtgatcgca aagccctgcg tgtcttgatc	2040
atgccatggc gccgcgtgcg caaagcacca aacgacaagc tcgacagcaa agtggcgag	2100
atcattcaaa cgccaagtgc gacccgctca cgcatcggtc gtcatcgatc cctcgaaccg	2160
actgcacata acgcggtcgg caagattgaa ctggcgttga atgtgattct tcaagcagaa	2220
ccgggtttcg acaaggatcg caaagcgctg aacgaacgatc gcccattcac gcaattggat	2280
caagtggcac aatgtggcct tgagaaaag ctgatcaccg agcaagaagc cgaactgctg	2340
atcgaagccg agcaacacccg cttatacacc atcaatgtgg atgactttgc gccgcaggag	2400
tttagcagcaa aaaagtccaca acccaagctg gtcgaggatcg cgtga	2445

5  
 <210> 6  
 <211> 2424  
 <212> ADN  
 <213> *Vibrio furnisii*

<400> 6	
atgtcttctg gacactcatt ttgcgttcc ttgttggaaat taccactgtc tggttctggta	60
aaaggatcg gtcattccatc caatccgatc gatgtatcg agattgtatc taacaaggcg	120
atcgctatg cactaccctt tcgctccat gtcgacctgt tgacgctgc aacgcatcg	180
ttacaagccg gcctgcccgg tccgttagaa ccgctgacca ttcatatgtca caccgtgaaa	240
cgttacgtgt tcatctcgatc ggcggccacg ctgctgcaag atgacaatca ggtgccgacc	300
gattctatcg ccacattcag cgaaatgatc agcctgcattc aagaagattc ggagttggat	360
gtgcaggatca ttccgtccac cgtccgtgg ggacgcaaaac cggccaaaga aggtcgaa	420
cgtccatatt tgcaagccctt gaatggcccg caaaaagcca aagcggttt tgccgcccgg	480
cgggactgtt tggtgcgtt tagccccgtg gtctcgctgc gttatatggc cgactcgac	540
ggcacggatc cctcgattgc ccacaagctg gcacgtgtgg cgcgcattca cttctcacgt	600
cagaagctgg cggcgtctgg gcccggatcg ccacaacgccc accagttgtt ccaacgcttgc	660
atgaattcccc cagcgatcga aaaagcgatt gctgatgaag cggccgcgaa gaacatctcg	720
ctggagaaaag cgcgtaaaga agcgcacgac atgcttgcgaa aatcgccgc agatttctct	780
tactcggttgg tgcgcaagg cgatcgatc cttgggttgc tatggaaaccg catctatcaa	840

ggcttgaaca tcaataacgc cgcgacggtg cgccgcttgg cacaagatgg tcacgagatt 900  
 gtgtatgtgc cctgtcaccg cagccacatg gattacctgt tgctgtcata cgtgttgtat 960  
 cacgaaggca tggtcccccc gcacattgca gcaggtatta acctcaactt cttcccgcc 1020  
 ggaccgattt tccgcccgtgg tggcgcattc ttattcgtc gcagctttaa aggcaacaaa 1080  
 ctctattcaa ccattttccg cgagtatctg gcagagctgt ttgccaaagg ctactcggtg 1140  
 gagtacttca gtgaagggggg ccgctcacgc acaggtcgcc tgctgcaagc caaaaccggc 1200  
 atgctggcga tgaccattca agccatgttg cgccgtctca accgcccggc cacactggtg 1260  
 cccgtgtaca tcggctatga acatgtgatg gaagtggta cttacgccaa agagctgcgc 1320  
 ggttaaacgc aagagaaaga gaatgccagc ctagtgcgc gcaccattcg taaaactgcgc 1380  
 aacttcggtc aaggctacgt gaactttggt gagccgattc cattgaacca gttcttgaat 1440  
 gagcaagtgc ccgagtgac acaagacatc gatgccatgg gcgccagcaa accccagtgg 1500  
 atgacaccgg tggtaaccaa gctcgacgc aagatgatga cgcacattaa cgatgcagcg 1560  
 gcccgcataatg ccatgaccct atgtgcgacg ggcctttgg catcgctca ggcgcgcgtg 1620  
 gcccgtgaca atctggtaa gcagatcgat tgctaccgtc aactgctgcg caacgtgcgc 1680  
 tattccaaaca cctataccgt gccaagcgac agcgcggaaa gtttggtgcg gcacgccc 1740  
 tcactggata agtttggat gaaaaccgc accatggcg acatcatttc gctcgatcgc 1800  
 aatcagtcga ttctgtatgc ctactaccgc aacaacatca ttcacctgt ggcgttgcgc 1860  
 tcactgattt cgcaatgcgatgatgatgc gatccgtcag caacaaatgc cggtggaaaca gattcagacc 1920  
 tggttgcgaa aggtgtaccc attcctaaa caagagctgt tcctcagcca tggatgaaacg 1980  
 caactcgatg aggtggatgcgatgatgcgatgatgcgatgatgcgatgatgcgatgatgcg 2040  
 ctggacgatg gcattgccac catcaaccaa gcgcagacgc aggtgctgat gcttctgggt 2100  
 cgcaccatct ctgagacgct gcaacgctac ggcgcgtc tcaacctgtt ggtggctaac 2160  
 cctgagctgg gcaaattccga tctggaaagc aagagccaaag aaattgcgcgac ggcgtctgggt 2220  
 cgactgcacg gcatcaacgc ccccgagttt ttgcacaaag ggcgttctc atcgatgttt 2280  
 gtcacgctca aacagcaagg ttacctcgac agcgatggca actgccaccc cgaccagacc 2340  
 aaggacttct cgcgcgtctca ctttaccatg ctttaccctg aagtgcgcct gactattcag 2400  
 gaaagtatct gtcaggtggaa ataa 2424

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 2661

5 &lt;212&gt; ADN

<213> *Vibrio furnisii*

&lt;400&gt; 7

atgtctgaca tgaagcatga cgttagatgca ctggaaactc aggagtggtt agccgcactt 60  
 gagtcagttg tacgtgaaga aggctgtatg cgtgcccagt atctactaga agaagtactg 120  
 gaaaaagcac gtcttagacgg ctttgcgtatg ccaactggta ttacaactaa ctacatcaac 180  
 acgattcctg cggcgcaaga accggcatac ccaggcgaca cgaccattga acgtcgatt 240  
 ctttcgtatca ttgcgttggaa cgcgtatcatg atcgatctgc gtgcgtatgc gaaagaccc 300  
 gatctggcgcc ggcacatggc atcattccag tcttcgtatgc ctttgcgtatgc aacatgtttc 360  
 aaccacttct tccgtgcacc aaacgagaag gacgggtggtg acctgggtta ctaccaaggt 420

catatttctc cagggattta cgcgcgtgca	ttcggttgaag	gccgcctgac	agaaaaacaa	480
ctggataact tccgtcaaga	agtggatggc	aaaggtatcc	cttcctaccc	540
ctgatgcctg aattctggca	attcccaact	gtatcgatgg	gtctgggtcc	600
atctaccaag ctcgccttctt	gaaataacctg	gaaggccgtg	gcatgaaaga	660
cagcgcgttt	acgcgttctt	gggcgcacgg	gagatggatg	720
atttcttcg	cggcgcgtga	gaaactggac	aacctgtgct	780
caacgtctgg	atggcccagt	aatgggttaac	ggcaagatca	840
ttcaaaggcg	ctggctggaa	cgtggtaaaa	gtgatctggg	900
ctggcaaaag	acacttcagg	taaattgtcg	caactgtatga	960
taccaaacgt	tcaaagcgaa	agatggcgcg	tacgttcgtg	1020
ccagagacag	cagcgcgtgt	tgctgacatg	actgacgacg	1080
ggtggttacg	agtcttctaa	actgtacgca	gcgttcaaga	1140
cgtccaaccg	ttatcctcgc	gaagactgt	aaaggttacg	1200
ggtaagaaca	ttgcacacca	agtgaagaag	atggacatga	1260
aaccgtctgg	gtctgcaaga	cataatttct	gatgaagaag	1320
aaacttggaaag	aaggttcaaa	agaattcgaa	tacctgcacg	1380
ggttacacgc	cacagcgtct	gcctaagttc	acacaagagc	1440
gagttcaaacc	cgtttctgga	agaacagaaa	cgtgaaatct	1500
cgtgcactga	acattctgtt	gaaagacaaa	aatattgtt	1560
gctgacgaag	cacgtacttt	cgttatggaa	ggtctttcc	1620
ccacacggcc	agacgtacac	gcctgaagac	cgtggcgtgg	1680
actgcaggtc	aggtactgca	agaagggatc	aacgaactgg	1740
gcccgtgcga	catcttacag	caccaacaac	ctgccaatga	1800
tcaatgttcg	gtttccaacg	cgttggcgac	atggcatgga	1860
cgtggtttcc	tactgggcgc	aacggctggc	cgtacaaccc	1920
cacgaagatg	gtcactcaca	cattcaagcc	gcgacaattc	1980
ccaacattcg	cttacgaagt	tgccgtgatc	atgcaagacg	2040
gatcaagaga	acgtgttcta	ctacatgacg	ctgatgaacg	2100
atgccagaag	gcmcagaaga	aggtatccgt	aaaggtatct	2160
ggttctaaag	gttaagggttca	actgtatgac	tcaggtacta	2220
gcggcagtga	tcctgagcga	agaatacggc	atcgcgtctg	2280
ttcaacgaac	tggctcgta	tggtcagaac	gtcgagcg	2340
gccgaagcgc	aagtaccta	catcgcttca	gtgatggaa	2400
accgactaca	tgaagaacta	cgctgaccaa	gttcgcgt	2460
aaagtgtcg	gtactgacgg	ttcggtcg	tcagacagcc	2520
ttcgaagtga	acgcaggcta	cgtcggtt	gctgcgtt	2580
gaagttgaga	aatctgtggt	ggcggaaagct	atcaagaaat	2640
actaaccgc	tatacgctta	a		2661

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

5 <400> 8  
atggctatcg aaatttacgt accagatatc ggtgcagatg aggttgaagt gactgagatt 60  
cttgcagcg taggcgacaa ggttgaagaa gaacaatctc tgattactgt tgaaggcgac 120  
aaagcttcta tggaaattcc tgcgtctcag gccggatttg tcaaagaaat caaagttgtg 180  
actggtgata aagtacaac tggctcaactg atcatggtgt ttgaagcgg aagttcagca 240  
gcggctgcac cagcacctgc ggcggaaagca gcaccaggatg cggcagcacc agcagccgtt 300  
gaactgaaag aagttaacgt accggacatc ggcggtgacg aagttgaagt gactgaaatc 360  
atggttgcgg tgggtgacac cgtgtctgaa gagcagtcgc tgatcaccgt tgaaggcgac 420  
aaagcgtcaa tggaaagtgcc tgcgccattc gcgggtaccc tgaaagagat caagatcgca 480  
tcgggtgaca aagtgaccac aggctcaactg atcatggtct tcgaagttggc cggttctggt 540  
gcgccagcag cggcagcgcc agctcaggca gcggctccag cagcagcgcc agcggtagca 600  
gcagataaag aagttaacgt gccagatatc ggcggcgatg aagttgaagt gactgaaatc 660  
atggttcag tggcgacat ggtgagcgaa gagcaatctc tgatcactgt ggaaggcgac 720  
aaagcgtcga tggaaattcc tgcaccattc gcgggtaaag tgaaagcgat caaagtcgac 780  
gctggcgaca aagtgtcgac tggctcaactg atcatggtgt ttgaagttggc aggcgac 840  
ccggcagctg tttcagcacc agctcaagcc gcagcacctg cagcagcgcc accgaaagct 900  
gaagcgccag cggcagcagc acctgcagcg gcaaccggcg acttccaaga gaacaatgaa 960  
tacgcacacg cgtcgccagt ggttcgtcgc ttagcgcgtg aattcggtgt gaacctgtct 1020  
aaagtgaaag gttcaggctcg taagagccgc attctgaaag aagatgttca gaactacgtg 1080  
aaagaagcgc tgaaacgcct agaattcaggc gcagcatcag ccgcattctgg caaaggcgac 1140  
ggcgcagcac tttggcctgct accttggcca aaagtggact tcagcaagtt cggtgacact 1200  
gaaattcagc cactgtctcg cattaagaag atctctggcg cgaacctgca ccgttaacttgg 1260  
gtgatgatcc cgcacgtgac ccagtggat aacgcagaca tcacagaact agaagcttcc 1320  
cgtaaaaac agaacgcgt cgaagcgaag aaagacactg gcatgaagat cacgcactg 1380  
gtgtttatca tgaaaggcgc tgcggaaagcg ctggaaagcat tccctgcgtt caactcgct 1440  
ctgtctgaag atggtgaaag cctgattctg aagaaatacg tgaacatcg tgcgcgtt 1500  
gatacaccaa acggctctgg tttccctgtg ttcaaaagacg tgaacaagaa aggcatattac 1560  
gagctgtctg aagagttggc agtcgtatcg aagaaagcac gtgcaggtaa actgacggcg 1620  
tctgacatgc aaggcggctg tttcaccatc tctagtcgg gtggatcg cggtacagca 1680  
ttcacaccaa tcgtgaatgc accagaagta ggtattctgg gtgtgtctaa gtctgaaatg 1740  
aagccagtgt ggaacggcaa agaatttgcg ccacgtctgc aactgcctct gtctctgtca 1800  
tacgaccacc gtgtgatcga tggcgcgaa ggtgcacgct tcattcaacttta cttgaacggt 1860  
tgccttgcgtcg acattcgatcg tctggttctg taa 1893

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

1400-8

atgtatagca aaattttagg tacaggcagc tacctgccat ctcaggtgcg tactaacgcg 60  
gat tagaga aaatggtaga tacaagtgtat gagtggatttgcg tgcgtac tggtattcgc 120  
gagcgtcgta ttgccgcaga taatgaaacc gttgccata tgggctttta cgcgcgcgaa 180  
aacgctatttgcg agatggcggg cattgataaa aacgacatcg atttaatcat ccttgccacg 240  
accagtagca gtcacacgtt cccttcgtct gcctgtcagg tgcaagcgaa actgggcatt 300  
aaagggttgcgcgaa cagcgtttga ccttgcggca gcgtgttctg gttttatcta cggattgtca 360  
gtcgccgatc aacacatcaa atcgggcatg tgtaaaaacg tgctggtgat tggtgccat 420  
gcgttgtcaaa aacgtgtga cccaaaccgat cgctcaacca ttatccgtt tggtgatgg 480  
gcgggtgcgg ttgtggttgg tgccagtgaa gaacctggca ttttgcgac tcattttac 540  
gctgatggtc aattcggcga cctgctcagc ctggaaagtac cagagcgtgg cggtgatgtg 600  
gacaaatggc tatatatggc cggcaacgaa gtgttcaaag tggcggtgac gcagctttca 660  
aaactggtca aagacacgct ggcagccaaac aatatgcaca agtctgaact agactggttg 720  
gtaccgcatttgcgacta aagcgaacta tcgcattatt tctgcgacgg cggatcaaaatt gtcgatgtcg 780  
ctggatcaag tggtgatcac gttggaccgt catggaaaca cgtctgctgc aacggtgccg 840  
acggcactgg acgaagcggg acgtgatggc cggatcaaaac ggggtcagac gctactttta 900  
aaagcctttg tggtgggtt caccctgggt tctgcgttag tgaagttctta a 951

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

<400> 10  
atgagcaagt ttgctatcgatttccaggt caaggttctc aagcggttgg tatgcttgcc 60  
gagcttggcg aacagtatga cgtatgtaaa caaaactttcg cagaagcgctc tgacgcactg 120  
ggttacgacc tatgggcatt gggtcagaac ggtcctgttg aagatctcaa ccagactttc 180  
cgtacgcaac ctgcactgct ggcgtcttct gtggcgattt ggcgtgtatg gcaagcgctg 240  
ggtcttgggc agccagaagt gctggcaggc cacagccttg gtgaatactc tgcactggtt 300  
tgtgcccggcg tgattgattt taaagccgcg atcaaattgg tcgaactgcg tggtcaactg 360  
atgcaagaag cagtagccgcg aggaaccggc gcaatgtacg cgatcatcgg tttggatgtat 420  
gcggcgattt ccaaagcggt tgaagacgct ggcgaaggcg acgtgggtgtc tccgggtgaac 480  
ttcaactcac caggccaagt ggtcattgcc ggtcagaaag atgcggtaga acgcgcgggc 540  
gcactgtgtaa aagaagcgccc cgcaaaacgt gcactgccac tgccgggtgtc agtgccttca 600  
caactgcgcgc tgatgaaaacc tgcagcagaa aaactggctg tggcgctaga agcgcttgag 660  
ttcaacgcgcg cgcggatccc agtgattaaac aacgtggacg ttgcgcacaga aacggatcca 720  
gcggaaaatca aagatgcgtt gggtcgtcaa ctacacagcc cagtcggctg gacagaaggc 780  
gtggagaaga tggcagcaca aggcattgaa aaactaattt aagttggcccc aggcaaagta 840  
ctgactggtt tgactaaacg tattgtgaaa acgcttgatg cagcagcagt gaacgcacatc 900  
gcttcactgg aagccgttaa gtaa 924

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

<400> 11  
 atgagtaatt tcatgaacct ggaaggcaaa attgtcctgg ttactggcgc aagccgtggt 60  
 atcggtaaag caatcgccga actattggtt gaacgtggc ccacagtat tggcacagcg 120  
 accagcgaaa gcggcgcaga tgcgatcagt gcgtacctag gcgacaacgg caaaggctcg 180  
 gcgttgaatg tgacagatgt agcgtctatc gaatccgtgc tgaaaagcat taacgatgaa 240  
 ttcggcggtg ttgatattctt ggtacaacac gcgggtatca cgcgtgacaa cctgctgatg 300  
 cgtatgaaag atgacgagtg gaccgatatt ctggataccatcacttgcgtc gatctccgt 360  
 ctgtctaaag ctgtacttcg tggcatgatg aaaaaacgcc aaggccgtat cattaatgtc 420  
 ggttctgttg tcggtacaat ggttaacgcg ggtcaaacaa actacgcagc cgccaaacgcg 480  
 ggcgtaatcg gctttacgaa gtcataatggca cgtgaagttt catccgtgg cgtgaccgtg 540  
 aacacagttt caccaggatcatcgaaacg gatatgacaa aagcgctgaa tgacgaccaa 600  
 cgtgctgctca cacttgcaca agtgccagca ggtcgctgg gtgatccacg tgaaatcgca 660  
 tccgcgggttgcattcttggc atctccagaa gcagcgtaca ttaccggtaa aactctgcac 720  
 gttaacggcg gaatgtacat ggtttaa 747

5 <210> 12  
 <211> 525  
 <212> ADN  
 <213> *Vibrio furnisii*  
 <400> 12  
 gaagtgaacg gaacttgcgttgc ggtaaaaatgt tgacttcgtc caaaacttgcgttcaatgaaatg 60  
 cgcaagattt gtgcgtatata tatgtcaaaa atgggtgtgaa tttcggttaa aatcgccaaa 120  
 tttgtggttt gaccagcaag gtcccccgttgc caactttcac tagtttgcattaaactacggat 180  
 atcatcgcat taggcgaaat ctgtaaagga aaagaaaaaa tgagcaacat cgaagaacgc 240  
 gtaaaagaaaaa tcatcggttgc acagcttaggc gttagacgaa cagaagtgaa aaacgaagct 300  
 tctttcggttgc aagacctagg tgccgattctt ctagacactg tttagctgttatggctctg 360  
 gaagaagaat tcgacactga gattcctgtat gaagaagcag agaaaatcac tactgttcaa 420  
 gctgcgtatcg attacgtaaa cagcgttgcgtaatgttcttccctctggcc 480  
 gcctgagttt ttcttactca tctataatcttctcatagaat tttca 525

10 <210> 13  
 <211> 1251  
 <212> ADN  
 <213> *Vibrio furnisii*  
 <400> 13  
 atgatcggttgc ccaagcgtcg tgcgttgc actggcatgg gtatgttgc accggtaggc 60  
 aacactgttag aatcttcttgc gaaagccctg ctagctggc aaagtggatcgatcgat 120  
 gaacacttttgc atacaacaaa ttctcaact cgtttcgatgc gtcgttgcgaa agatccaaac 180  
 tgcgtatcgat acatgtctaa aaaagatgcc cgtaaaatgg atttattttat ccagtgatcgat 240  
 atttgcgttgcg gcatccaaacgc gcttagacgat tctggctgg tgcgttgcgatgcg agaaaacgcg 300

ccacgcgtcg	gtgttgcaat	cggtcgccc	atcggtggtc	ttgatttgat	cgaaaaaggt	360
catcaagcgc	ttatggagaa	aggccacgt	aaagtggagcc	cattttcggt	cccttcaacc	420
atcgtaaca	tggttgccgg	taacttatct	atcatgcgtg	gtttcggtgg	tcctaacatc	480
gcgatttcaa	ctgcgtgtac	cacaggtttta	cataacatcg	gccacgcggc	gcgtatgatt	540
gcatacggcg	atgcggaaagc	gatggttgct	ggtggtagtg	aaaaagcgtc	tacccctctg	600
ggtagtggctg	gtttcggtgc	cgctaaagcg	ctgtctacac	gcaacgatga	acctgaaaaa	660
gcttctcgcc	cttgggacaa	agaccgtgac	ggttttgttc	tgggtgacgg	cgcaggcgtg	720
atggttctgg	aaggatacga	acacgaaaaa	gcgcgtggcg	cgaaaaatcta	cgcagaaatc	780
gtaggcttcg	gtatgtccgg	tgacgcgtac	cacatgactt	cgccaaagcga	agatggttca	840
ggtagcgcgc	tggctatgga	agcggcgatg	cgtgatgcag	cactagcggg	tacacaaatc	900
ggctacgtga	acgcgcacgg	tacgtcaaca	ccagcaggtg	acgtagcgg	agtggaaaggt	960
atcaaacgtg	cacttggcga	agacggtgcg	aaacaagtac	tgatctttc	aaccaaatcg	1020
atgaccggtc	acctactggg	tgctgcaggc	tcggtagaag	ccatcattac	cgtgatgtct	1080
ctggttgacc	aaatcgttcc	gccaaccatc	aacctggata	atccagaaga	aggtttgggc	1140
gtggatttgg	ttccgcacac	agcacgtaaa	gtggaaaggca	tggaaatacgc	gatgtgttaac	1200
tcgtttggct	ttggtgacac	aaacggttca	ctgatcttca	agcgcgtata	a	1251

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 1035

&lt;212&gt; ADN

<213> *Vibrio furnisii*

&lt;400&gt; 14

atgactgatt	cacacacaaa	caatgcattac	ggtaaagcga	tcgcacatgac	cgtcattggc	60
gcggggttcgt	acggcacatc	tctggccatt	tctttggctc	gcaacggcgc	caatgttgc	120
ctgtggggac	acgatccggt	ccacatggcg	cgtttggaaag	cggaacgtgc	taaccacgaa	180
ttcctccctg	acatcgattt	tccaccgtcg	ctgatcattt	aatccgattt	gcaaaaagcg	240
gtgcaagcga	gccgcgatct	gctgggtggtg	gtgccaagcc	atgtgtttgc	gattgtgctc	300
aacagcctgc	aaccttactt	gcgagaagat	acccgtatct	gctgggcaac	caaagggttg	360
gaaccggaca	caggacgttt	gctgcaagat	gtggcgcatt	acgtgctggg	tgaatcccat	420
ccattggcg	tgctgtctgg	cccgacgttt	gcaaaagagc	tggcgatggg	tatgcccact	480
gcgatttcag	tggcatcgcc	tgacgcgcag	tttgcgcgg	atctgcagga	aaagattcac	540
tgcagcaaaa	ccttccgtgt	ttatgccaac	agcgatttca	tcggcatgca	actggggggc	600
gctgtgaaga	acgtgattgc	cattggtgcg	gggatgtcgg	atggcattcg	ctttggtgcc	660
aacgctcgta	cggcgctgat	tacccgtgg	ttggcgaaaa	tgacccgtct	gggcgcggcg	720
ctgggcgcgc	agccggaaac	cttcatgggc	atggcggggc	tgggtgattt	ggtgctgacg	780
tgtaccgata	accaatcgcg	caaccgtcgt	tttggtttgg	ccttggggcca	aggcaaagat	840
gtcgatacgg	cgcaacaaga	tatcggtcaa	gtgggtggaaag	ggtatcgaa	caccaaagag	900
gtgtggctac	tggcgcacag	catggcgtg	gagatgcca	tagttgaaca	aatttatcaa	960
gtattgtatc	aaggaaagga	cgcggcgt	gcagcacaag	atttgcggc	gcgcgataaa	1020
aaagcagaac	gataa					1035

5

&lt;210&gt; 15

10

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

5 <400> 15  
 gtgggtgtgtg cgtttgcgaa cgacgatttgc agtgcgaccg tggtaagaactgtatcaa 60  
 gggggcactc gcctgatcgc catgcgctgc gcgggcttgc ataaagtggat ttttagacgcc 120  
 gcaaaaacgca ttggcatgca ggtggttcgc gtacctgcgt attcaccaga agcggtgca 180  
 gagcacgcgg tcgggtgtat gatgtgtctg aaccgcgtt accacaaagc gtatcagcgc 240  
 acacgtgagg ccaacttctc gttggaaaggc ttgggtggct ttaacttcta tggcaaaacc 300  
 gtgggtgtga ttggttcagg caagattggc attgcagcga tgcgtatcct caaaggcctt 360  
 ggcatgaaca ttctctgttgc tgacccgtat gaaaaccat tggccattga aatcggcgcg 420  
 aaatacgttc aattgccgga gctgtatgca aacagcgcaca tcattacgct gcactgccc 480  
 atgaccaaag aaaactacca cctgctggat gagcaagcgt tcgctcaaattt gaaggatggg 540  
 gtgatgatca tcaataccag ccgtggcgaa ttgcttgatt cagtcgcagc cattgaagcg 600  
 ctcaaaacgtg gcccgttggc cgccgtggc tttagacgtat acgacaacgaa aaaagatctg 660  
 ttcttccaag acaagtcgaa cgtgtgattt gtagatgacg tggccatcg cctgtccgccc 720  
 tgccataacg tgctgtttac cggccatcag gcgttttgc cagaagatgc cctgcacaat 780  
 atcgcgcaaa ccacgcttaa caacgtgctg gcgtttgagc aaggcaccaa atctggaaac 840  
 gaatttagtta actaa 855

10 <210> 16  
 <211> 177  
 <212> PRT  
 <213> *Vibrio furnisii*

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(2)  
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<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 furnisii*

<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 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 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

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

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 814

&lt;212&gt; PRT

<213> *Vibrio furnisii*

&lt;400&gt; 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

5 <212> PRT

<213> *Vibrio furnisii*

<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

385	390	395	400
Met Leu Ala Met Thr Ile Gln Ala Met Leu Arg Gly Leu Asn Arg Pro			
405 410 415			
Val Thr Leu Val Pro Val Tyr Ile Gly Tyr Glu His Val Met Glu Val			
420 425 430			
Gly Thr Tyr Ala Lys Glu Leu Arg Gly Lys Arg Lys Glu Lys Glu Asn			
435 440 445			
Ala Ser Leu Val Leu Arg Thr Ile Arg Lys Leu Arg Asn Phe Gly Gln			
450 455 460			
Gly Tyr Val Asn Phe Gly Glu Pro Ile Pro Leu Asn Gln Phe Leu Asn			
465 470 475 480			
Glu Gln Val Pro Glu Trp Thr Gln Asp Ile Asp Ala Met Gly Ala Ser			
485 490 495			
Lys Pro Gln Trp Met Thr Pro Val Val Asn Lys Leu Ala Thr Lys Met			
500 505 510			
Met Thr His Ile Asn Asp Ala Ala Ala Asn Ala Met Thr Leu Cys			
515 520 525			
Ala Thr Ala Leu Leu Ala Ser Arg Gln Arg Ala Leu Ala Arg Asp Asn			
530 535 540			
Leu Val Lys Gln Ile Asp Cys Tyr Leu Gln Leu Leu Arg Asn Val Pro			
545 550 555 560			
Tyr Ser Asn Thr Tyr Thr Val Pro Ser Asp Ser Ala Glu Ser Leu Val			
565 570 575			
Gln His Ala Glu Ser Leu Asp Lys Phe Val Val Glu Thr Asp Thr Met			
580 585 590			
Gly Asp Ile Ile Ser Leu Asp Arg Asn Gln Ser Ile Leu Met Thr Tyr			
595 600 605			
Tyr Arg Asn Asn Ile Ile His Leu Leu Ala Leu Pro Ser Leu Ile Ala			
610 615 620			
Gln Met Leu Ile Arg Gln Gln Gln Met Pro Val Glu Gln Ile Gln Thr			
625 630 635 640			
Cys Val Ala Lys Val Tyr Pro Phe Leu Lys Gln Glu Leu Phe Leu Ser			
645 650 655			
His Asp Glu Thr Gln Leu Asp Glu Val Val Met His Tyr Leu Ala Glu			
660 665 670			
Leu Gln Arg Gln Gln Leu Val Thr Leu Asp Asp Gly Ile Ala Thr Ile			
675 680 685			

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

5 <212> PRT

<213> *Vibrio furnisii*

<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 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 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

5 <212> PRT

<213> *Vibrio furnisii*

<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 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 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

420

425

430

Asp Ile Thr Glu Leu Glu Ala Phe Arg Lys Glu Gln Asn Ala Ile Glu  
 435 440 445

Ala Lys Lys Asp Thr Gly Met Lys Ile Thr Pro Leu Val Phe Ile Met  
 450 455 460

Lys Ala Ala Ala Lys Ala Leu Glu Ala Phe Pro Ala Phe Asn Ser Ser  
 465 470 475 480

Leu Ser Glu Asp Gly Glu Ser Leu Ile Leu Lys Lys Tyr Val Asn Ile  
 485 490 495

Gly Ile Ala Val Asp Thr Pro Asn Gly Leu Val Val Pro Val Phe Lys  
 500 505 510

Asp Val Asn Lys Lys Gly Ile Tyr Glu Leu Ser Glu Glu Leu Ala Val  
 515 520 525

Val Ser Lys Lys Ala Arg Ala Gly Lys Leu Thr Ala Ser Asp Met Gln  
 530 535 540

Gly Gly Cys Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gly Gly Ile Gly Gly Thr Ala  
 545 550 555 560

Phe Thr Pro Ile Val Asn Ala Pro Glu Val Gly Ile Leu Gly Val Ser  
 565 570 575

Lys Ser Glu Met Lys Pro Val Trp Asn Gly Lys Glu Phe Ala Pro Arg  
 580 585 590

Leu Gln Leu Pro Leu Ser Leu Ser Tyr Asp His Arg Val Ile Asp Gly  
 595 600 605

Ala Glu Gly Ala Arg Phe Ile Thr Tyr Leu Asn Gly Cys Leu Ser Asp  
 610 615 620

Ile Arg Arg Leu Val Leu  
 625 630

<210> 24

<211> 316

<212> PRT

<213> *Vibrio furnisii*

<400> 24

Met Tyr Ser Lys Ile Leu Gly Thr Gly Ser Tyr Leu Pro Ser Gln Val  
 1 5 10 15

Arg Thr Asn Ala Asp Leu Glu Lys Met Val Asp Thr Ser Asp Glu Trp  
 20 25 30

Ile Val Thr Arg Thr Gly Ile Arg Glu Arg Arg Ile Ala Ala Asp Asn  
 35 40 45

Glu Thr Val Ala Asp Met Gly Phe Tyr Ala Ala Gln Asn Ala Ile Glu

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*

<400> 25

Met Ser Lys Phe Ala Ile Val Phe Pro Gly Gln Gly Ser Gln Ala Val

1

5

10

15

Gly Met Leu Ala Glu Leu Gly Glu Gln Tyr Asp Val Val Lys Gln Thr  
 20 25 30

Phe Ala Glu Ala Ser Asp Ala Leu Gly Tyr Asp Leu Trp Ala Leu Val  
 35 40 45

Gln Asn Gly Pro Val Glu Asp Leu Asn Gln Thr Phe Arg Thr Gln Pro  
 50 55 60

Ala Leu Leu Ala Ser Ser Val Ala Ile Trp Arg Val Trp Gln Ala Leu  
 65 70 75 80

Gly Leu Glu Gln Pro Glu Val Leu Ala Gly His Ser Leu Gly Glu Tyr  
 85 90 95

Ser Ala Leu Val Cys Ala Gly Val Ile Asp Phe Lys Ala Ala Ile Lys  
 100 105 110

Leu Val Glu Leu Arg Gly Gln Leu Met Gln Glu Ala Val Pro Ala Gly  
 115 120 125

Thr Gly Ala Met Tyr Ala Ile Ile Gly Leu Asp Asp Ala Ala Ile Ala  
 130 135 140

Lys Ala Cys Glu Asp Ala Ala Gln Gly Asp Val Val Ser Pro Val Asn  
 145 150 155 160

Phe Asn Ser Pro Gly Gln Val Val Ile Ala Gly Gln Lys Asp Ala Val  
 165 170 175

Glu Arg Ala Gly Ala Leu Cys Lys Glu Ala Gly Ala Lys Arg Ala Leu  
 180 185 190

Pro Leu Pro Val Ser Val Pro Ser His Cys Ala Leu Met Lys Pro Ala  
 195 200 205

Ala Glu Lys Leu Ala Val Ala Leu Glu Ala Leu Glu Phe Asn Ala Pro  
 210 215 220

Gln Ile Pro Val Ile Asn Asn Val Asp Val Ala Thr Glu Thr Asp Pro  
 225 230 235 240

Ala Lys Ile Lys Asp Ala Leu Val Arg Gln Leu His Ser Pro Val Arg  
 245 250 255

Trp Thr Glu Gly Val Glu Lys Met Ala Ala Gln Gly Ile Glu Lys Leu  
 260 265 270

Ile Glu Val Gly Pro Gly Lys Val Leu Thr Gly Leu Thr Lys Arg Ile  
 275 280 285

Val Lys Thr Leu Asp Ala Ala Val Asn Asp Ile Ala Ser Leu Glu  
 290 295 300

Ala Val Lys

305

<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

<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

5 <212> PRT

<213> *Vibrio furnisii*

<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 Gln 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 Gln 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

5 <212> PRT

<213> *Vibrio furnisii*

<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 2 529 176 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 una acetil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.2), una acil-CoA sintasa (EC 2.3.1.86), una acil-CoA reductasa (EC 1.2.1.50) y una tioesterasa (3.1.2.-, 3.1.1.-) para su uso en la producción de un alcohol graso, en el que dichas secuencias de ácido nucleico se sobreexpresan.
- 5 2. Microorganismo según la reivindicación 1, en el que aproximadamente el 50% del alcohol graso producido se libera del microorganismo cuando se hace crecer a 37°C.
- 10 3. Microorganismo según la reivindicación 1 ó 2, en el que el microorganismo expresa además una o más secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican para fabA (EC 4.2.1.60), fabB (EC 2.3.1.41), fabD (EC 2.3.1.39), fabG (EC 1.1.1.100), fabH (EC 2.3.1.180), fabI (EC 1.3.1.9) y fabZ (EC 4.2.1.-).
- 15 4. Microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una secuencia de ácido nucleico endógeno atenuado que codifica para fadE (EC 1.3.99.3, 1.3.99.-).
- 5 5. Microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho microorganismo expresa además 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 (EC 1.2.4.4), IlvE (EC 2.6.1.42), Lpd (EC 1.8.1.4), Ccr (EC 1.1.19), IcmA (EC 5.4.99.2), IcmB (5.4.99.13), fabH (EC 2.3.1.180), fabF (EC 2.3.1.179), fabH3 (EC 2.3.1.180), fabC3 (NP\_823468), beta-cetoacil-ACP sintasa II (EC 2.3.1.180), enoil-CoA reductasa (EC 1.3.1.34), enoil-CoA isomerasa (EC 4.2.1.-), y combinaciones de las mismas, en el que el derivado de ácido graso está ramificado.
- 20 6. Microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el alcohol graso comprende de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 dobles enlaces.
7. Microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el alcohol graso comprende una longitud de cadena de carbono de desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 30.
- 25 8. Microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el alcohol graso comprende de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 puntos de ramificación.
9. Microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el microorganismo es *E. coli*.
10. Método de producción de un alcohol graso que comprende cultivar el microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en condiciones suficientes para producir un alcohol graso; y separar el alcohol graso.
- 30 11. Método de obtención de un alcohol graso purificado que comprende,
  - a) cultivar un microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en condiciones suficientes para producir un alcohol graso;
  - b) permitir que el alcohol graso se separe en una fase orgánica; y
  - c) purificar el alcohol graso de la fase orgánica.

35

FIG. 1

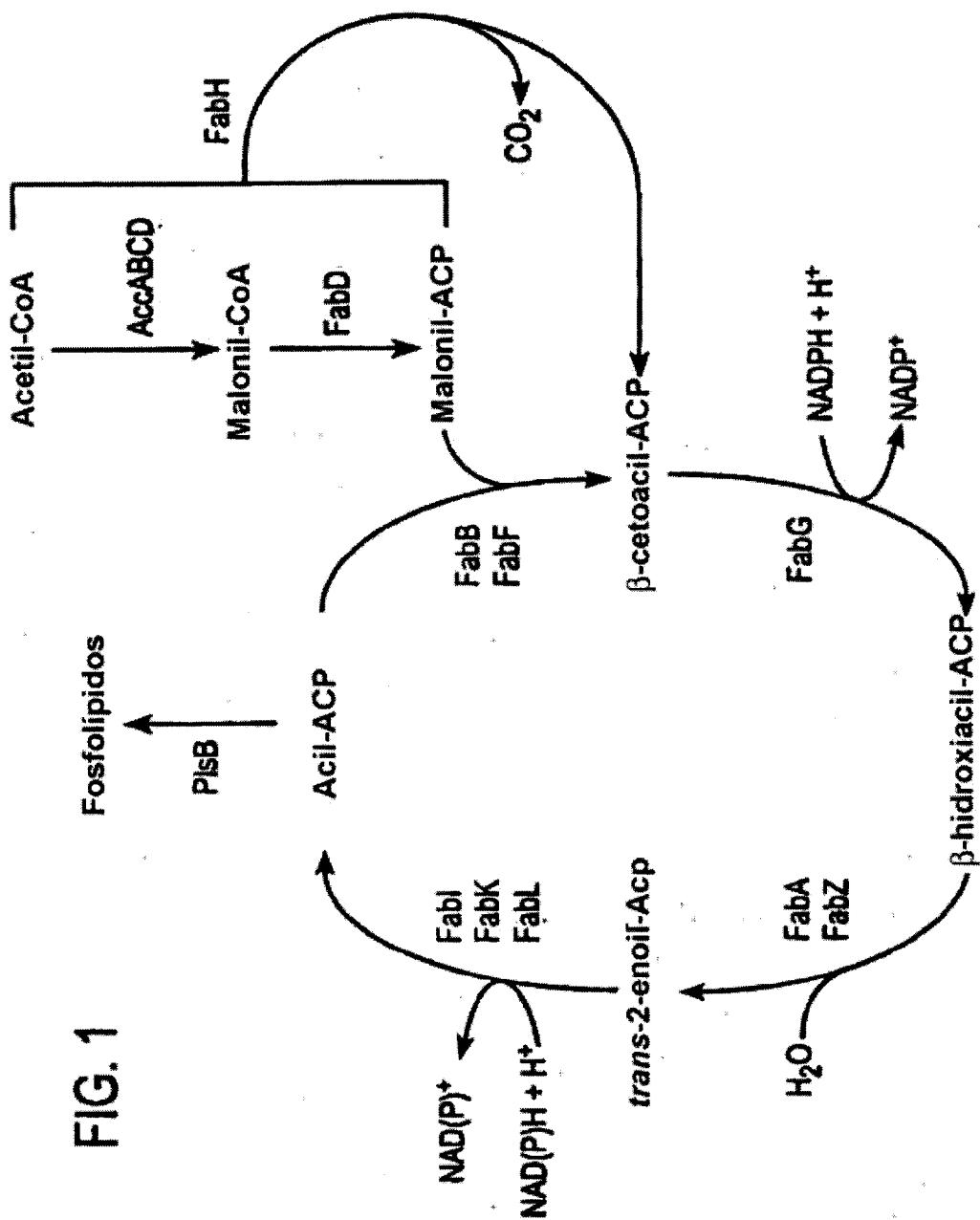
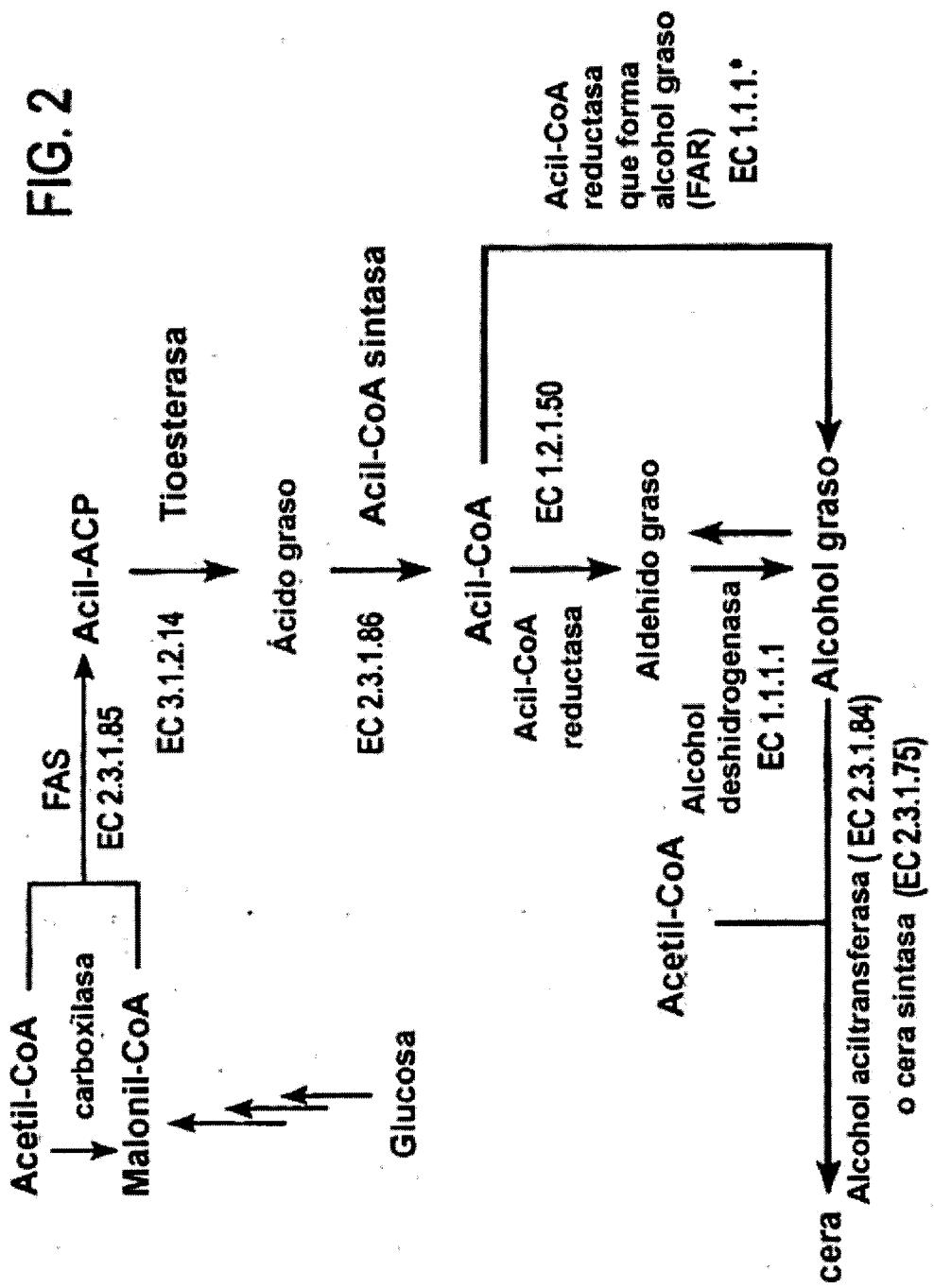


FIG. 2



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

FIG. 3

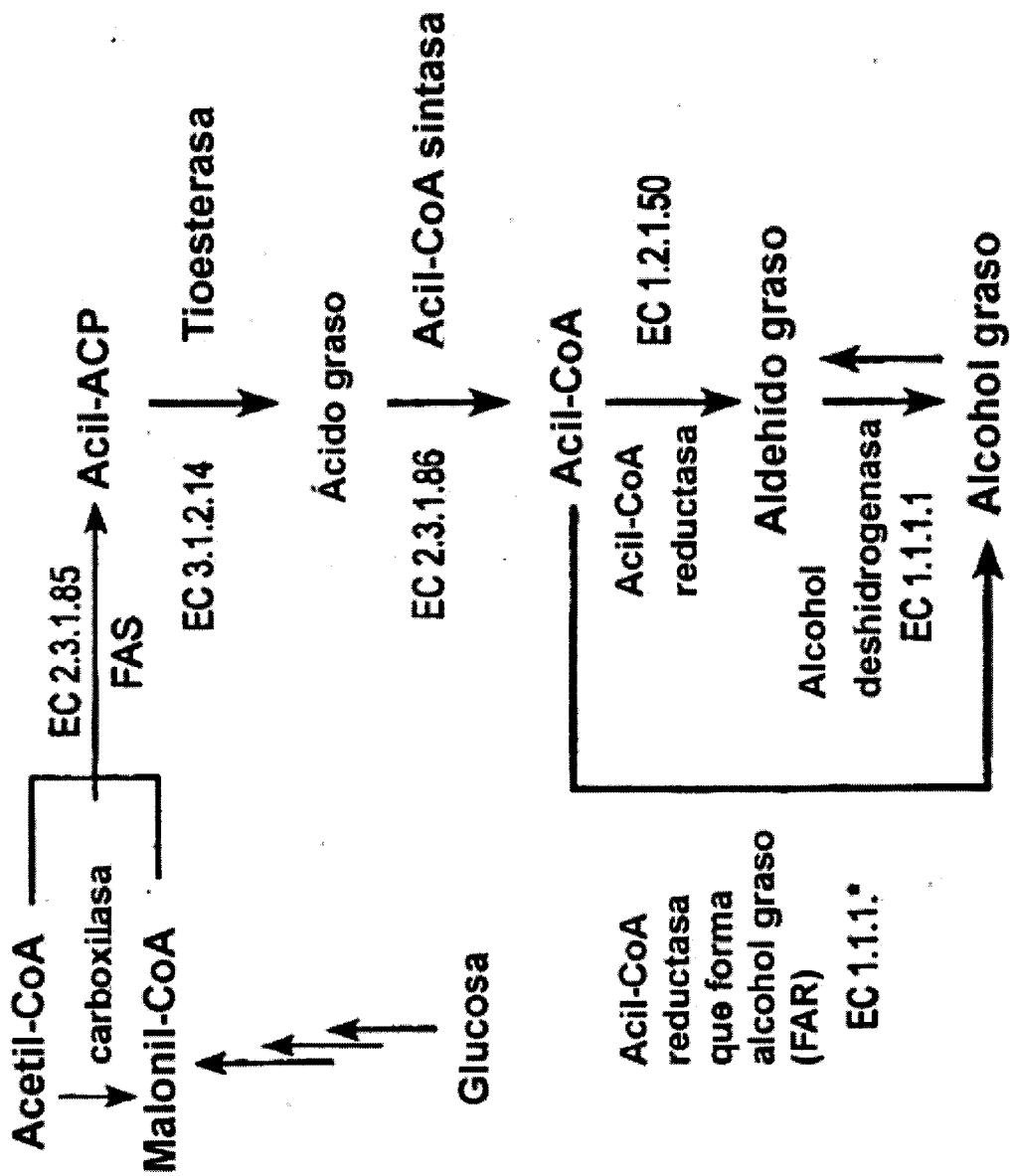
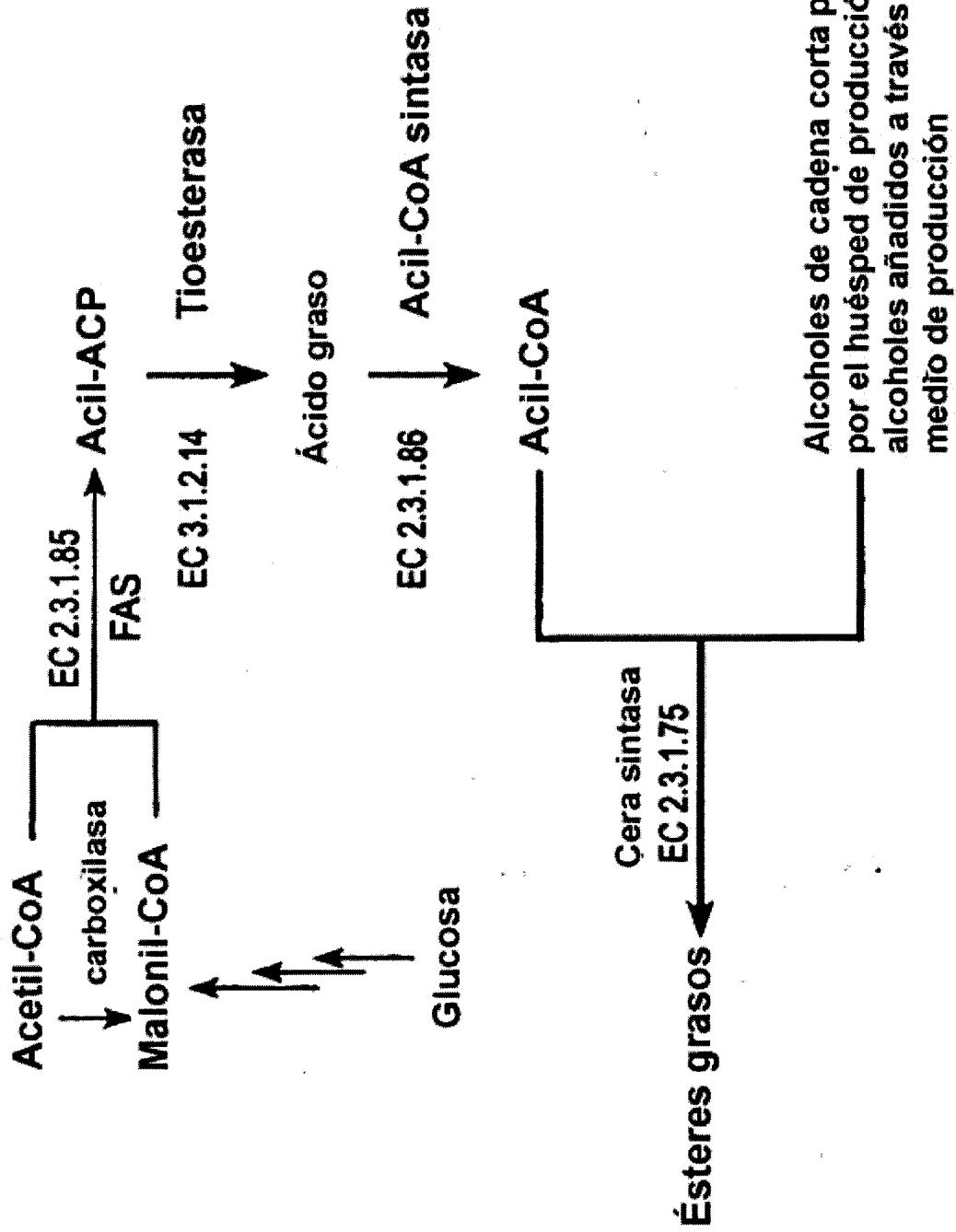


FIG. 4



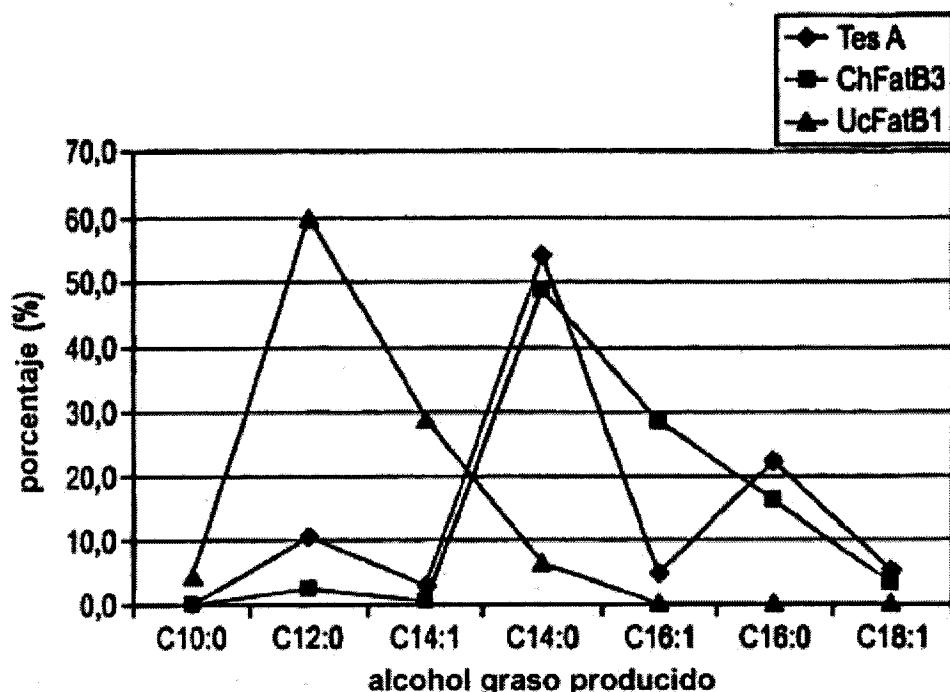


FIG. 5

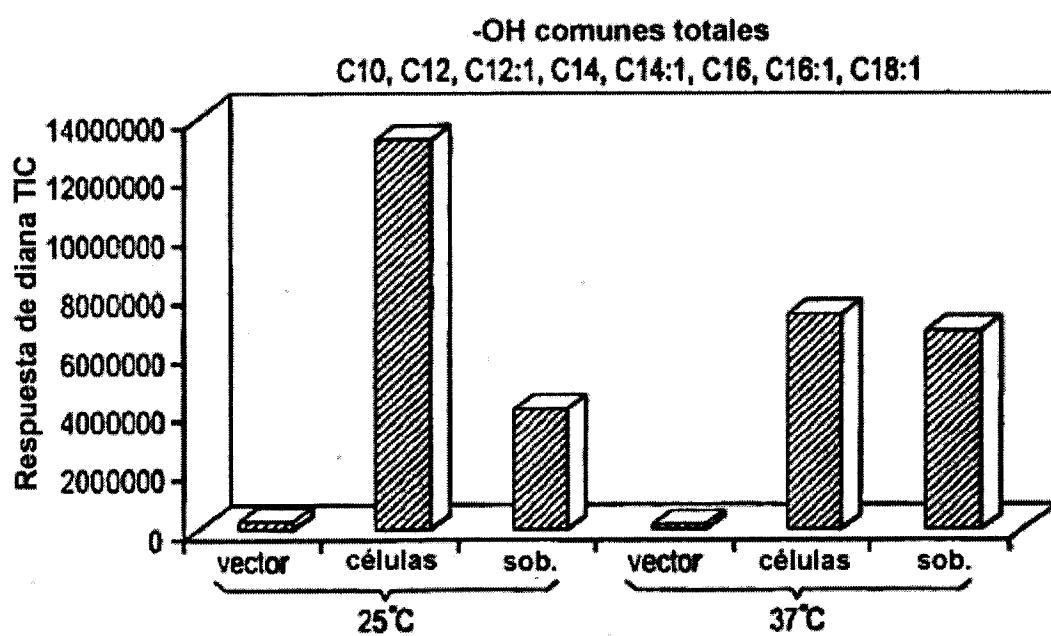


FIG. 6

FIG. 7A

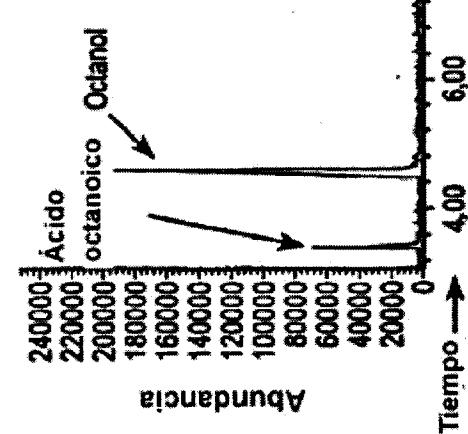


FIG. 7C

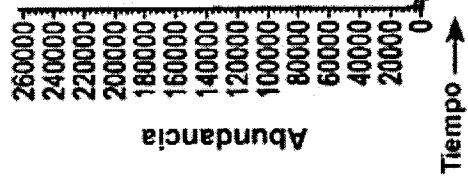


FIG. 7B

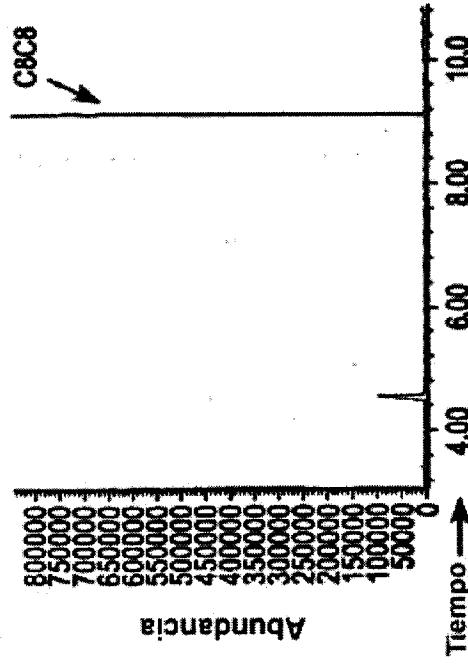
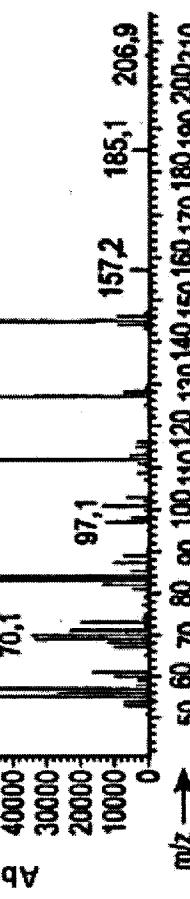
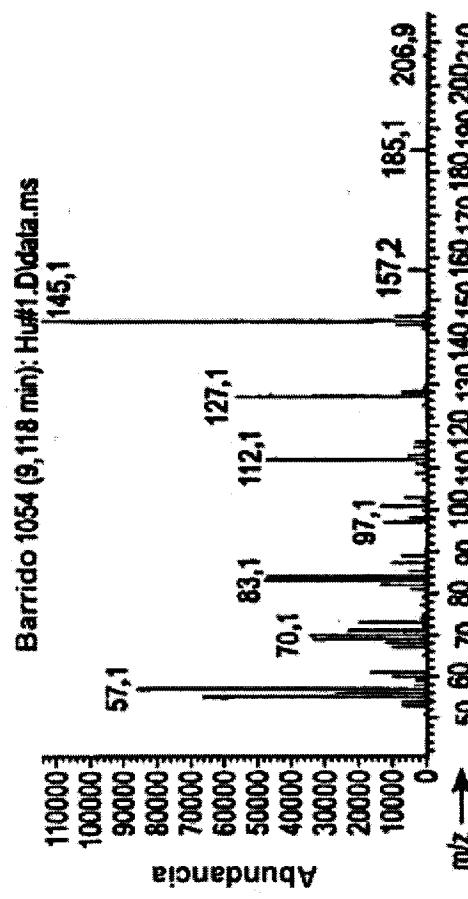


FIG. 7D



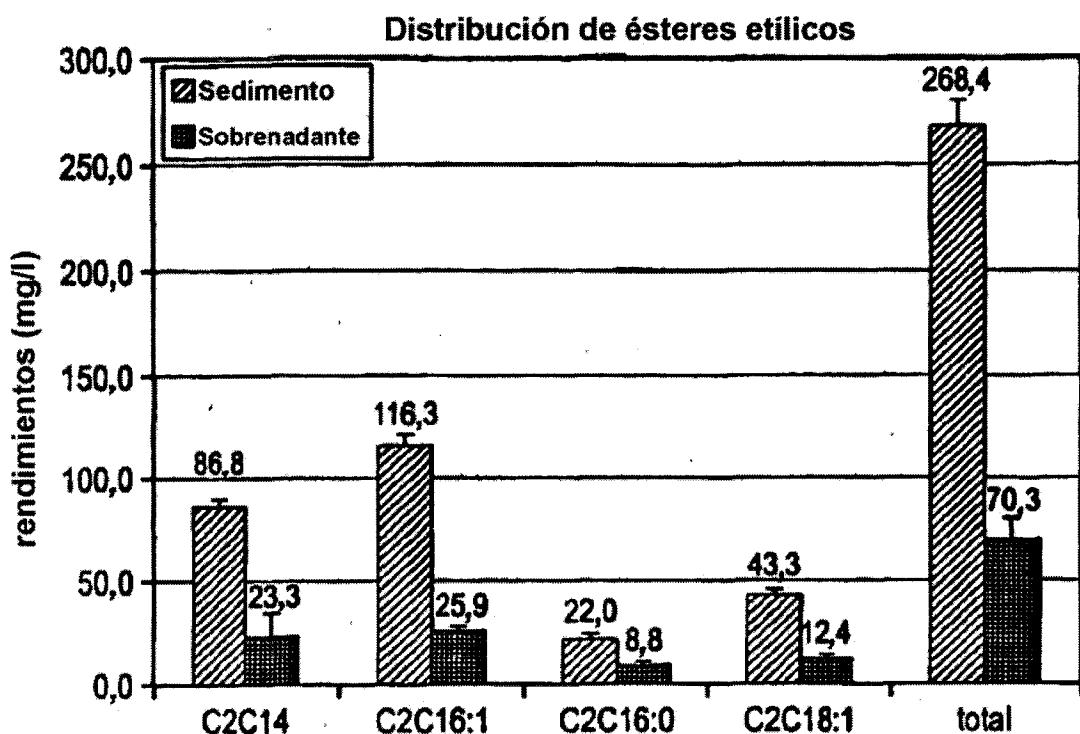


FIG. 8

FIG. 9A

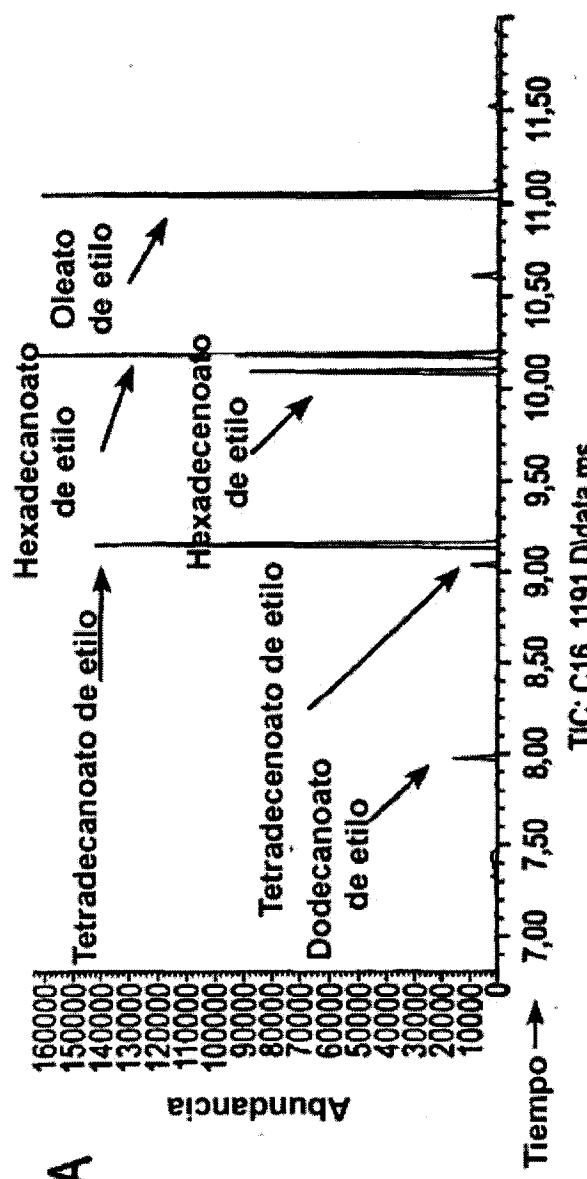


FIG. 9B

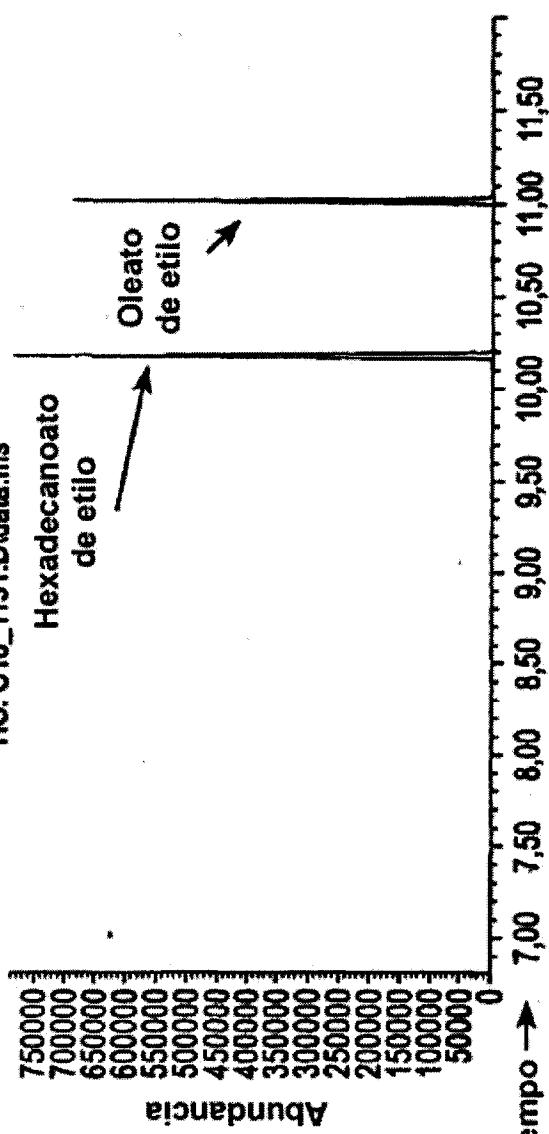


FIG. 10

Los números de registro son de NCBI, GenBank, versión 159.0 del 16 de abril de 2007  
 Los números de KEGG, versión 42.0 de abril de 2007 (más actualizaciones diarias hasta e incluyendo la fecha de esta patente)  
 Los números EC son de KEGG, versión 42.0 de abril de 2007

CATEGORÍA	GEN	NOMBRE	REGISTRO	NÚMERO	MODIFICACIÓN	USO	ORGANISMO
				EC			
<b>1. Aumento de la producción de ácido graso/aumento de la producción de producto</b>							
<i>aumentar acil-CoA    reducir el catabolismo de derivados y productos intermedios    reducir la inhibición por retroalimentación    atenuar otras rutas que consumen ácidos grasos</i>							
accA	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad NP_414727	AAC73296,	64.12	Sobreexpresar	aumentar la producción de malonil-CoA		<i>Escherichia coli</i>
accB	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad	NP_417721	64.12	Sobreexpresar	aumentar la producción de malonil-CoA		<i>Escherichia coli</i>
accC	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad	NP_417722	64.12	Sobreexpresar	aumentar la producción de malonil-CoA		<i>Escherichia coli</i>
acdD	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad	NP_416819	64.12	Sobreexpresar	aumentar la producción de malonil-CoA		<i>Escherichia coli</i>
acdE	piruvato deshidrogenasa, subunidad E1	NP_414658, AAC73226	1.24.1, 2.3.1.61, 2.3.1.12	Sobreexpresar	aumentar la producción de Acetil-CoA		<i>Escherichia coli</i>

FIG.10 Cont.

aceF	pinuvato deshidrogenasa, subunidad E2	NP_414657, AAC73227	2.3.1.61, 2.3.1.12	Sobreexpresar o reducir	aumentar la producción de acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
actA	acetato cinasa	AAC75356	2.72.1	Delecionar o reducir	aumentar la producción de acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
actB	acetato biñasa	NP_416739	2.72.1	Delecionar o reducir	aumentar la producción de Acetyl-CoA	<i>Escherichia coli</i>
acpp	proteína transportadora AAC74178 de acilo	BAB81430	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
adhE	alcohol deshidrogenasa	AAC74323, CAA47743	1.1.1.1, 1.2.1.10	Delecionar o reducir	aumentar la producción de Acetyl-CoA	<i>Escherichia coli</i> W3111
cerI	aldehido descarbonilasa	BAA11024	4.1.98.5	Sobreexpresar	aumentar la producción de acetil-CoA	<i>Arabidopsis thaliana</i>
fabA	beta-hidroxidecanoil tióster deshidrata	NP_415474	4.2.1.60	Expresar	aumentar la producción de acil graso-CoA	<i>E. coli</i> K12
fabD	[proteína transportadora de acilo] AAC74176 S-malonitriltransferasa	23.1.39	Sobreexpresar	aumentar la producción de Acetyl-CoA	<i>E. coli</i> K12	
fabF	3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] sintasa II	AAC74179	2.3.1.179	Delecionar o sobreexpresar	aumentar la producción de acetil-CoA	<i>E. coli</i> K12
fabG	3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] reductasa	AAC74177	1.1.1.100	Sobreexpresar	aumentar la producción de acetil-CoA	<i>E. coli</i> K12

**FIG.10 Cont**

<b>fabH</b>	3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] sintasa III	<b>AAC74175</b>	<b>2.3.1.180</b>	Sobreexpresar	aumentar la producción de acetyl-CoA	<b>E. coli K12</b>
<b>fabI</b>	enoil-[proteína transportadora de acilo] reductasa, dependiente de NADH	NP_416804	1.3.19	Expresar	producción de acil graso-CoA	<b>E. coli K12</b>
<b>fabR</b>	Repressor transcripcional	NP_418398	NINGUNO	Delecionar o reducir	modular la producción de ácidos grasos insaturados	<b>E. coli K12</b>
<b>fabZ</b>	(3R)-hidroximiristol proteína transportadora de acilo deshidratasa	NP_414722	4.2.1.			<b>E. coli K12</b>
<b>fadE</b>	acil-CoA deshidrogenasa	AAC73325	1.3.99.3, 1.3.99.	Delecionar o reducir	aumentar la producción de acetyl-CoA	
<b>acrl</b>	acil graso-CoA reductasa	AAC45217	1.2.1.	Sobreexpresar	para la producción E. coli K12 de alcohol graso	
<b>GST</b>	Glutatión sintasa	P04425	6.3.2.3	Delecionar o reducir	aumentar Acil-CoA	<b>E. coli K12</b>
<b>gpsA</b>	sn-glicerol 3-fosfato deshidrogenasa biosintética	AAC76632, NP_418065	EC: 1.1.1.94	Delecionar o reducir	aumentar la producción de acetyl-CoA	<b>E. coli K12</b>
<b>ldhA</b>	lactato deshidrogenasa	AAC74462	EC: 1.1.1.28	Delecionar o reducir	aumentar la producción de acetyl-CoA	<b>E. coli K12</b>
<b>Lipasa</b>	triglicérido lipasa	CAA89087, CAA98876	3.1.1.3	Expresar	aumentar la producción de ácidos grasos	<b>Saccharomyces cerevisiae</b>

FIG.10 Cont.

	Malonil-CoA descarboxilasa	AAA26500	4.1.1.9, Sobreespresar		Saccharopolyspora erythraea
			4.1.1.41		
panD	Aspartato 1-deshidrogenasa	BA896708	4.1.1.11 Sobreespresar	aumentar acil-CoA	Escherichia coli W3110
panK a.k.a. coA	Pantotenoato cinasa	AAC76952	2.7.1.33 Sobreespresar	aumentar la producción de acetyl-CoA	
pdh	Piruvato deshidrogenasa	BAB34380, AAC73226, NP_415392	1.2.4.1 Sobreespresar	aumentar la producción de acetyl-CoA	
pflB	Formato acetiltransferasa	AAC73989, P09373	EC: 2.3.1.54 Delecionar o reducir	aumentar la producción de acetyl-CoA	
plsB	Aciltransferasa	AAC77011	23.1.15 Mutación D311E	reducir los límites en la reserva de acil-CoA	E. coli K12
poxB	Piruvato oxidasa	AAC73958, NP_415392	1.2.2.2 Delecionar o reducir	aumentar la producción de acetyl-CoA	
pla	Fosfotransacetylasa	AAC75357, NP_416890	2.3.1.8 Delecionar o reducir	aumentar la producción de acetyl-CoA	
udhA	Nucleótido de piridina transhidrogenasa	CAA46822	1.6.1.1 Sobreespresar	convertir NADH en NADPH o viceversa	

**FIG.10 Cont.**

<b>fadB</b>	3-hidroxibutiril-CoA epimerasa/ delta(3)-cis-delta(2)-trans-enoil-CoA isomerasa/ enoil-CoA hidratasa y 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa fusionadas	AP_003956	4.2.1.17, 5.1.2.3, 5.3.3.8, 1.1.1.35	Delecionar o reducir	Bloquear la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
<b>fadJ</b>	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa; K01692 enoil-CoA hidratasa; K01782 3-hidroxibutiril-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>
<b>fadA</b>	3-cetoacil-CoA tiolasa	BAE77458	2.3.1.16	Delecionar o reducir	Bloquear la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
<b>fadI</b>	beta-cetoacil-CoA tiolasa	AAC75402	1.5.1.29, 1.16.	Delecionar o reducir	Bloquear la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
<b>YidO</b>	acil-coA deshidrogenasa	YP_852786	1.3.99.	Delecionar o reducir	Bloquear la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
<b>2. Control de estructura</b>						
<b>2A. Control de longitud de cadena</b>	<b>2 BSA</b>	<b>POADA1</b>	<b>3.1.2.</b>	<b>Delecionar 1 y/o expresar</b>	<b>Longitud de cadena C18</b>	

**FIG.10 Cont.**

				<b>E.coli</b>
<i>fasA</i> sin secuencia líder	tioesterasa	AAC73596, NP_415027	3.1.1.- expresar o sobreexpresar	<b>C18:1</b>
<i>fatB1</i> (umbellularia)	tioesterasa	Q41635	3.1.1.- expresar o sobreexpresar	C12:0
<i>fatB2</i> (umbellularia)	tioesterasa	AAC49269	3.1.1.- expresar o sobreexpresar	C8:0 - C10:0
<i>fatB3</i>	tioesterasa	AAC72881	3.1.1.- expresar o sobreexpresar	C14:0 - C16:0
<i>fatB</i> (cinnamomum)	tioesterasa	Q39473	3.1.1.- expresar o sobreexpresar	<b>C14:0</b>
<i>fatB</i> (M141T)	tioesterasa	CAA85388	3.1.1.- expresar o sobreexpresar	<b>C16:1</b>
<i>fatA1</i> (Helianthus)	tioesterasa	AAL79381	3.1.1.- expresar o sobreexpresar	<b>C18:1</b>
<i>athala</i>	tioesterasa	NP_188147, NP_188041	3.1.1.- expresar o sobreexpresar	<b>C18:1</b>
<i>fasA</i>	tioesterasa	CAC39106	3.1.1.- expresar o sobreexpresar	<b>C18:1</b>
<i>fasA</i> (cuphea)	tioesterasa	AAC72883	3.1.1.- expresar o sobreexpresar	<b>C18:1</b>
				<i>Cuphea hookeriana</i>

FIG.10 Cont.

26. Control de ramificación atenuar <i>FabH</i>	aumentar los derivados de ácidos grasos de cadena ramificada
expresar <i>FabH</i> a partir de <i>S. glaucescens</i> o <i>S. coelicolor</i> y desactivar <i>FabH</i> endógeno	
expresar <i>FabH</i> a partir de <i>B. subtilis</i> y desactivar <i>FabH</i> endógeno	
subunidad de <i>bdk-E3-dihidro-</i> <i>lipoil deshidrogenasa</i>	EC 1.2.4.4
subunidad de <i>bdk-E1-alfa/beta</i>	EC 1.2.4.4
subunidad de <i>bdk-E2-dihidro-</i> <i>lipoil transacetilasa</i>	EC 1.2.4.4
<i>bldA1</i>	subunidad a (E1a) de $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa
	NP_628006
	EC 1.2.4.4
	Expresar o sobreexpresar
	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada
	Streptomyces coelicolor

**FIG.10 Cont.**

<b>bkdB1</b>	subunidad a (E1b) de $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa	NP_628005	EC 12.4.4	Expresar o sobreexpresar preparar	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<b>bkdC1</b>	dihidroliopil transacetilasa (E2)	NP_638004	EC 12.4.4	Expresar o sobreexpresar preparar	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<b>bkdA2</b>	subunidad a (E1a) de $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa	NP_733618	EC 12.4.4	Expresar o sobreexpresar preparar	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<b>bkdB2</b>	subunidad b (E1b) de $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa	NP_628019	EC 12.4.4	Expresar o sobreexpresar preparar	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<b>bkdC2</b>	dihidroliopil transacetilasa (E2)	NP_628018	EC 12.4.4	Expresar o sobreexpresar preparar	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<b>bkdA</b>	subunidad a (E1a) de $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa	BAC72014	EC 12.4.4	Expresar o sobreexpresar preparar	<i>Streptomyces avermitilis</i>
<b>bkdB</b>	subunidad b (E1b) de $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa	BAC72075	EC 12.4.4	Expresar o sobreexpresar preparar	<i>Streptomyces avermitilis</i>

FIG.10 Cont.

<b>bldC</b>	dihidrolipoil transacetilasa (E2)	<b>BACT2076</b>	<b>EC 1.2.4.4</b>	Expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<b>Streptomyces avermitellis</b>
<b>bldF</b>	subunidad a (E1a) de $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa	<b>BACT2088</b>	<b>EC 1.2.4.4</b>	Expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<b>Streptomyces avermitellis</b>
<b>bldG</b>	subunidad b (E1b) de $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa	<b>BACT2089</b>	<b>EC 1.2.4.4</b>	Expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<b>Streptomyces avermitellis</b>
<b>bldH</b>	dihidrolipoil transacetilasa (E2)	<b>BACT2090</b>	<b>EC 1.2.4.4</b>	Expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<b>Streptomyces avermitellis</b>
<b>bldA</b>	subunidad a (E1a) de $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa	<b>NP_390285</b>	<b>EC 1.2.4.4</b>	Expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<b>Bacillus subtilis</b>
<b>bldB</b>	subunidad b (E1b) de $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa	<b>NP_390284</b>	<b>EC 1.2.4.4</b>	Expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<b>Bacillus subtilis</b>
<b>bldB</b>	dihidrolipoil transacetilasa (E2)	<b>NP_390283</b>	<b>EC 1.2.4.4</b>	Expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<b>Bacillus subtilis</b>

## FIG.10 Cont.

<b>bldA1</b>	subunidad a (E1a) de $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa	AAA65614	EC 12.4.4	Expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Pseudomonas putida</i>
<b>bldA2</b>	subunidad b (E1b) de $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa	AAA65615	EC 12.4.4	Expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Pseudomonas putida</i>
<b>bldC</b>	dihidrolipoproteína transacililasa (E2)	AAA65617	EC 12.4.4	Expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Pseudomonas putida</i>
<b>lpd</b>	dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3)	NP_414658	1.8.1.4	Expresar o sobreexpresar	preparar precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Escherichia coli</i>
<b>lVE</b>	aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa	YP_026247	2.6.1.42	Expresar o sobreexpresar	preparar $\alpha$ -cetoácidos ramificados	<i>Escherichia coli</i>
<b>lVE</b>	aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa	AAF34406	2.6.1.42	Expresar o sobreexpresar	preparar $\alpha$ -cetoácidos ramificados	<i>Lactococcus lactis</i>
<b>lVE</b>	aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa	NP_745648	2.6.1.43	Expresar o sobreexpresar	preparar $\alpha$ -cetoácidos ramificados	<i>Pseudomonas putida</i>
<b>lVE</b>	aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa	NP_629657	2.6.1.42	Expresar o sobreexpresar	preparar $\alpha$ -cetoácidos ramificados	<i>Streptomyces coelicolor</i>

FIG.10 Cont.

027	crotonil-CoA reductasa	NP_630556	1.1.1.9 expresar o sobreexpresar	convertir crotonil CoA en butiril-CoA	<i>Streptomyces coelicolor</i>
037	crotonil-CoA reductasa	AAD53915	1.1.1.9 expresar o sobreexpresar	convertir crotonil CoA en butiril-CoA	<i>Streptomyces cinnamomensis</i>
IcmA, 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>
IcmA, isobutiril CoA mutasa	isobutiril-CoA mutasa, subunidad A	AAC08713	5.4.99.2 expresar o sobreexpresar	convertir butiril-CoA en isobutiril-CoA	<i>Streptomyces cinnamomensis</i>
IcmB, 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>
IcmB, isobutiril CoA mutasa	isobutiril-CoA mutasa, subunidad B	AJ246005	5.4.99.13 expresar o sobreexpresar	convertir butiril-CoA en isobutiril-CoA	<i>Streptomyces cinnamomensis</i>
Genes de FabH, ACP y fabF con especificidad por acil-CoA de cadena ramificada					
lme		CAC12788	EC2.6.1.42 sobreexpresar	aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa	<i>S. camerosus</i>

FIG.10 Cont.

FabH1	beta-cetoacil-ACP sintasa II	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>
FabH3	beta-cetoacil-ACP sintasa III	NP_823466	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>

FIG.10 Cont.

<b>FabH_A</b>	beta-cetoacil-ACP sintasa III	NP_388015	2.3.1.180	Expresar o sobreexpresar	Iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<b>Bacillus subtilis</b>
<b>FabH_B</b>	beta-cetoacil-ACP sintasa III	NP_388098	2.3.1.180	Expresar o sobreexpresar	Iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<b>Bacillus subtilis</b>
<b>ACP</b>	Proteína transportadora de acilo	NP_389474	NINGUNO	Expresar o sobreexpresar	Iniciación y elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<b>Bacillus subtilis</b>
<b>FabF</b>	beta-cetoacil-ACP sintasa II	NP_388016	2.3.1.179	Expresar o sobreexpresar	elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<b>Bacillus subtilis</b>
<b>SmalDRAFT_0818</b>	beta-cetoacil-ACP sintasa III	2P_01643059	2.3.1.180	Expresar o sobreexpresar	Iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<b>Stenotrophomonas maltophilia</b>
<b>SmalDRAFT_0821</b>	Proteína transportadora de acilo	2P_01643063	NINGUNO	Expresar o sobreexpresar	Iniciación y elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<b>Stenotrophomonas maltophilia</b>

## FIG.10 Cont.

SmalDRAFT_0822	beta-cetoacil-ACP sintasa II	ZP_01643064	23.1.179	Expressar o sobreexpresar	elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Stenotrophomonas malophilia</i>
FabH	beta-cetoacil-ACP sintasa III	YP_123672	23.1.180	Expressar o sobreexpresar	iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Legionella pneumophila</i>
ACP	Proteína transportadora de acilo	YP_123675	NINGUNO	Expressar 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	23.1.179	Expressar o sobreexpresar	elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Legionella pneumophila</i>
FabH	beta-cetoacil-ACP sintasa III	NP_415609	23.1.180	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	23.1.179	Delecionar o reducir	elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Escherichia coli</i>

**FIG.10 Cont.**

Para producir ácidos grasos cíclicos						
<b>AnSJ</b>	deshidratasa (supuesta)	no disponible	no disponible	Expresar o sobreexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces collinus</i>
<b>AnSK</b>	CoA ligasa (supuesta)	no disponible	no disponible	Expresar o sobreexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces collinus</i>
<b>AnSL</b>	deshidrogenasa (supuesta)	no disponible	no disponible	Expresar o sobreexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces collinus</i>
<b>ChcA</b>	enoil-CoA reductasa	U72144	EC 1.3.1.34	Expresar o sobreexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces collinus</i>
<b>AnSM</b>	oxidoreductasa (supuesta)	no disponible	no disponible	Expresar o sobreexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces collinus</i>
<b>PmJ</b>	deshidratasa (supuesta)	<u>AAQ84158</u>	no disponible	Expresar o sobreexpresar	ciclohexilcarbonil-CoA HK803	<i>Streptomyces sp.</i>
<b>PmK</b>	CoA ligasa (supuesta)	<u>AAQ84158</u>	no disponible	Expresar o sobreexpresar	ciclohexilcarbonil-CoA HK803	<i>Streptomyces sp.</i>
<b>PmL</b>	deshidrogenasa (supuesta)	<u>AAQ84159</u>	no disponible	Expresar o sobreexpresar	ciclohexilcarbonil-CoA HK803	<i>Streptomyces sp.</i>
<b>ChcA</b>	enoil-CoA reductasa	<u>AAQ84160</u>	EC 1.3.1.34	Expresar o sobreexpresar	ciclohexilcarbonil-CoA HK803	<i>Streptomyces sp.</i>

FIG.10 Cont.

PimM	oxidorreductasa (supuesta)	AAQ84161	no disponible	Expresar o sobreexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces sp.</i>
ChcB	enoil-CoA isomerasa	AF268489	no disponible	Expresar o sobreexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces colinus</i>
ChcB/CaiD	enoil-CoA isomerasa	NP_629392	4.2.1.-	Expresar o sobreexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces</i>
ChcB/CaiD	enoil-CoA isomerasa	NP_824296	4.2.1.-	Expresar o sobreexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces</i>
<b>2C. Control de nivel de saturación</b>						
Sla	supresor de FabA	AAN79592	no disponible	Sobreexpresar	aumentar ácidos grasos monoinsaturados	<i>E.coli</i>
véase también FabA en sec. 1						
GnsA	supresores de la mutación nula secG	ABD106647.1	NINGUNO	Expresar	producir ácidos grasos insaturados	<i>E.coli</i>
GnsB	supresores de la mutación nula secG	AC74076.1	NINGUNO	Sobreexpresar	aumentar ésteres de ácidos grasos insaturados	<i>E.coli</i>

**FIG.10 Cont.**

véase también la sección 2A- artículos con :0 están insaturados (sin dobles enlaces) y con :1 están saturados (1 doble enlace)					
<b>fabB</b>	3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] sintasa I	<b>BAA16180</b>	<b>EC:2.3.1.41</b>	sobreexpresar	modular la producción de ácidos grasos insaturados
<b>fabK</b>	trans-2-enoil-ACP reductasa II	<b>AAF98273</b>	<b>1.3.1.9</b>	expresar	modular la producción de ácidos grasos insaturados
<b>fabL</b>	enoil-[proteína transportadora de acilo] reductasa a	<b>AAU39821</b>	<b>1.3.1.9</b>	expresar	modular la producción de ácidos grasos insaturados
<b>fabM</b>	trans-2, cis-3- decanoil-ACP isomerasa	<b>DAA05501</b>	<b>5.3.3.14</b>	sobreexpresar	modular la producción de ácidos grasos insaturados
3. Salida de producto final					
<b>3A. Salida de cera</b>					
<b>AT3G51970</b>	alcohol de cadena larga O-acil graso- transferasa	<b>NP_190765</b>	<b>2.3.1.75</b>	expresar	producción de cera
					<b>Arabidopsis thaliana</b>

FIG.10 Cont.

	thioesterasa (véase la sección de control de longitud de cadena)	3.1.2.14	expresar	aumentar la producción de ácidos grasos
acrl	acil-CoA reduktasa que forma alcohol graso (ACR1)	YP_047869	1.1.1.1	expresar
ypd	alcohol deshidrogenasa	AP_003562	1.2.1.50	expresar
EL01	ácido graso elongasa	BAD98251	1.1.1.1	expresar
plsC	aciltransferasa	AAA16514	2.3.1.74	expresar
DAGAT	diacilglicerol aciltransferasa	AAF19262	2.3.1.20	expresar
hWS	acil-CoA cera acilhol aciltransferasa	AAX48018	no disponible	expresar
afI	éster de cera sintasa bifuncional/acil-CoA: diacilglicerol aciltransferasa	AAQ17391	2.3.1.20	expresar
mWS	éster de cera sintasa (Simmondsia)	AAD38041	2.3.1.75	expresar
				producción de cera
				<i>Simmondsia chinensis</i>

FIG.10 Cont.

3B. Salida de alcohol graso		3.12.14	expresar	producir
	diversas tioesterasas (en referencia a sec. 2A)	1.2.1.50	expresar	producir
acr1	acil-CoA reductasa	YP_047869		<i>Acinetobacter sp.</i> ADP1
yghD	alcohol deshidrogenasa	AP_003562	1.1.1.1	expresar <i>Escherichia coli</i> W3110
BmFAR	FAR (facilit-CoA reductasa que forma alcohol graso)	BACT9425	1.1.1.*	expresar reducir acil graso- CoA a alcohol graso <i>Bombyx mori</i>
Akr1a4	aldehido reductasa microsómica de mamíferos	NP_067448	1.1.1.21	expresar producir <i>Mus musculus</i>
GTnG_1865	aldehido deshidrogenasa de cadena larga	YP_00112587	12.1.48	expresar producir <i>Geobacillus</i> <i>thermoduricans</i> NG80-2
FadD	acil-CoA sintetasa	NP_416319	EC 6.2.1.3	expresar producir más <i>E. Coli</i> K12
<i>Preparar Butano/</i>				
atoB	acetyl-CoA acetiltransferasa	YP_049388	2.3.1.9	expresar producir <i>Erwinia carotovora</i>
hbd	beta-hidroxibutiril- CoA deshidrogenasa	BAD51424	1.1.1.157	expresar producir <i>Butyrivibrio</i> <i>fibrischvens</i>

FIG.10 Cont.

CPE0095	crotonasa	BAB79601	4.2.1.17	expresar	producir	<i>Clostridium perfringens</i>
bcd	butiril-CoA deshídrogenasa	AAM14583	no disponible	expresar	producir	<i>Clostridium beijerinckii</i>
ALDH	coenzima A-aciilante aldehido deshídrogenasa	AAT66436	no disponible	expresar	producir	<i>Clostridium beijerinckii</i>
AdhE	aldehido-alcohol deshídrogenasa	AAN80172	1.1.1.1 12.1.10	expresar	producir	<i>Escherichia coli</i> CFT073
3C. Salida de ésteres de ácidos grasos						
	Véase la sección de control de la longitud de cadena tioesterasa		3.12.14	expresar	producir	
acr1	aciil-CoA reductasa	YP_047869	12.1.50	expresar	producir	<i>Acinetobacter sp.</i> ADP1
yhdD	alcohol deshídrogenasa	AP_003562	1.1.1.1	expresar	producir	<i>E. Coli</i> K12
AAT	alcohol O-acetiltransferasa	AAG13130	23.1.84	expresar	producir	<i>Fragaria x ananassa</i>
4. Exportar						

FIG.10 Cont.

	NP_524723	NINGUNO	expresar	exportar cara	<i>Drosophila melanogaster</i>
exportador de éster de cera (familia FATP, proteína transportadora de ácidos grasos (cadena larga))					
Transportador ABC	transportador de alcanos supuesto	NINGUNO	expresar	exportar productos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
CERS	transportador de cera	AY1951600, AY734542, AY39210990, AY1951460	NINGUNO	expresar	exportar productos <i>Arabidopsis thaliana</i>
AMRPs	asociado a resistencia a múltiples fármacos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_171908	NINGUNO	expresar	exportar productos <i>Arabidopsis thaliana</i>
AmiS2	Transportador ABC AmiS2	JCS491	NINGUNO	expresar	exportar productos <i>Rhodococcus sp.</i>
APGP1	GLICOPROTEÍNA 1 DE ARABIDOPSIS THALIANA P	NP_181228	NINGUNO	expresar	exportar productos <i>Arabidopsis thaliana</i>
AcA	proteína ac/A supuesta de transporte de flujo de salida de múltiples fármacos	CAF23274	NINGUNO	expresar	exportar productos <i>Candidatus Protothamnydia amoebophila UWE25</i>

**FIG.10 Cont.**

		CAF23275	NINGUNO	expresar	exportar productos	<i>Candidatus</i> <i>Protochlamydia</i> <i>ameobophila UWE25</i>
AcrB	proteína de transporte de flujo de salida de múltiples fármacos probable, acrB					
TolC	proteína de la membrana externa [envuelta celular], biogénesis	ABD59001	NINGUNO	expresar	exportar productos	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>novicida</i>
AcrE	proteína transmembrana que afecta a la formación del septo y a la permeabilidad de la membrana celular	YP_312213	NINGUNO	expresar	exportar productos	<i>Shigella sonnei</i> SS046
AcrF	proteína F de resistencia a acriflavina	P24181	NINGUNO	expresar	exportar productos	<i>Escherichia coli</i>
W1618	transportador de flujo de salida de múltiples fármacos	NP_682408.1		expresar	exportar productos	<i>Thermosynechococcus</i> <i>s elongatus</i> BP-1/
W1619	transportador de flujo de salida de múltiples fármacos	NP_682409.1		expresar	exportar productos	<i>Thermosynechococcus</i> <i>s elongatus</i> BP-1/
W0139	transportador de flujo de salida de múltiples fármacos	NP_680940.1		expresar	exportar productos	<i>Thermosynechococcus</i> <i>s elongatus</i> BP-1/
<b>5. Fermentación</b>						

FIG.10 Cont.

genes de punto de control de la replicación					aumentar la eficacia de salida
<b>umuD</b>	ADN Polimerasa V, subunidad	<b>YP_310132</b>	<b>34.21.</b>	sobreexpresar	<b>Shigella sonnei</b> Ss046
<b>umuC</b>	ADN polimerasa V, subunidad	<b>ABC42261</b>	<b>34.21.</b>	sobreexpresar	<b>Escherichia coli</b>
					<b>Shigella flexneri</b>
		<b>P07001</b>	<b>1.6.1.1.</b>	expresar	
		<b>POAB70</b>	<b>1.6.1.2</b>		
	NADH:NADPH transhidrogenasa (subunidades alfa y beta)				