

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 240**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/64** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2010 E 10819469 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 2480680**

54 Título: **Producción de derivados de ácidos grasos**

30 Prioridad:

**25.09.2009 US 245943 P**

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

**21.05.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GAERTNER, ALFRED**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

**ES 2 536 240 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 derivados de ácidos grasos

**Antecedentes de la invención**

- 5 El petróleo es un recurso natural limitado que se encuentra en la Tierra en formas líquida, gaseosa o sólida. El petróleo está compuesto principalmente por hidrocarburos, que están compuestos principalmente de carbono e hidrógeno. También contiene cantidades significativas de otros elementos, tales como nitrógeno, oxígeno o azufre, en diferentes formas.
- 10 El petróleo es un recurso valioso, aunque los productos del petróleo se desarrollan a considerables costes, tanto financieros como medioambientales. En primer lugar, deben descubrirse fuentes de petróleo. La exploración de petróleo es una empresa cara y arriesgada. El coste de exploración de pozos de aguas profundas puede exceder los 100 millones de dólares. Además del coste económico, la exploración de petróleo conlleva un alto coste medioambiental. Por ejemplo, la exploración mar adentro altera los entornos marinos circundantes.
- 15 Tras descubrirse un pozo productor, el petróleo debe extraerse de la tierra con gran coste. Incluso en las mejoras circunstancias, sólo puede extraerse el 50% del petróleo en un pozo. La extracción de petróleo también conlleva un coste medioambiental. Por ejemplo, la extracción de petróleo puede dar como resultado grandes fugas de petróleo que emerge a la superficie. La perforación mar adentro implica dragar el lecho marino, lo que altera o destruye el entorno marino circundante.
- 20 Tras la extracción el petróleo debe transportarse a lo largo de grandes distancias desde regiones productoras de petróleo hasta regiones consumidoras de petróleo. Además de los costes de transporte, hay también el riesgo medioambiental de derrames de petróleo devastadores.
- 25 En su forma natural, el petróleo crudo extraído de la Tierra tiene pocos usos comerciales. Es una mezcla de hidrocarburos (por ejemplo, parafinas (o alcanos), olefinas (o alquenos), alquinos, naftenos (o cicloalcanos), compuestos alifáticos, compuestos aromáticos, etc.) de longitud y complejidad variables. Además, el petróleo crudo contiene otros compuestos orgánicos (por ejemplo, compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, oxígeno, azufre, etc.) e impurezas (por ejemplo, azufre, sal, ácido, metales, etc.).
- 30 Por tanto, el petróleo crudo debe refinarse y purificarse antes de que pueda usarse comercialmente. Debido a su alta densidad de energía y su fácil transportabilidad, la mayoría del petróleo se refina en combustibles, tales como combustibles de transporte (por ejemplo, gasolina, diésel, combustible de aviación, etc.), gasóleo de calefacción, gas licuado de petróleo, etc.
- 35 El petróleo crudo es también una fuente primaria de materiales de partida para producir productos petroquímicos. Las dos clases principales de materiales de partida derivados del petróleo son olefinas de cadena corta (por ejemplo, etileno y propileno) y compuesto aromáticos (por ejemplo, isómeros de xileno y benceno). Estos materiales de partida se derivan de los hidrocarburos de cadena más larga en petróleo crudo sometiendo a craqueo los hidrocarburos de cadena larga con un gasto considerable usando una variedad de métodos, tales como craqueo catalítico, craqueo con vapor o reformación catalítica. Estos materiales de partida se usan para producir productos petroquímicos, que no pueden refinarse directamente del petróleo crudo, tales como monómeros, disolventes, detergentes o adhesivos.
- 40 Un ejemplo de un material de partida derivado de petróleo crudo es etileno. Se usa etileno para producir productos petroquímicos, tales como polietileno, etanol, óxido de etileno, etilenglicol, poliéster, glicol éter, etoxilato, acetato de vinilo, 1,2-dicloroetano, tricloroetileno, tetracloroetileno, cloruro de vinilo y poli(cloruro de vinilo). Otro ejemplo de un material de partida derivado de petróleo crudo es propileno. El propileno se usa para producir alcohol isopropílico, acrilonitrilo, polipropileno, óxido de propileno, propilenglicol, glicol éteres, butileno, isobutileno, 1,3-butadieno, elastómeros sintéticos, poliolefinas, alfa-olefinas, alcoholes grasos, ácido acrílico, polímeros acrílicos, cloruro de alilo, epiclorohidrina y resinas epoxídicas.
- 45 Los productos petroquímicos pueden usarse para producir productos químicos especializados, tales como plásticos, resinas, fibras, elastómeros, productos farmacéuticos, lubricantes o geles. Ejemplos de productos químicos especializados que pueden producirse a partir de materiales de partida petroquímicos son: ácidos grasos, hidrocarburos (por ejemplo, hidrocarburos de cadena larga, hidrocarburos de cadena ramificada, hidrocarburos saturados, hidrocarburos insaturados, etc.), alcoholes grasos, ésteres, aldehídos grasos, cetonas, lubricantes, etc.
- 50 Los productos químicos especializados tienen muchos usos comerciales. Los ácidos grasos se usan comercialmente como tensioactivos. Los tensioactivos pueden encontrarse en detergentes y jabones. Los ácidos grasos también pueden usarse como aditivos en combustibles, aceites lubricantes, pinturas, lacas, velas, aceite para ensaladas, mantequilla, cosméticos y emulsionantes. Además, los ácidos grasos se usan como activadores aceleradores en productos de caucho. Los ácidos grasos también pueden usarse como materia prima para producir ésteres
- 55 metílicos, amidas, aminas, cloruros de ácido, anhídridos, dímeros de ceteno, y peroxiácidos y ésteres.

- Los ésteres tienen muchos usos comerciales. Por ejemplo, el biodiésel, un combustible alternativo, está compuesto de ésteres (por ejemplo, éster metílico de ácidos grasos, ésteres etílicos de ácidos grasos, etc.). Algunos ésteres de bajo peso molecular son volátiles con un olor agradable que los hace útiles como fragancias o agentes saborizantes. Además, se usan ésteres como disolventes para lacas, pinturas y barnices. Además, algunas sustancias que se producen de manera natural, tales como ceras, grasas y aceites están compuestas de ésteres. También se usan ésteres como agentes de ablandamiento en resinas y plásticos, plastificantes, retardadores de la llama y aditivos en gasolina y gasoil. Además, pueden usarse ésteres en la fabricación de polímeros, películas, materiales textiles, colorantes y productos farmacéuticos.
- Además, el petróleo crudo es una fuente de lubricantes. Los lubricantes derivados del petróleo están compuestos normalmente de olefinas, particularmente poliolefinas y alfa-olefinas. Los lubricantes o bien pueden refinarse del petróleo crudo o bien fabricarse usando los materiales de partida refinados del petróleo crudo.
- La obtención de estos productos químicos especializados a partir de petróleo crudo requiere una inversión financiera significativa así como un gran aporte de energía. También es un proceso ineficaz porque frecuentemente los hidrocarburos de cadena larga en petróleo crudo se someten a craqueo para producir monómeros más pequeños. Estos monómeros se usan entonces como material de partida para fabricar los productos químicos especializados más complejos.
- Además de los problemas con la exploración, la extracción, el transporte y el refinado del petróleo, el petróleo es un recurso cada vez más escaso y limitado. Una estimación del consumo de petróleo mundial actual es de 30000 millones de barriles al año. Según algunas estimaciones, se predice que a los niveles de producción actuales, las reservas de petróleo mundiales podrían agotarse antes del año 2050.
- Finalmente, la combustión de combustibles a base de petróleo libera gases invernadero (por ejemplo, dióxido de carbono) y otras formas de contaminación del aire (por ejemplo, monóxido de carbono, dióxido de azufre, etc.). A medida que la demanda mundial de combustible aumenta, la emisión de gases invernadero y otras formas de contaminación del aire también aumenta. La acumulación de gases invernadero en la atmósfera puede conducir a un aumento del calentamiento global. Por tanto, además de dañar el medio ambiente localmente (por ejemplo, derrames de petróleo, dragado de entornos marinos, etc.), la combustión del petróleo también daña el medio ambiente globalmente.
- Debido a los desafíos inherentes que plantea el petróleo, hay una necesidad de una fuente de petróleo renovable que no necesite explorarse, extraerse, transportarse a lo largo de grandes distancias o refinarse sustancialmente como el petróleo. Hay también una necesidad de una fuente de petróleo renovable que pueda producirse económicamente. Además, hay una necesidad de una fuente de petróleo renovable que no cree el tipo de daño medioambiental producido por la industria del petróleo y la combustión de combustibles a base de petróleo. Por motivos similares, hay también una necesidad de una fuente renovable de productos químicos que se derivan normalmente del petróleo.
- Las fuentes de energía renovable, tales como luz solar, agua, viento y biomasa, son una posible alternativa a combustibles de petróleo. El biocombustible es un combustible de combustión limpia, biodegradable, producido a partir de biomasa, y puede estar compuesto de alcanos y ésteres. Un biocombustible a modo de ejemplo es biodiésel. El biodiésel puede usarse en la mayoría de los motores diésel de combustión interna o bien en forma pura, que se denomina biodiésel "no mezclado", o bien como mezcla en cualquier concentración con diésel de petróleo regular.
- El biodiésel ofrece ventajas en comparación con diésel a base de petróleo, incluyendo emisiones reducidas (por ejemplo, monóxido de carbono, azufre, hidrocarburos aromáticos, partículas de hollín) durante la combustión. El biodiésel también mantiene un ciclo de dióxido de carbono equilibrado debido a que está basado en materiales biológicos renovables. El biodiésel normalmente es biodegradable, y confiere seguridad potenciada debido a su alto punto de ignición y baja inflamabilidad. Además, el biodiésel proporciona buenas propiedades de lubricación, reduciendo así el desgaste y la rotura de los motores.
- Los métodos actuales de preparación de biodiésel implican transesterificación de triacilglicéridos a partir de materias primas de aceites vegetales, tal como colza en Europa, soja en América del Norte y aceite de palma en el Sureste Asiático. Por tanto, la producción de biodiésel a escala industrial está restringida geográficamente y estacionalmente a zonas en las que se producen las materias primas de aceites vegetales. El procedimiento de transesterificación conduce a una mezcla de ésteres grasos que pueden usarse como biodiésel. Sin embargo, la glicerina es un subproducto no deseado del procedimiento de transesterificación. Para que puedan usarse como biodiésel, los ésteres grasos deben purificarse adicionalmente a partir del producto heterogéneo. Esto aumenta los costes y la cantidad de energía requerida para la producción de ésteres grasos y, en última instancia, también la producción de biodiésel. Además, las materias primas de aceites vegetales son fuentes de energía ineficaces debido a que requieren una superficie extensa para el cultivo. Por ejemplo, el rendimiento de biodiésel a partir de colza es de sólo 1300 l/hectárea debido a que sólo se usa el aceite de la semilla para la producción de biodiésel, mientras que el resto de la biomasa de la colza se desecha. Adicionalmente, el cultivo de algunas materias primas de aceites vegetales, tales como colza y soja, requiere rotación de cultivos frecuente para impedir el agotamiento de nutrientes

de la tierra.

El documento WO 2008/119082 A2 (HU *ET AL.*) da a conocer células modificadas por ingeniería genética y microorganismos que producen derivados de ácidos grasos.

5 El documento US 2009/117629 A1 (SCHMIDT-DANNERT *ET AL.*) da a conocer polipéptidos que tienen actividad isoprenoide éster de cera sintasa o actividad isoprenoide acil CoA-sintasa.

Por tanto existe una necesidad de un biocombustible económica y energéticamente eficaz, y métodos de preparación de biocombustibles a partir de fuentes de energía renovable tales como biomasa.

### Sumario de la invención

10 Esta divulgación se refiere a la producción de ácidos grasos y derivados de los mismos que incluyen, por ejemplo, ésteres grasos de microorganismos modificados por ingeniería genética. Los ejemplos de ésteres grasos incluyen ésteres de ácidos grasos, tales como los derivados de alcoholes de cadena corta, incluyendo ésteres etílicos de ácidos grasos ("FAEE") y ésteres metílicos de ácidos grasos ("FAME"), y los derivados de alcoholes grasos de cadena larga. Los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos que se producen pueden usarse, individualmente o en combinaciones adecuadas, como biocombustible (por ejemplo, un biodiésel), un producto químico industrial, o un componente de, o materia prima de, un biocombustible o un producto químico industrial. En algunos aspectos, la invención se refiere a un método de producción de uno o más ácidos grasos libres y/o uno o más derivados de ácidos grasos tales como ésteres de ácidos grasos, incluyendo, por ejemplo, FAEE, FAME y/u otros derivados de éster de ácido graso de alcoholes de cadena más larga. En aspectos relacionados, el método comprende proporcionar un huésped de producción modificado por ingeniería genética adecuado para preparar ácidos grasos y derivados de ácidos grasos.

25 Se proporciona un método de preparación de un ácido graso o un derivado de ácido graso tal como un éster graso. El método incluye expresar en una célula huésped un gen que codifica para una éster sintasa. El gen que codifica para una éster sintasa puede seleccionarse de las enzimas clasificadas como EC 2.3.1.75, y cualquier otro polipéptido que pueda catalizar la conversión de un tioéster de acilo en ésteres grasos, incluyendo, sin limitación, éster de cera sintasas, acil-CoA:alcohol transacilasas, alcohol O-ácido graso-acil-transferasa, aciltransferasas y acil graso-CoA:alcohol graso aciltransferasas, o una variante adecuada de las mismas. El gen de éster sintasa puede ser uno que codifica para cera/dgat, una éster sintasa/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa bifuncional de *Simmondsia chinensis*, *Acinetobacter sp.* ADP1, *Alcanivorax borkumensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fundibacter jadensis*, *Arabidopsis thaliana* o *Alkaligenes eutrophus*. El gen que codifica para una éster sintasa puede seleccionarse del grupo que consiste en: AtfA1 (una éster sintasa derivada de *Alcanivorax borkumensis* SK2, n.º de registro de GenBank YP\_694462), AtfA2 (otra éster sintasa derivada de *Alcanivorax borkumensis* SK2, n.º de registro de GenBank YP\_693524), ES9 (una éster sintasa de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798, n.º de registro de GenBank ABO21021), ES8 (otra éster sintasa derivada de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798, n.º de registro de GenBank ABO21020), y variantes de las mismas. Puede sobreexpresarse el gen que codifica para la éster sintasa o una variante adecuada.

40 Se proporciona un método de preparación de un derivado de ácido graso, por ejemplo, un éster graso, comprendiendo el método expresar en una célula huésped un gen que codifica para un polipéptido de éster sintasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26, o una variante de la misma. El polipéptido puede tener actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. El polipéptido puede tener la capacidad de catalizar la conversión de un tioéster en un ácido graso y/o un derivado de ácido graso tal como un éster graso. El polipéptido puede tener la capacidad de catalizar la conversión de una acil graso-CoA y/o una acil graso-ACP en un ácido graso y/o un derivado de ácido graso tal como un éster graso, usando un alcohol como sustrato. El polipéptido puede tener la capacidad de catalizar la conversión de un ácido graso libre en un éster graso, usando un alcohol como sustrato.

45 Una tioesterasa endógena de la célula huésped, si está presente, puede estar no modificada. La célula huésped puede expresar un nivel atenuado de una actividad tioesterasa o la tioesterasa está delecionada funcionalmente. La célula huésped puede no tener actividad tioesterasa detectable. Tal como se usa en el presente documento el término "detectable" significa que puede determinarse la existencia o presencia. Por ejemplo, la producción de un producto a partir de un reactante (por ejemplo, producción de un determinado tipo de ésteres de ácidos grasos) puede detectarse de manera deseable usando los métodos proporcionados en el presente documento. La célula huésped puede expresar un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos, tal como, por ejemplo, una acil-CoA sintasa, o la enzima de degradación de ácidos grasos está delecionada funcionalmente. La célula huésped puede no tener actividad de enzima de degradación de ácidos grasos detectable. La célula huésped puede expresar un nivel atenuado de una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos o ambas. La tioesterasa, la enzima de degradación de ácidos grasos o ambas pueden estar delecionadas funcionalmente. La célula huésped puede no tener actividad tioesterasa, actividad acil-CoA sintasa detectable o ninguna. La célula huésped puede poder convertir una acil-ACP o acil-CoA en ácidos grasos y/o derivados de los mismos tal como ésteres, en ausencia de una tioesterasa, una enzima de derivado de ácido graso o ambas. Alternativamente, la célula huésped puede convertir un ácido graso libre en un éster graso en ausencia de una tioesterasa, una enzima

de derivado de ácido graso o ambas. El método incluye además aislar los ácidos grasos o derivados de los mismos de la célula huésped.

El derivado de ácido graso puede ser un éster graso. El ácido graso o derivado de ácido graso puede derivarse a partir de un sustrato de alcohol adecuado tal como un alcohol de cadena corta o larga. El ácido graso o derivado de ácido graso puede estar presente en el entorno extracelular. El ácido graso o derivado de ácido graso puede aislarse del entorno extracelular de la célula huésped. El ácido graso o derivado de ácido graso puede secretarse de manera espontánea, parcial o completamente, a partir de la célula huésped. El ácido graso o derivado puede transportarse al entorno extracelular, opcionalmente con la ayuda de una o más proteínas de transporte. El ácido graso o derivado de ácido graso puede transportarse de manera pasiva al entorno extracelular.

Se proporciona un método *in vitro* de producción de un ácido graso y/o un derivado de ácido graso extracelularmente que comprende proporcionar un sustrato y una éster sintasa purificada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26, o una variante de la misma. El método puede comprender cultivar una célula huésped en condiciones que permiten la expresión o sobreexpresión de un polipéptido de éster sintasa o una variante del mismo, y aislar la éster sintasa de la célula. El método puede comprender además poner en contacto un sustrato adecuado de este tipo con el extracto libre de células en condiciones que permiten la producción de un ácido graso y/o un derivado de ácido graso.

El polipéptido de éster sintasa puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26, con una o más sustituciones, adiciones, inserciones o deleciones de aminoácidos, y el polipéptido tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. El polipéptido de éster sintasa puede tener actividad éster sintasa y/o transferasa aumentada. Por ejemplo, el polipéptido de éster sintasa puede, o tiene una capacidad mejorada de, catalizar la conversión de tioésteres, por ejemplo, acil graso-CoA o acil graso-ACP, en ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos. El polipéptido de éster sintasa puede ser capaz, o tiene una capacidad mejorada de, catalizar la conversión de sustratos de tioéster en ácidos grasos y/o derivados de los mismos, tales como ésteres grasos, en ausencia de actividad tioesterasa, actividad de enzima de degradación de ácidos grasos o ambas. Por ejemplo, el polipéptido convierte acil graso-ACP y/o acil graso-CoA en ésteres grasos *in vivo*, en ausencia de actividad tioesterasa o acil-CoA sintasa. El polipéptido puede catalizar la conversión de un ácido graso libre en un éster graso, en ausencia de actividad tioesterasa, actividad de enzima de degradación de ácidos grasos o ambas. Por ejemplo, el polipéptido puede convertir un ácido graso libre en un éster graso *in vivo* o *in vitro*, en ausencia de actividad tioesterasa, actividad acil-CoA sintasa o ambas.

El polipéptido de éster sintasa puede ser una variante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26, con una o más sustituciones de aminoácido no conservadas, en la que el polipéptido de éster sintasa tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. En determinadas realizaciones, el polipéptido de éster sintasa tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa mejorada. Por ejemplo, un residuo de glicina en la posición 395 de SEQ ID NO: 18 puede estar sustituido por un residuo de aminoácido básico, de manera que la variante de éster sintasa resultante conserva o tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa mejorada. En una realización a modo de ejemplo, el residuo de glicina en la posición 395 de SEQ ID NO: 18 se sustituye por un residuo de arginina o lisina, en la que la variante de éster sintasa resultante conserva o tiene capacidad mejorada para catalizar la conversión de un tioéster en un ácido graso y/o un derivado de ácido graso tal como un éster graso.

La variante de éster sintasa puede comprender una o más de las siguientes sustituciones de aminoácido conservadas: reemplazo de un aminoácido alifático, tal como alanina, valina, leucina e isoleucina, por otro aminoácido alifático; reemplazo de una serina por una treonina; reemplazo de una treonina por una serina; reemplazo de un residuo ácido, tal como ácido aspártico y ácido glutámico, por otro residuo ácido; reemplazo de un residuo que lleva un grupo amida; intercambio de un residuo básico, tal como lisina y arginina, por otro residuo básico; y reemplazo de un residuo aromático, tal como fenilalanina y tirosina, por otro residuo aromático. La variante de éster sintasa puede tener aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más sustituciones, adiciones, inserciones o deleciones de aminoácidos. La variante de polipéptido puede tener actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. Por ejemplo, el polipéptido de éster sintasa puede catalizar la conversión de tioésteres en ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos, usando alcoholes como sustratos. En un ejemplo no limitativo, el polipéptido puede catalizar la conversión de una acil graso-CoA y/o una acil graso-ACP en un ácido graso y/o un éster de ácido graso, usando un sustrato de alcohol adecuado, tal como, por ejemplo, un metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, decanol, dodecanol, tetradecanol o hexadecanol. En otro ejemplo no limitativo, el polipéptido de éster sintasa puede catalizar la conversión de una acil graso-ACP y/o una acil graso-CoA en un ácido graso y/o un éster de ácido graso, en ausencia de una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos o ambas. El polipéptido puede ser capaz de catalizar la conversión de un ácido graso libre en un éster graso en ausencia de una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos o ambas.

El polipéptido de éster sintasa puede tener de aproximadamente 200 aminoácidos a aproximadamente 2.000 aminoácidos de longitud, por ejemplo, desde aproximadamente 250 hasta aproximadamente 1.500 residuos de aminoácido de longitud, desde aproximadamente 300 hasta aproximadamente 1.200 residuos de aminoácido de longitud, desde aproximadamente 350 hasta aproximadamente 1.000 residuos de aminoácido de longitud, desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 800 residuos de aminoácido de longitud o desde aproximadamente 450 hasta aproximadamente 600 residuos de aminoácido de longitud. El polipéptido de éster sintasa puede tener

aproximadamente 300 residuos de aminoácido de longitud o más, por ejemplo, aproximadamente 400 residuos de aminoácido de longitud o más, o aproximadamente 450 residuos de aminoácido de longitud o más. El polipéptido de éster sintasa puede tener aproximadamente 1.000 residuos de aminoácido de longitud o menos, por ejemplo, aproximadamente 800 residuos de aminoácido de longitud o menos, aproximadamente 700 residuos de aminoácido de longitud o menos o aproximadamente 600 residuos de aminoácido de longitud o menos. Una éster sintasa a modo de ejemplo tiene aproximadamente 500 residuos de aminoácido de longitud.

El método incluye además modificar la expresión de un gen que codifica para una éster sintasa en la célula huésped. Modificar la expresión de un gen que codifica para una éster sintasa puede incluir expresar un gen heterólogo que codifica para una éster sintasa en la célula huésped y/o aumentar de otra manera la expresión o actividad de un éster sintasa endógena en la célula huésped.

Una enzima tioesterasa endógena de la célula huésped, si está presente, puede no estar modificada. El método puede incluir modificar la expresión de un gen que codifica para una tioesterasa en la célula huésped. Modificar la expresión de un gen que codifica para una tioesterasa puede incluir expresar un gen heterólogo que codifica para una tioesterasa en la célula huésped y/o aumentar la expresión y/o actividad de una tioesterasa endógena en la célula huésped. Modificar la expresión de un gen que codifica para una tioesterasa puede incluir atenuar la expresión de un gen endógeno que codifica para una tioesterasa en la célula huésped, y/o disminuir la expresión y/o actividad de una tioesterasa endógena en la célula huésped. Modificar la expresión de una tioesterasa en la célula huésped puede comprender deleccionar funcionalmente un gen endógeno que codifica para una tioesterasa. No hay actividad tioesterasa detectable en la célula huésped. La tioesterasa puede codificarse por *tesA*, *tesA* sin secuencia líder, *tesB*, *fatB*, *fatB2*, *fatB3*, *fatA* o *fatA1*.

La actividad tioesterasa puede determinarse o medirse usando diversos ensayos *in vitro* o *in vivo* conocidos, incluyendo sin limitación un ensayo de hidrólisis de acil-CoA, que mide la tasa de escisión de un sustrato acil-CoA usando una reacción de DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitro-benzoico)) y monitoriza los cambios de absorbancia a 412 nm y un coeficiente de extinción molar de  $13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . En la técnica se sabe que diversas éster sintasas pueden tener actividades tioesterasa solapantes. Sin embargo, tal como se usa en el presente documento, el término "éster sintasa" no comprende enzimas que también tienen actividad tioesterasa. Las que tienen tanto actividad éster sintasa como actividad tioesterasa se clasifican como tioesterasas en el presente documento.

Se proporciona un método de preparación de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos, por ejemplo, un éster graso, que comprende expresar en una célula huésped un gen que codifica para una éster sintasa, en ausencia de una tioesterasa o una actividad tioesterasa en la célula huésped. La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos en relación con su nivel en una célula huésped silvestre. Los ejemplos de enzimas de degradación de ácidos grasos incluyen, sin limitación, una acil-CoA sintasa de EC 2.3.1.86 o EC 6.2.1.3. Los ejemplos de células huésped a partir de las que puede encontrarse la encima de degradación de ácidos grasos incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica*, *Escherichia coli*, *Arthrobacter*, *Rhodotorula glutinins*, *Acinetobacter*, *Candida lipolytica*, *Botryococcus braunii*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio harveyi*, *Micrococcus leuteus*, *Stenotrophomonas maltophilia* o *Bacillus subtilis*. La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una acil-CoA sintasa en relación con una célula huésped silvestre. La célula huésped puede expresar un nivel atenuado de una acil-CoA sintasa codificada por *fadD*, *fadK*, *BH3103*, *yhfL*, *Pfl-4354*, *EAV15023*, *fadD1*, *fadD2*, *RPC\_4074*, *fadDD35*, *fadDD22*, *faa3p* o el gen que codifica para la proteína ZP\_01644857. La enzima de degradación de ácidos grasos, tal como el gen de acil-CoA sintasa, puede deleccionarse funcionalmente de manera que la célula huésped no tiene actividad acil-CoA sintasa detectable.

Una enzima tioesterasa endógena de la célula huésped, que puede estar presente, no está modificada. La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una tioesterasa, un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos, o ambos. Una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos, o ambas, pueden estar deleccionadas funcionalmente. La célula huésped puede no tener actividad tioesterasa, actividad acil-CoA sintasa detectable o ninguna. La célula huésped puede producir ácidos grasos y/o derivados de sustratos de tioéster y alcohol. Alternativamente, la célula huésped puede producir ésteres grasos a partir de sustratos de ácidos grasos libres y alcohol.

El polipéptido de éster sintasa puede derivarse de, por ejemplo, una bacteria, una planta, un insecto, una levadura, un hongo o un mamífero. El polipéptido de éster sintasa puede ser de una célula de mamífero, una célula vegetal, una célula de insecto, una célula de hongo, una célula de hongos filamentosos, una célula bacteriana, una célula cianobacteriana o una célula de cualquier otro organismo descrita en el presente documento. La éster sintasa que se produce de manera natural puede ser de *Acidobacteria*, *Acidothermus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcanivorax*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Anaeromyxobacter*, *Arabidopsis*, *Bradyrhizobium*, *Erythrobacter*, *Frankia*, *Fundibacter*, *Hahella chejuensis*, *Janibacter*, *Limnobacter*, *Marinobacter*, *Methylibium*, *Microscilla*, *Moritella*, *Mus musculus*, *Mycobacterium*, *Myxococcus*, *Natronomonas*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Photobacterium*, *Proteobacterium*, *Plesiocystis*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Reinekea*, *Rhodiferax*, *Rhodococcus*, *Roseiflexus*, *Saccharopolyspora*, *Salinibacter*, *Simmodsia Solibacter*, *Sphingopyxis*, *Stigmatella*, *Streptomyces*, *Tenacibaculum* o *Ustilago*.

La éster sintasa que se produce de manera natural puede derivarse a partir de uno cualquiera de *Acidobacteria bacterium*, *Acidothermus cellulolyticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter baylyi*, *Acinetobacter sp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Alcaligenes europa*, *Alcanivorax borkumensis*, *Alcanivorax jadensis*, *Alteromonas macleodii*, *Anaeromyxobacter dehalogenans*, *Anaeromyxobacter sp.*, *Arabidopsis thaliana*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Cryptococcus curvatus*, *Erythrobacter litoralis*, *Erythrobacter sp.*, *Frankia sp.*, *Fundibacter jadensis*, *proteobacteria gamma*, *Hahella chejuensis*, *Homo sapiens*, *Janibacter sp.*, *Limnobacter sp.*, *proteobacteria gamma marina*, *Marinobacter algicola*, *Marinobacter aquaeolei*, *Marinobacter hydrocarbinoclasticus*, *Marinobacter sp.*, *Methylibium petroleiphilum*, *Microscilla marina*, *Moritella sp.*, *Mortierella alpina*, *Mus musculus*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium gilvum*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium sp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Myxococcus xanthus*, *Natronomonas pharaonis*, *Nocardia farcinica*, *Nocardioidea sp.*, *Photobacterium profundum*, *Plesiocystis pacifica*, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Psychrobacter arcticus*, *Psychrobacter cryohalolentis*, *Psychrobacter sp.*, *Reinekeia sp.*, *Rhodococcus opacus*, *Rhodoferax ferrireducens*, *Rhodococcus sp.*, *Rhodoferax ferrireducens*, *Roseiflexus sp.*, *Roseiflexus castenholzii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharopolyspora erythraea*, *Salinibacter ruber*, *Simmondsia chinensis*, *Solibacter usitatus*, *Sphingopyxis alaskensis*, *Stigmatella aurantiaca*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, *Tenacibaculum sp.* y *Ustilago maydis*. Puede sobreexpresarse el gen que codifica para la éster sintasa o una variante de la misma.

En otras realizaciones, la célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar, en relación con una célula huésped silvestre, un nivel disminuido de al menos uno de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa y un gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos. Uno o más de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa, un gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos pueden estar deletados funcionalmente. La célula huésped que expresa un nivel disminuido de un receptor de proteína de membrana externa puede ser resistente a la infección por fagos. El gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa puede ser *fadE*. El gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa puede ser uno que codifica para un receptor para ferricromo, colicina M, fago T1, fago T5 o fago phi80. Las células huésped que comprenden un receptor de proteína de membrana externa de este tipo incluyen, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica*, *Escherichia coli*, *Arthrobacter*, *Rhodotorula glutinins*, *Acinetobacter*, *Candida lipolytica*, *Botryococcus braunii*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio harveyi*, *Micrococcus leuteus*, *Stenotrophomonas maltophilia* o *Bacillus subtilis*. El gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa puede ser *fhuA* (también conocido como *tonA*). El gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos puede ser *fabR*.

El método puede incluir además cultivar la célula huésped en presencia de al menos un sustrato biológico para el polipéptido de éster sintasa. El método puede incluir cultivar la célula huésped en condiciones que permiten la expresión o sobreexpresión de la enzima éster sintasa o una variante adecuada de la misma. El método puede incluir cultivar la célula huésped en condiciones que permiten la producción de ácidos grasos o derivados de los mismos por medio de una reacción enzimática catalizada por la éster sintasa o una variante de la misma, sin la participación de una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos o ambas. En determinadas realizaciones, el sustrato biológico para el polipéptido de éster sintasa es un tioéster. El sustrato biológico puede ser un alcohol, tal como, por ejemplo, alcoholes grasos de cadena larga o de cadena corta. El sustrato biológico puede ser un ácido graso libre.

Se proporciona un método de producción de un ácido graso y/o derivado de ácido graso, incluyendo, por ejemplo, un éster de ácido graso. El método incluye expresar en una célula huésped un gen que codifica para una éster sintasa o una variante de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26. La éster sintasa puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26.

El método puede incluir además aislar el ácido graso o derivado de ácido graso a partir de la célula huésped modificada por ingeniería genética. El ácido graso o derivado de ácido graso puede estar presente en el entorno extracelular. El ácido graso o derivado de ácido graso puede aislarse del entorno extracelular de la célula huésped. El ácido graso o derivado de ácido graso puede secretarse espontáneamente al entorno extracelular, parcial o completamente. El ácido graso o derivado de ácido graso puede transportarse al entorno extracelular, con o sin la ayuda de una o más proteínas de transporte adecuadas. El ácido graso o derivado de ácido graso puede transportarse de manera pasiva al entorno extracelular.

Una enzima tioesterasa endógena de la célula huésped, si está presente, puede no estar modificada. El método

puede incluir modificar la expresión de un gen que codifica para una tioesterasa en la célula huésped. Modificar la expresión de un gen que codifica para una tioesterasa puede incluir expresar un gen heterólogo que codifica para una tioesterasa en la célula huésped y/o aumentar la expresión o actividad de una tioesterasa endógena en la célula huésped. Alternativamente, modificar la expresión de un gen que codifica para una tioesterasa incluye atenuar la expresión de un gen endógeno que codifica para una tioesterasa en la célula huésped. Modificar la expresión de un gen que codifica para una tioesterasa puede incluir deleccionar funcionalmente un gen endógeno que codifica para una tioesterasa. En particular, la tioesterasa puede codificarse por *tesA*, *tesA* sin secuencia líder, *tesB*, *fatB*, *fatB2*, *fatB3*, *fatA* o *fatA1*.

La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos en relación con su nivel en una célula huésped silvestre. Las enzimas de degradación de ácidos grasos a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, enzimas acil-CoA sintasa de EC 2.3.1.86 o EC 6.2.1.3. La célula huésped puede expresar un nivel atenuado de una acil-CoA sintasa codificada por *fadD*, *BH3103*, *yhfL*, *Pfl-4354*, *EAV15023*, *fadD1*, *fadD2*, *RPC\_4074*, *fadDD35*, *fadDD22*, *faa3p* o el gen que codifica para la proteína ZP\_01644857. La enzima de degradación de ácidos grasos descrita anteriormente tal como, por ejemplo, una acil-CoA sintasa, puede deleccionarse funcionalmente de manera que la célula huésped no tiene actividad acil-CoA sintasa detectable.

La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una tioesterasa, un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos o ambas. Una tioesterasa, una acil-CoA sintasa o ambas, pueden estar deleccionadas funcionalmente. La célula huésped puede no tener actividad tioesterasa o actividad de enzima de degradación de ácidos grasos detectable. La célula huésped puede ser capaz de producir ácidos grasos y/o derivados de los mismos.

La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar, en relación con una célula huésped silvestre, un nivel disminuido de al menos uno de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa y un gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos. Uno o más de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa y un gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos pueden estar deleccionados funcionalmente. El gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa puede ser *fadE*. El gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa puede ser uno que codifica para un receptor para ferricromo, colicina M, fago T1, fago T5 o fago phi80. El gen que codifica para un receptor de membrana externa puede ser *fhuA* (también conocido como *tonA*). El gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos puede ser *fabR*.

El polipéptido de éster sintasa puede derivarse a partir de una bacteria, una planta, un insecto, una levadura, un hongo o un mamífero. El polipéptido puede ser de una célula de mamífero, una célula vegetal, una célula de insecto, una célula de levadura, una célula de hongo, una célula de hongos filamentosos, una célula bacteriana o una célula de cualquier otro organismo descrito en el presente documento. En determinadas realizaciones, la éster sintasa es de *Acidobacteria*, *Acidothermus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcanivorax*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Anaeromyxobacter*, *Arabidopsis*, *Bradyrhizobium*, *Erythrobacter*, *Frankia*, *Fundibacter*, *Hahella chejuensis*, *Janibacter*, *Limnobacter*, *Marinobacter*, *Methylibium*, *Microscilla*, *Moritella*, *Mus musculus*, *Mycobacterium*, *Myxococcus*, *Natronomonas*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Photobacterium*, *Proteobacterium*, *Plesiocystis*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Reinekea*, *Rhodofera*, *Rhodococcus*, *Roseiflexus*, *Saccharopolyspora*, *Salinibacter*, *Simmondsia Solibacter*, *Sphingopyxis*, *Stigmatella*, *Streptomyces*, *Tenacibaculum* o *Ustilago*.

La éster sintasa puede derivarse a partir de uno cualquiera de *Acidobacteria bacterium*, *Acidothermus cellulolyticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter baylyi*, *Acinetobacter sp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Alcaligenes europus*, *Alcanivorax borkumensis*, *Alcanivorax jadensis*, *Alteromonas macleodii*, *Anaeromyxobacter dehalogenans*, *Anaeromyxobacter sp.*, *Arabidopsis thaliana*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Cryptococcus curvatus*, *Erythrobacter litoralis*, *Erythrobacter sp.*, *Frankia sp.*, *Fundibacter jadensis*, *proteobacteria gamma*, *Hahella chejuensis*, *Homo sapiens*, *Janibacter sp.*, *Limnobacter sp.*, *proteobacteria gamma marina*, *Marinobacter algicola*, *Marinobacter aquaeolei*, *Marinobacter hydrocarbinoclasticus*, *Marinobacter sp.*, *Methylibium petroleiphilum*, *Microscilla marina*, *Moritella sp.*, *Mortierella alpina*, *Mus musculus*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium gilvum*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium sp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Myxococcus xanthus*, *Natronomonas pharaonis*, *Nocardia farcinica*, *Nocardioides sp.*, *Photobacterium profundum*, *Plesiocystis pacifica*, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Psychrobacter arcticus*, *Psychrobacter cryohalolentis*, *Psychrobacter sp.*, *Reinekea sp.*, *Rhodococcus opacus*, *Rhodofera ferrireducens*, *Rhodococcus sp.*, *Rhodofera ferrireducens*, *Roseiflexus sp.*, *Roseiflexus castenholzii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharopolyspora erythraea*, *Salinibacter ruber*, *Simmondsia chinensis*, *Solibacter usitatus*, *Sphingopyxis alaskensis*, *Stigmatella aurantiaca*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, *Tenacibaculum sp.* y *Ustilago maydis*. Puede sobreexpresarse el gen que codifica para la éster sintasa o una variante de la misma.

El método puede incluir además cultivar la célula huésped en presencia de al menos un sustrato biológico para el

- polipéptido de éster sintasa. El método puede incluir cultivar la célula huésped en condiciones suficientes para permitir la expresión o sobreexpresión de una éster sintasa en la célula huésped. Una tioesterasa endógena de la célula huésped, si está presente, puede no estar modificada. La célula huésped puede expresar un nivel atenuado de una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos o ambas. La tioesterasa, la enzima de degradación de ácidos grasos o ambas, pueden estar delecionadas funcionalmente. La célula huésped puede no tener actividad tioesterasa, actividad acil-CoA sintasa, o ninguna actividad detectable. El método puede incluir cultivar las células huésped en condiciones suficientes para permitir la producción de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos. La célula huésped puede cultivarse en presencia de sustratos de tioéster. La célula huésped puede cultivarse en presencia de un alcohol. Aún en otra realización, la célula huésped se cultiva en presencia de un ácido graso libre.
- 5 Se proporciona un método de producción de un ácido graso y/o un derivado de ácido graso tal como, por ejemplo, un éster graso. El método comprende expresar en una célula huésped un polinucleótido que se hibrida con un complemento de una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 27, 28, 29 ó 30, o con un fragmento de las mismas, en el que el polinucleótido codifica para un polipéptido que tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. Por ejemplo, el polipéptido puede catalizar la conversión de tioésteres en ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos tales como ésteres grasos, usando uno o más alcoholes como sustratos. Los sustratos de tioéster adecuados pueden incluir acil-CoA, tales como, por ejemplo, acil graso-CoA y acil-ACP, tales como, por ejemplo, acil graso-ACP. Los sustratos de alcohol adecuados incluyen, por ejemplo, alcoholes de cadena corta o larga, tales como metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, octanol, heptanol, decanol, dodecanol, tetradecanol o hexadecanol. El polipéptido puede ser capaz de catalizar la conversión de un ácido graso libre en ésteres grasos.
- 10 El polinucleótido puede hibridarse en condiciones de baja rigurosidad, rigurosidad media, alta rigurosidad o muy alta rigurosidad, con un complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 27, 28, 29 ó 30, o con un fragmento de las mismas. El polinucleótido puede comprender una secuencia que tiene codones optimizados para la expresión o sobreexpresión en una célula huésped seleccionada.
- 15 El método puede comprender además aislar el ácido graso o derivado de ácido graso a partir de la célula huésped. El ácido graso o derivado de ácido graso puede estar presente en el entorno extracelular. El ácido graso o derivado de ácido graso puede aislarse del entorno extracelular de la célula huésped. El ácido graso o derivado de ácido graso puede secretarse de manera espontánea, parcial o completamente, a partir de la célula huésped. El ácido graso o derivado de ácido graso puede transportarse al entorno extracelular con o sin la ayuda de una o más proteínas de transporte. El ácido graso o derivado de ácido graso puede transportarse de manera pasiva al entorno extracelular.
- 20 Una tioesterasa endógena de la célula huésped, si está presente, puede no estar modificada. El método puede incluir modificar la expresión de un gen que codifica para una tioesterasa en la célula huésped. Modificar la expresión de un gen que codifica para una tioesterasa puede incluir expresar un gen heterólogo que codifica para una tioesterasa en la célula huésped y/o aumentar la expresión o actividad de una tioesterasa endógena en la célula huésped. Modificar la expresión de un gen que codifica para una tioesterasa puede incluir atenuar la expresión de un gen endógeno que codifica para una tioesterasa en la célula huésped y/o delecionar funcionalmente una tioesterasa endógena. La tioesterasa puede codificarse por *tesA*, *tesA* sin secuencia líder, *tesB*, *fatB*, *fatB2*, *fatB3*, *fatA* o *fatA1*.
- 25 La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos en relación con su nivel en una célula huésped silvestre. Las enzimas de degradación de ácidos grasos a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, enzimas acil-CoA sintasa de EC 2.3.1.86 o EC 6.2.1.3. La célula huésped puede expresar un nivel atenuado de una acil-CoA sintasa codificada por *fadD*, *fadK*, *BH3103*, *yhfL*, *pfl-4354*, *eav15023*, *fadD1*, *fadD2*, *rpc\_4074*, *fadDD35*, *fadDD22*, *faa3p* o el gen que codifica para la proteína ZP\_01644857. La enzima de degradación de ácidos grasos mencionada anteriormente, tal como el gen de acil-CoA sintasa, puede delecionarse funcionalmente de manera que la célula huésped no tiene una actividad acil-CoA sintasa detectable.
- 30 La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una tioesterasa, un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos o ambos. Una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos o ambas, pueden estar delecionadas funcionalmente. La célula huésped puede no tener actividad tioesterasa o actividad de enzima de degradación de ácidos grasos detectable. La célula huésped puede ser capaz de producir ácidos grasos y/o derivados de los mismos.
- 35 La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar, en relación con una célula huésped silvestre, un nivel disminuido de al menos uno de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa y un gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos. Uno o más de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa y un gen que codifica para un regulador de la transcripción de ácidos grasos pueden estar delecionados funcionalmente. El gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa puede ser *fadE*. El gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa puede ser uno que codifica para un receptor para ferricromo, colicina M, fago T1, fago T5 o fago phi80. El gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa puede ser *fhuA* (también conocido como *tonA*). El gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

grasos puede ser *fabR*.

La éster sintasa puede derivarse a partir de una bacteria, una planta, un insecto, una levadura, un hongo o un mamífero. El polinucleótido de éster sintasa puede ser de una célula de mamífero, una célula vegetal, una célula de insecto, una célula de levadura, una célula de hongo, una célula de hongos filamentosos, una célula bacteriana o una célula de cualquier otro organismo descrito en el presente documento. El polinucleótido puede ser de *Acidobacteria*, *Acidothermus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcanivorax*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Anaeromyxobacter*, *Arabidopsis*, *Bradyrhizobium*, *Erythrobacter*, *Frankia*, *Fundibacter*, *Hahella chejuensis*, *Janibacter*, *Limnobacter*, *Marinobacter*, *Methylibium*, *Microscilla*, *Moritella*, *Mus musculus*, *Mycobacterium*, *Myxococcus*, *Natronomonas*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Photobacterium*, *Proteobacterium*, *Plesiocystis*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Reinekea*, *Rhodoferax*, *Rhodococcus*, *Roseiflexus*, *Saccharopolyspora*, *Salinibacter*, *Simmodsia Solibacter*, *Sphingopyxis*, *Stigmatella*, *Streptomyces*, *Tenacibaculum* o *Ustilago*.

El polinucleótido de éster sintasa puede derivarse a partir de uno cualquiera de *Acidobacteria bacterium*, *Acidothermus cellulolyticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter baylyi*, *Acinetobacter* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Alcaligenes europus*, *Alcanivorax borkumensis*, *Alcanivorax jadensis*, *Alteromonas macleodii*, *Anaeromyxobacter dehalogenans*, *Anaeromyxobacter* sp., *Arabidopsis thaliana*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Cryptococcus curvatus*, *Erythrobacter litoralis*, *Erythrobacter* sp., *Frankia* sp., *Fundibacter jadensis*, *proteobacteria gamma*, *Hahella chejuensis*, *Homo sapiens*, *Janibacter* sp., *Limnobacter* sp., *proteobacteria gamma marina*, *Marinobacter algicola*, *Marinobacter aquaeolei*, *Marinobacter hydrocarbinoclasticus*, *Marinobacter* sp., *Methylibium petroleiphilum*, *Microscilla marina*, *Moritella* sp., *Mortierella alpina*, *Mus musculus*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium gilvum*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium* sp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Myxococcus xanthus*, *Natronomonas pharaonis*, *Nocardia farcinica*, *Nocardioides* sp., *Photobacterium profundum*, *Plesiocystis pacifica*, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Psychrobacter arcticus*, *Psychrobacter cryohalolentis*, *Psychrobacter* sp., *Reinekea* sp., *Rhodococcus opacus*, *Rhodoferax ferrireducens*, *Rhodococcus* sp., *Rhodoferax ferrireducens*, *Roseiflexus* sp., *Roseiflexus castenholzii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharopolyspora erythraea*, *Salinibacter ruber*, *Simmodsia chinensis*, *Solibacter usitatus*, *Sphingopyxis alaskensis*, *Stigmatella aurantiaca*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, *Tenacibaculum* sp. y *Ustilago maydis*. Puede sobreexpresarse el polinucleótido que codifica para la éster sintasa o una variante de la misma.

El método puede comprender además cultivar la célula huésped en presencia de al menos un sustrato biológico para el polipéptido de éster sintasa. El método puede comprender cultivar la célula huésped en condiciones que son suficientes para permitir la expresión o sobreexpresión de la éster sintasa en la célula huésped. El método puede comprender además cultivar la célula huésped en condiciones que son suficientes para permitir la producción de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos. El método puede comprender cultivar la célula huésped en presencia de un sustrato de tioéster tal como, por ejemplo, una acil graso-CoA o una acil graso-ACP. El método puede comprender cultivar la célula huésped en presencia de un sustrato de alcohol. El método puede comprender cultivar la célula huésped en presencia de un ácido graso libre.

Se proporciona un método de producción de un ácido graso o un derivado de ácido graso tal como, por ejemplo, un éster graso. El método comprende expresar en una célula huésped un gen heterólogo que codifica para una éster sintasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, o una variante de la misma. Alternativamente, el método comprende manipular un gen de éster sintasa endógena de una célula huésped que codifica para una éster sintasa de SEQ ID NO: 18, o una variante de la misma, usando alteración genómica. El método puede incluir además aislar el ácido graso y/o derivado de ácido graso a partir de la célula huésped.

Se proporciona un método *in vitro* de producción de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos extracelularmente a partir de un sustrato que usa una éster sintasa purificada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, o una variante de la misma. La célula huésped puede cultivarse en condiciones que permiten la expresión o sobreexpresión de la éster sintasa o una variante de la misma. La célula huésped se recoge entonces y se lisa. Opcionalmente, se purifica la mezcla resultante. Pueden añadirse sustratos adecuados tales como los descritos en el presente documento a los extractos libres de células en condiciones que permiten la producción de un ácido graso y/o un derivado de ácido graso.

La variante de éster sintasa puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, con una o más sustituciones, adiciones, inserciones o deleciones de aminoácidos, en la que el polipéptido tiene actividad éster sintasa y/o actividad aciltransferasa. En determinadas realizaciones, la variante de éster sintasa tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa aumentada. Por ejemplo, el polipéptido de éster sintasa puede, o tiene capacidad mejorada de, catalizar la conversión de tioésteres en ésteres grasos, usando alcoholes como sustratos. Los sustratos de tioéster incluyen, por ejemplo, tioésteres grasos tales como acil graso-CoA o acil graso-ACP. En algunas realizaciones, la variante de éster sintasa puede, o tiene capacidad mejorada de, catalizar la conversión de ácidos grasos libres en ésteres grasos, usando alcoholes como sustratos. Los sustratos de alcohol incluyen, por ejemplo, alcoholes de cadena larga o corta tales como metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, decanol, dodecanol, tetradecanol o hexadecanol.

- 5 En algunas realizaciones, la variante de éster sintasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, con una o más sustituciones de aminoácido no conservadas, en la que la variante conserva la actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. En algunas realizaciones, la variante de éster sintasa tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa mejorada. En una realización a modo de ejemplo, el residuo de glicina en la posición 395 de SEQ ID NO: 18 está sustituido por un residuo de aminoácido básico, y la variante de éster sintasa resultante conserva o tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa mejorada. En algunas realizaciones, el residuo de glicina en la posición 395 de SEQ ID NO: 18 se sustituye por un residuo de arginina o lisina, y la variante de éster sintasa resultante tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa mejorada.
- 10 La variante de éster sintasa puede comprender una o más sustituciones de aminoácido conservadas. La variante de éster sintasa puede tener aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más sustituciones, adiciones, inserciones o deleciones de aminoácido. La variante de éster sintasa puede tener actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. Por ejemplo, el polipéptido puede ser capaz de catalizar la conversión de tioésteres en ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos tales como ésteres grasos, usando alcoholes como sustratos. El polipéptido puede ser capaz de producir un éster graso a partir de un ácido graso libre y un alcohol adecuados, tales como, por ejemplo, alcoholes de cadena larga o corta, tales como metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, decanol, dodecanol, tetradecanol o hexadecanol.
- 15 Una tioesterasa endógena de la célula huésped, si está presente, puede no estar modificada. El método puede incluir modificar la expresión de un gen que codifica para una tioesterasa en la célula huésped. Modificar la expresión de un gen de tioesterasa puede incluir atenuar la expresión de un gen endógeno que codifica para una tioesterasa en la célula huésped y/o deleccionar funcionalmente un gen de este tipo. La tioesterasa puede codificarse por *tesA*, *tesA* sin secuencia líder, *tesB*, *fatB*, *fatB2*, *fatB3*, *fatA* o *fatA1*.
- 20 La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos en relación con su nivel en una célula huésped silvestre. Las enzimas de degradación de ácidos grasos a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, enzimas acil-CoA sintasa de EC 2.3.1.86 o EC 6.2.1.3. La célula huésped puede expresar un nivel atenuado de una acil-CoA sintasa codificada por *fadD*, *fadK*, *BH3103*, *yhfL*, *pfl-4354*, *EAV15023*, *fadD1*, *fadD2*, *rpc\_4074*, *fadDD35*, *fadDD22*, *faa3p* o el gen que codifica para la proteína ZP\_01644857. La enzima de degradación de ácidos grasos mencionada anteriormente, tal como el gen de acil-CoA sintasa, puede deleccionarse funcionalmente de manera que la célula huésped no expresa una acil-CoA sintasa o no tiene una actividad acil-CoA sintasa detectable.
- 25 La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una tioesterasa, un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos o ambos. Una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos o ambas, pueden estar deleccionadas funcionalmente. La célula huésped puede no tener nivel detectable de actividad tioesterasa o actividad acil-CoA sintasa. La célula huésped puede ser capaz de producir ácidos grasos y/o derivados de los mismos.
- 30 La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar, en relación con una célula huésped silvestre, un nivel disminuido de al menos uno de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa y un gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos. Uno o más de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa y un gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos pueden deleccionarse funcionalmente. El gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa puede ser *fadE*. El gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa puede ser uno que codifica para un receptor para ferricromo, colicina M, fago T1, fago T5 o fago phi80. El gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa puede ser *fhuA* (también conocido como *tonA*). El gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos puede ser *fabR*.
- 35 El método puede incluir además cultivar la célula huésped en presencia de al menos un sustrato biológico para el polipéptido de éster sintasa. El método puede incluir cultivar la célula huésped en condiciones que permiten la expresión o sobreexpresión de la éster sintasa en la célula huésped. El método puede incluir cultivar la célula huésped en condiciones que permiten la producción de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos deseables. El método puede incluir cultivar la célula huésped en presencia de un sustrato de tioéster. El método puede incluir cultivar la célula huésped en presencia de un alcohol. El método puede incluir cultivar la célula huésped en presencia de un ácido graso libre.
- 40 Se proporciona un método de producción de un ácido graso y/o un derivado de ácido graso tal como, por ejemplo, un éster graso. El método incluye expresar en una célula huésped un gen que codifica para un polipéptido de éster sintasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 35% de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos aproximadamente el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para tener un nivel atenuado de una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos o ambas. Alternativamente, la tioesterasa, la enzima de degradación de ácidos grasos o ambas, están deleccionadas funcionalmente. La célula
- 45
- 50
- 55
- 60

huésped puede no tener actividad tioesterasa o actividad acil-CoA sintasa detectable. El método puede incluir además aislar un ácido graso o derivado de ácido graso así producido a partir de la célula huésped.

Se proporciona un método *in vitro* de producción de un ácido graso y/o derivado de ácido graso extracelularmente, que usa una éster sintasa purificada que tiene al menos aproximadamente el 35% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, a partir de un sustrato adecuado. La célula huésped puede cultivarse en condiciones que permiten la expresión o sobreexpresión de la enzima éster sintasa o una variante de la misma. La célula huésped se recoge entonces y se lisa. Opcionalmente, se purifica la mezcla resultante. Sustratos adecuados tales como los descritos en el presente documento pueden añadirse a los extractos libres de células en condiciones que permiten la producción de un ácido graso y/o un derivado de ácido graso.

La secuencia de aminoácidos de una éster sintasa o una variante adecuada puede tener al menos aproximadamente el 35%, por ejemplo, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la éster sintasa es SEQ ID NO: 18. Un polipéptido de éster sintasa a modo de ejemplo incluye una éster sintasa de *Limnobacter sp.* MED105, con un n.º de registro de GenBank de ZP\_01915978 (SEQ ID NO: 41), que tiene aproximadamente el 51% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la éster sintasa de *Marinobacter hydrocarbonclasticus* DSM 8798, SEQ ID NO: 18.

Una tioesterasa endógena de la célula huésped, si está presente, puede no estar modificada. El método puede incluir modificar la expresión de un gen que codifica para una tioesterasa en la célula huésped. Modificar la expresión de un gen de tioesterasa puede incluir atenuar la expresión de un gen endógeno que codifica para una tioesterasa en la célula huésped y/o deleciónar funcionalmente ese gen. La tioesterasa puede codificarse por *tesA*, *tesA* sin secuencia líder, *tesB*, *fatB*, *fatB2*, *fatB3*, *fatA* o *fatA1*.

La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos en relación con su nivel en una célula huésped silvestre. Las enzimas de degradación de ácidos grasos a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, enzimas acil-CoA sintasa de EC 2.3.1.86 o EC 6.2.1.3. En realizaciones particulares, la célula huésped expresa un nivel atenuado de una acil-CoA sintasa codificada por *fadD*, *fadK*, *BH3103*, *yhfL*, *pfl-4354*, *EAV15023*, *fadD1*, *fadD2*, *rpc\_4074*, *fadDD35*, *fadDD22*, *faa3p* o el gen que codifica para la proteína ZP\_01644857. La enzima de degradación de ácidos grasos mencionada anteriormente, tal como el gen de acil-CoA sintasa, puede delecionarse funcionalmente de manera que la célula huésped no expresa la acil-CoA sintasa o no tiene actividad acil-CoA sintasa detectable.

La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos tal como una acil-CoA sintasa o ambas. Una tioesterasa, una acil-CoA sintasa o ambas, pueden estar delecionadas funcionalmente. La célula huésped puede ser capaz de producir ácidos grasos y/o derivados de los mismos.

La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar, en relación con una célula huésped silvestre, un nivel disminuido de al menos uno de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa y un gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos. Uno o más de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa y un gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos pueden estar delecionados funcionalmente. El gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa puede ser *fadE*. El gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa puede ser uno que codifica para un receptor para ferricromo, colicina M, fago T1, fago T5 o fago phi80. El gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa es *thiA* (también conocido como *tonA*). El gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos es *fabR*.

Se proporciona un método de producción de un ácido graso o un derivado de ácido graso tal como, por ejemplo, un éster graso. El método incluye expresar en una célula huésped un polinucleótido que se hibrida en condiciones de baja rigurosidad, rigurosidad media, alta rigurosidad o muy alta rigurosidad, con un complemento de SEQ ID NO: 27, o con un fragmento de la misma, en el que el polinucleótido codifica para un polipéptido que tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. Por ejemplo, el polipéptido tiene actividad éster sintasa y puede convertir tioésteres en ésteres grasos, usando alcoholes como sustratos. Los sustratos de tioéster adecuados incluyen, por ejemplo, tioésteres grasos tales como acil graso-CoA o acil graso-ACP. La célula huésped puede producir ésteres grasos a partir de sustratos de ácido graso libre y alcohol. Los sustratos de alcohol adecuados incluyen, por ejemplo, alcoholes de cadena larga o corta tales como metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, decanol, dodecanol, tetradecanol o hexadecanol.

- Una tioesterasa endógena de la célula huésped, si está presente, puede no estar modificada. El método puede incluir modificar la expresión de un gen que codifica para una tioesterasa en la célula huésped. Modificar la expresión de un gen de tioesterasa puede incluir atenuar la expresión de un gen endógeno que codifica para una tioesterasa en la célula huésped y/o deleciónar funcionalmente ese gen. La tioesterasa puede codificarse por *tesA*, *tesA* sin secuencia líder, *tesB*, *fatB*, *fatB2*, *fatB3*, *fatA* o *fatA1*.
- La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos en relación con su nivel en una célula huésped silvestre. Las enzimas de degradación de ácidos grasos a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, enzimas acil-CoA sintasa de EC 2.3.1.86 o EC 6.2.1.3. En realizaciones particulares, la célula huésped expresa un nivel atenuado de una acil-CoA sintasa codificada por *fadD*, *fadK*, *BH3103*, *yhfL*, *pfl-4354*, *EAV15023*, *fadD1*, *fadD2*, *rpc\_4074*, *fadDD35*, *fadDD22*, *faa3p* o el gen que codifica para la proteína ZP\_01644857. La enzima de degradación de ácidos grasos mencionada anteriormente, tal como el gen de acil-CoA sintasa, puede deleciónarse funcionalmente de manera que la célula huésped no expresa una acil-CoA sintasa o no tiene actividad acil-CoA sintasa detectable.
- La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos tal como una acil-CoA sintasa o ambas. Una tioesterasa, una acil-CoA sintasa o ambas, están deleciónadas funcionalmente. La célula huésped puede ser capaz de producir ácidos grasos y/o derivados de los mismos.
- La célula huésped se modifica por ingeniería genética para expresar, en relación con una célula huésped silvestre, un nivel disminuido de al menos uno de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa y un gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos. Uno o más de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa y un gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos pueden estar deleciónados funcionalmente. El gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa puede ser *fadE*. El gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa puede ser uno que codifica para un receptor para ferricromo, colicina M, fago T1, fago T5 o fago phi80. El gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa puede ser *thuA* (también conocido como *tonA*). El gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos puede ser *fabR*.
- El método puede incluir además cultivar la célula huésped en presencia de al menos un sustrato biológico de la éster sintasa. El método puede incluir cultivar la célula huésped en condiciones que permiten la expresión o sobreexpresión de la enzima éster sintasa en la célula huésped. El método puede incluir cultivar la célula huésped en condiciones que permiten la producción de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos. El método puede incluir cultivar la célula huésped en presencia de un sustrato de tioéster. El método puede incluir cultivar la célula huésped en presencia de un sustrato de alcohol. El método puede incluir cultivar la célula huésped en presencia de un ácido graso libre.
- El método puede incluir además aislar un ácido graso o derivado de ácido graso así producido a partir de la célula huésped. El ácido graso o derivado de ácido graso puede estar presente en el entorno extracelular. El ácido graso o derivado de ácido graso puede aislarse del entorno extracelular de la célula huésped. El ácido graso o derivado de ácido graso puede secretarse de manera espontánea, parcial o completamente, a partir de la célula huésped. El ácido graso o derivado de ácido graso puede transportarse al entorno extracelular, con o sin la ayuda de una o más proteínas de transporte adecuadas. El ácido graso o derivado de ácido graso puede transportarse de manera pasiva al entorno extracelular.
- Se proporciona un método *in vitro* de producción de un ácido graso y/o derivado de ácido graso extracelularmente, que usa una éster sintasa purificada codificada por un polinucleótido que se hibrida con un complemento de SEQ ID NO: 27, o con un fragmento de la misma, y un sustrato adecuado. Por ejemplo, la célula huésped puede cultivarse en condiciones que permiten la expresión o sobreexpresión de la enzima éster sintasa o una variante de la misma, y la célula se recoge entonces y se lisa. Opcionalmente, la mezcla resultante puede purificarse. Sustratos adecuados tales como los descritos en el presente documento pueden añadirse a los extractos libres de células en condiciones que permiten la producción de un ácido graso y/o un derivado de ácido graso.
- Se proporciona un método de producción de un ácido graso y/o un derivado de ácido graso tal como, por ejemplo, un éster graso. El método incluye expresar en una célula huésped un vector recombinante que comprende una secuencia de polinucleótido de éster sintasa que tiene al menos aproximadamente el 50% de identidad de secuencia con secuencia de polinucleótido en la figura 16. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, o al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 27, 28, 29 ó 30. La secuencia de nucleótidos puede ser SEQ ID NO: 27, 28, 29 ó 30. En un ejemplo, un vector recombinante que comprende una secuencia de

- 5 polinucleótido de éster sintasa de SEQ ID NO: 42 (con codones optimizado a partir de un polinucleótido que codifica para un homólogo de éster sintasa de *Limnobacter sp. MED105*), que tiene aproximadamente el 50% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 27, puede expresarse en una célula huésped para producir un ácido graso y/o derivado del mismo. La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos o ambas. Una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos o ambas, pueden estar delecionadas funcionalmente. La célula huésped puede ser capaz de producir ácidos grasos y/o derivados de los mismos.
- 10 El método incluye además aislar el ácido graso o derivado de ácido graso a partir de la célula huésped. El ácido graso o derivado de ácido graso puede estar presente en el entorno extracelular. El ácido graso o derivado de ácido graso puede aislarse del entorno extracelular de la célula huésped. El ácido graso o derivado de ácido graso puede secretarse de manera espontánea, parcial o completamente, a partir de la célula huésped. El ácido graso o derivado de ácido graso puede transportarse al entorno extracelular, con o sin la ayuda de una o más proteínas de transporte adecuadas. El ácido graso o derivado de ácido graso puede transportarse de manera pasiva al entorno extracelular.
- 15 Se proporciona un método *in vitro* de producción de un ácido graso y/o derivado de ácido graso extracelularmente, en el que una célula huésped que comprende un vector recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos de éster sintasa que tiene al menos aproximadamente el 50% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de nucleótidos enumerada en la figura 16 se cultiva en condiciones que permiten la expresión o sobreexpresión de una éster sintasa. La célula huésped se recoge entonces y se lisa. Opcionalmente, se purifica la mezcla resultante. Entonces se añade un sustrato adecuado al extracto libre de células en condiciones que permiten la producción de un ácido graso y/o un derivado de ácido graso *in vitro*.
- 20 El vector recombinante puede comprender además un promotor operativamente unido a una secuencia de nucleótidos que codifica para una éster sintasa o una variante adecuada. El promotor puede ser un promotor regulado por el desarrollo, uno específico de orgánulo, uno específico de tejido, uno inducible, uno constitutivo o uno específico de célula.
- 25 El vector recombinante puede comprender al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia reguladora acoplada operativamente a la secuencia de nucleótidos; (b) un marcador de selección acoplado operativamente a la secuencia de nucleótidos; (c) una secuencia de marcador acoplada operativamente a la secuencia de nucleótidos; (d) un resto de purificación acoplado operativamente a la secuencia de nucleótidos; (e) una secuencia de secreción acoplada operativamente a la secuencia de nucleótidos; y (f) una secuencia de direccionamiento acoplada operativamente a la secuencia de nucleótidos.
- 30 El vector recombinante puede ser un plásmido.
- La célula huésped puede expresar un polipéptido de éster sintasa que está codificado por el vector recombinante. La secuencia de nucleótidos puede incorporarse de manera estable dentro del ADN genómico de la célula huésped, y la expresión de la secuencia de nucleótidos está bajo el control de una región promotora regulada.
- 35 Una tioesterasa endógena de la célula huésped, si está presente, puede no estar modificada. El método incluye modificar la expresión de un gen que codifica para una tioesterasa en la célula huésped. Modificar la expresión de un gen de tioesterasa puede incluir atenuar la expresión de un gen endógeno que codifica para una tioesterasa en la célula huésped y/o delecionar funcionalmente ese gen. La tioesterasa puede codificarse por *tesA*, *tesA* sin secuencia líder, *tesB*, *fatB*, *fatB2*, *fatB3*, *fatA* o *fatA1*.
- 40 La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos en relación con su nivel en una célula huésped silvestre. Las enzimas de degradación de ácidos grasos a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, enzimas acil-CoA sintasa de EC 2.3.1.86 o EC 6.2.1.3. La célula huésped puede expresar un nivel atenuado de una acil-CoA sintasa codificada por *fadD*, *fadK*, *BH3103*, *yhfL*, *pfl-4354*, *EAV15023*, *fadD1*, *fadD2*, *rpc\_4074*, *fadDD35*, *fadDD22*, *faa3p* o el gen que codifica para la proteína ZP\_01644857. La enzima de degradación de ácidos grasos mencionada anteriormente, tal como el gen de acil-CoA sintasa, puede delecionarse funcionalmente de manera que la célula huésped no expresa una acil-CoA sintasa o no tiene actividad acil-CoA sintasa.
- 45 La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar, en relación con una célula huésped silvestre, un nivel disminuido de al menos uno de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa y un gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos. Uno o más de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa y un gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos pueden estar delecionados funcionalmente. El gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa puede ser *fadE*. El gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa puede ser uno que codifica para un receptor para ferricromo, colicina M, fago T1, fago T5 o fago phi80. El gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa puede ser *fhuA* (también conocido como *tonA*). El gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos puede ser *fabR*.
- 50
- 55

- 5 El método puede incluir además cultivar la célula huésped en presencia de al menos un sustrato biológico de la éster sintasa. El método puede incluir cultivar la célula huésped en condiciones que permiten la expresión o sobreexpresión de la éster sintasa en la célula huésped. El método puede incluir cultivar la célula huésped en condiciones que permiten la producción de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos. El método puede incluir cultivar la célula huésped en presencia de un sustrato de tioéster. El método puede incluir cultivar la célula huésped en presencia de un sustrato de alcohol. El método puede incluir cultivar la célula huésped en presencia de un ácido graso libre.
- 10 Se proporciona un método de producción de un ácido graso y/o un derivado del mismo tal como, por ejemplo, un éster graso. El método incluye expresar en una célula huésped un vector recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos de éster sintasa que tiene al menos aproximadamente el 50% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 27. La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos tal como una acil-CoA sintasa o ambas. Una tioesterasa endógena, una acil-CoA sintasa o ambas pueden estar deletionadas funcionalmente. La célula huésped puede ser capaz de producir ácidos grasos y/o derivados de los mismos.
- 15 El método puede incluir además aislar el ácido graso y/o derivado de ácido graso a partir de la célula huésped. El ácido graso o derivado de ácido graso puede estar presente en el entorno extracelular. El ácido graso o derivado de ácido graso puede aislarse del entorno extracelular de la célula huésped. El ácido graso o derivado de ácido graso puede secretarse de manera espontánea, parcial o completamente, a partir de la célula huésped. El ácido graso o derivado de ácido graso puede transportarse al entorno extracelular, con o sin la ayuda de una o más proteínas de transporte adecuadas. El ácido graso o derivado de ácido graso puede transportarse de manera pasiva al entorno extracelular.
- 20 Se proporciona un método *in vitro* de producción de un ácido graso y/o derivado de ácido graso extracelularmente, en el que una célula huésped comprende un vector recombinante, que a su vez comprende una secuencia de polinucleótido de éster sintasa que tiene al menos aproximadamente el 50% de identidad con SEQ ID NO: 27, y en el que la célula huésped se cultiva en condiciones que permiten la expresión o sobreexpresión de la éster sintasa. La célula huésped se recoge entonces y se lisa. Opcionalmente, se purifica la mezcla resultante. Un sustrato adecuado, por ejemplo, uno seleccionado de los descritos en el presente documento, se añade entonces al extracto libre de células en condiciones que permiten la producción de un ácido graso y/o un derivado de ácido graso *in vitro*.
- 25 La secuencia de nucleótidos puede tener al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, o al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 27. La secuencia de nucleótidos puede ser SEQ ID NO: 27.
- 30 Una tioesterasa endógena de la célula huésped, si está presente, puede no estar modificada. El método puede incluir además modificar la expresión de un gen que codifica para una tioesterasa en la célula huésped. Modificar la expresión de un gen de tioesterasa puede incluir atenuar la expresión de un gen endógeno que codifica para una tioesterasa en la célula huésped y/o deletionar funcionalmente ese gen. La tioesterasa puede codificarse por *tesA*, *tesA* sin secuencia líder, *tesB*, *fatB*, *fatB2*, *fatB3*, *fatA* o *fatA1*.
- 35 La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos en relación con su nivel en una célula huésped silvestre. Las enzimas de degradación de ácidos grasos a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, enzimas acil-CoA sintasa de EC 2.3.1.86 o EC 6.2.1.3. La célula huésped puede expresar un nivel atenuado de una acil-CoA sintasa codificada por *fadD*, *fadK*, *BH3103*, *yhfL*, *pfl-4354*, *EAV15023*, *fadD1*, *fadD2*, *rpc\_4074*, *fadDD35*, *fadDD22*, *faa3p* o el gen que codifica para la proteína ZP\_01644857. La enzima de degradación de ácidos grasos mencionada anteriormente, tal como el gen de acil-CoA sintasa, puede deletionarse funcionalmente de manera que la célula huésped no expresa una acil-CoA sintasa o no tiene actividad acil-CoA sintasa.
- 40 La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una tioesterasa, un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos tal como una acil-CoA sintasa o ambas. Una tioesterasa, una acil-CoA sintasa o ambas, pueden estar deletionadas funcionalmente. La célula huésped puede ser capaz de producir ácidos grasos y/o derivados de los mismos.
- 45 La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar, en relación con una célula huésped silvestre, un nivel disminuido de al menos uno de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa y un gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos. Uno o más de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa y un gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos pueden estar deletionados funcionalmente. El
- 50
- 55

- 5 gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa es *fadE*. El gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa puede ser uno que codifica para un receptor para ferricromo, colicina M, fago T1, fago T5 o fago phi80. El gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa puede ser *fhuA* (también conocido como *tonA*). El gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos puede ser *fabR*.
- El vector recombinante puede comprender además un promotor operativamente unido a la secuencia de nucleótidos que codifica para una éster sintasa o una variante de la misma. El promotor puede ser un promotor regulado por el desarrollo, uno específico de orgánulo, uno específico de tejido, uno inducible, uno constitutivo o uno específico de célula.
- 10 El vector recombinante puede comprender al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia reguladora acoplada operativamente a la secuencia de nucleótidos; (b) un marcador de selección acoplado operativamente a la secuencia de nucleótidos; (c) una secuencia de marcador acoplada operativamente a la secuencia de nucleótidos; (d) un resto de purificación acoplado operativamente a la secuencia de nucleótidos; (e)
- 15 una secuencia de secreción acoplada operativamente a la secuencia de nucleótidos; y (f) una secuencia de direccionamiento acoplada operativamente a la secuencia de nucleótidos.
- El vector recombinante puede ser un plásmido.
- La célula huésped puede expresar una éster sintasa o una variante adecuada que está codificado por el vector recombinante. La secuencia de nucleótidos puede incorporarse de manera estable dentro del ADN genómico de la célula huésped, y la expresión de la secuencia de nucleótidos está bajo el control de una región promotora regulada.
- 20 El método puede incluir además cultivar la célula huésped en presencia de al menos un sustrato biológico de la éster sintasa. El método puede incluir cultivar la célula huésped en condiciones que son suficientes para permitir la expresión o sobreexpresión de la éster sintasa en la célula huésped. El método puede incluir cultivar la célula huésped en condiciones que son suficientes para permitir la producción de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos.
- 25 Una tioesterasa endógena de la célula huésped, si está presente, puede no estar modificada. La célula huésped puede expresar un nivel atenuado de una tioesterasa. Una tioesterasa puede estar delecionada funcionalmente. La célula huésped puede expresar un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos, tal como una acil-CoA sintasa. Una enzima de degradación de ácidos grasos endógena, tal como una acil-CoA sintasa, puede estar delecionada funcionalmente. La célula huésped puede cultivarse en presencia de un tioéster. La célula huésped puede cultivarse en presencia de un ácido graso libre.
- 30 La célula huésped puede seleccionarse del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula vegetal, una célula de insecto, una célula de levadura, una célula de hongo, una célula de hongos filamentosos, una célula cianobacteriana y una célula bacteriana.
- 35 La célula huésped puede ser una célula bacteriana Gram-positiva. En otras realizaciones, la célula huésped es una célula bacteriana Gram-negativa.
- La célula huésped puede seleccionarse del género *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Chrysosporium*, *Saccharomyces*, *Stenotrophomonas*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia* o *Streptomyces*.
- 40 La célula huésped puede ser una célula de *Bacillus lentus*, una célula de *Bacillus brevis*, una célula de *Bacillus stearothermophilus*, una célula de *Bacillus licheniformis*, una célula de *Bacillus alkalophilus*, una célula de *Bacillus coagulans*, una célula de *Bacillus circulans*, una célula de *Bacillus pumilis*, una célula de *Bacillus thuringiensis*, una célula de *Bacillus clausii*, una célula de *Bacillus megaterium*, una célula de *Bacillus subtilis* o una célula de *Bacillus amyloliquefaciens*.
- 45 La célula huésped puede ser una célula de *Trichoderma koningii*, una célula de *Trichoderma viride*, una célula de *Trichoderma reesei*, una célula de *Trichoderma longibrachiatum*, una célula de *Aspergillus awamori*, una célula de *Aspergillus fumigatus*, una célula de *Aspergillus foetidus*, una célula de *Aspergillus nidulans*, una célula de *Aspergillus niger*, una célula de *Aspergillus oryzae*, una célula de *Humicola insolens*, una célula de *Humicola lanuginosa*, una célula de *Rhodococcus opacus*, una célula de *Rhizomucor miehei* o una célula de *Mucor michei*.
- 50 La célula huésped puede ser una célula de *Streptomyces lividans* o una célula de *Streptomyces murinus*.
- La célula huésped puede ser una célula de *Actinomycetes*, una célula de *Saccharomyces cerevisiae*, una célula de *Candida Lipolytica* (o *Yarrowia lipolytica*), una célula de *E. coli* *Arthrobacter AK19*, una célula de *Rhodotorula glutinins*, una célula de *Acintobacter sp. cepa M-1* o una célula de otro microorganismo oleaginoso.

La célula huésped puede ser una célula de una levadura oleaginoso, por ejemplo, *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* o *Lipomyces*. En determinadas realizaciones, la célula huésped es una célula de *Rhodospiridium toruloide*, *Lipomyces starkeyii*, *L. lipoferus*, *Candida revkaufi*, *C. pulcherrima*, *C. Tropicalis*, *C. utilis*, *Trichosporon pullas*, *T. cutaneum*, *Rhodotorula glutinosa*, *R. Garminis* y *Yarrowia lipolytica* (clasificada anteriormente como *Candida lipolytica*). En realizaciones particulares, la célula huésped es una célula de *Yarrowia lipolytica*, cepa ATCC n.º 20362, ATCC n.º 8862, ATCC n.º 18944, ATCC n.º 76982 y/o LGAM S(7)1 (Papanikolaou S., y Aggelis G., Bioresour. Technol., 82(1):43-9, 2002).

Tal como se usa en el presente documento, el término “oleaginoso” se refiere a aquellos organismos que tienden a almacenar su fuente de energía en forma de lípido (o aceite) (Weete, Fungal Lipid Biochemistry, 2ª ed., Plenum, 1980). Y para el fin en el presente documento, los organismos oleaginosos pueden ser bacterias, algas, musgo, levaduras, hongos o plantas que tienen la capacidad de producir aceites.

El término “levadura oleaginoso” se refiere a aquellos microorganismos clasificados como levaduras que pueden elaborar aceite. Generalmente, el contenido de aceite o triacilglicerol celular de los microorganismos oleaginosos sigue una curva sigmoidea, en la que la concentración de lípido aumenta hasta que alcanza un máximo en la fase de crecimiento logarítmica tardía o estacionaria temprana y entonces disminuye gradualmente durante las fases estacionaria tardía y de muerte (Yongmaitchai & Ward, Appl. Environ. Microbiol. 57:419-25 (1991)). No es infrecuente que los microorganismos oleaginosos acumulen en exceso de aproximadamente el 25% de su peso celular seco como aceite. Los ejemplos de levaduras oleaginosas incluyen, pero no se limitan a, los siguientes géneros: *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* y *Lipomyces*.

La célula huésped puede ser una célula de una planta eucariota, algas, cianobacterias, bacterias verdes del azufre (incluyendo, por ejemplo, *Chlorobium*, *Clathrochloris*, *Prosthecochloris*), bacterias verdes no del azufre (incluyendo, por ejemplo, *Chloroflexus*, *Chloronema*, *Oscillochloris*, *Heliothrix*, *Herpetosiphon*, *Roseiflexus* y *Termomicrobium*), bacterias púrpuras del azufre (incluyendo, por ejemplo, *Allochrochromatium*, *Chromatium*, *Halochochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Rhodovulum*, *Thermochromatium*, *Thiocapsa*, *Thiorhodococcus* y *Thiocystis*), bacterias púrpuras no del azufre (incluyendo, por ejemplo, *Phaeospirillum*, *Rhodobac*, *Rhodobacter*, *Rhodomicrobium*, *Rhodopila*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodothalassium*, *Rhodovibrio*, *Roseospira*), extremófilos, levaduras, hongos, organismos modificados por ingeniería genética de los mismos, o un organismo sintético.

La célula huésped puede ser dependiente de la luz o fija carbono por medio de una de las rutas conocidas incluyendo, por ejemplo, la ruta del ciclo de Calvin, la ruta de acetil CoA y la ruta de TCA reductora. Véase, por ejemplo, Fuchs, G, Alternative pathways of autotrophic CO<sub>2</sub> fixation, págs. 365-382 (1989), AUTOTROPHIC BACTERIA, Springer-Verlag, Berlín, Alemania (H. G. Schlegel & B. Bowien ed.). La célula huésped puede tener actividad autótrofa. La célula huésped puede tener actividad fotoautótrofa, tal como en presencia de luz. En algunas realizaciones, la célula huésped es heterótrofa o mixótrofa en ausencia de luz. La célula huésped puede ser una célula de un extremófilo, que se sabe que resisten diversos parámetros ambientales extremos tales como temperatura, radiación, presión, gravedad, vacío, desecación, salinidad, pH, presión de oxígeno y productos químicos. Pueden ser adecuadas células huésped de diversos extremófilos conocidos. Por ejemplo, la célula huésped puede ser de un hipertermófilo tal como *Pyrolobus fumarii*, que crece a o por encima de 80°C. En otro ejemplo, la célula huésped puede ser de termófilos tales como *Synechococcus lividis*, que crecen entre 60-80°C. En un ejemplo adicional, la célula huésped puede ser de mesófilos, que crecen entre 15-60°C. Aún en un ejemplo adicional, la célula huésped puede ser de un psicrófilo tal como una psicrobacteria o determinados insectos, que crecen a o por debajo de 15°C. Además, la célula huésped puede ser de un organismo tolerante a la radiación tal como *Deinococcus radiodurans*. La célula huésped puede ser de un organismo tolerante a la presión, tal como un piezófilo, que tolera una presión de 130 MPa. Alternativamente, la célula huésped puede ser de organismos tolerantes al peso tales como barófilos. La célula huésped puede ser un organismo tolerante a la hipergravedad (por ejemplo, >1 g) o a la hipogravedad (por ejemplo, <1 g). La célula huésped puede ser de un organismo tolerante al vacío tal como un tardígrado, un insecto, un microbio y una semilla. La célula huésped puede ser de un organismo tolerante a la desecación y anhidrobiótico tal como un xerófilo *Artemia salina*, un nematodo, un determinado microbio, un determinado hongo y un líquen. La célula huésped puede ser de un organismo tolerante a la sal tal como un halófilo (por ejemplo, NaCl 2-5 M) *Halobacteriaceae* y *Dunaliella salina*. La célula huésped también puede ser de un organismo tolerante al pH tal como alcalófilos *Natronobacterium*, *Bacillus firmus* OF4, *Spirulina spp.* (por ejemplo, pH > 9) o acidófilos tales como a *Cyanidium caldarium*, *Ferroplasma sp.* (por ejemplo, pH bajo). Alternativamente la célula huésped puede ser de anaerobios, que no pueden tolerar O<sub>2</sub>, tales como *Metanococcus jannaschii*, o microaerófilos, que toleran cierto O<sub>2</sub>, tales como *Clostridium*, y aerobios, que requieren O<sub>2</sub>. Además, la célula huésped puede ser de un organismo tolerante a gas, que tolera CO<sub>2</sub> puro, incluyendo, por ejemplo, *Cyanidium caldarium*. La célula huésped puede ser de un organismo tolerante a metal, incluyendo, por ejemplo metalotolerantes tales como *Ferroplasma acidarmanus* (por ejemplo, Cu, As, Cd, Zn), *Ralstonia sp.* CH34 (por ejemplo, Zn, Co, Cd, Hg, Pb). Véanse, por ejemplo, Gross, Michael. Life on the Edge: Amazing Creatures Thriving in Extreme Environments. Nueva York: Plenum (1998); Seckbach, J. “Search for Life in the Universe with Terrestrial Microbes Which Thrive Under Extreme Conditions”. En Cristiano Batalli Cosmovici, Stuart Bowyer, and Dan Wertheimer, eds., Astronomical and Biochemical Origins and the Search of Life in the Universe, pág. 511. Milán: Editrice Compositori (1997).

La célula huésped puede ser de plantas, incluyendo, sin limitación, plantas de los géneros: *Arabidopsis*, *Beta*,

*Glycina, Jatropha, Miscanthus, Panicum, Phalaris, Populus, Saccharum, Salix, Simmondsia* y *Zea*. Por ejemplo, la célula huésped puede ser de *Arabidopsis thaliana, Panicum virgatum, Miscanthus giganteus* o *Zea mays*. La célula huésped puede ser de algas y cianobacterias, incluyendo, sin limitación, los géneros: *Acanthoceras, Acanthococcus, Acaryochloris, Achnanthes, Achnanthidium, Actinastrum, Actinochloris, Actinocyclus, Actinotaenium, Amphichrysis, Amphidinium, Amphikrikos, Amphipleura, Amphiprora, Amphithrix, Amphora, Anabaena, Anabaenopsis, Aneumastus, Ankistrodesmus, Ankyra, Anomoeoneis, Apatococcus, Aphanizomenon, Aphanocapsa, Aphanochaete, Aphanothece, Apicocystis, Apistonema, Arthrodesmus, Artherospira, Ascochloris, Asterionella, Asterococcus, Audouinella, Aulacoseira, Bacillaria, Balbiania, Bambusina, Bangia, Basichlamys, Batrachospermum, Binuclearia, Bitrichia, Blidingia, Botridiopsis, Botrydium, Botryococcus, Botryosphaerella, Brachiomonas, Brachysira, Brachytrichia, Brebissonia, Bulbochaete, Bumilleria, Bumilleriopsis, Caloneis, Calothrix, Campylodiscus, Capsosiphon, Carteria, Catena, Cavinula, Centrtractus, Centronella, Cerutium, Chaetoceros, Chaetochloris, Chaetomorpha, Chaetonella, Chaetonema, Chaetopeltis, Chaetophora, Chaetosphaeridium, Chamaesiphon, Chara, Characiochloris, Characiopsis, Characium, Charales, Chilomonas, Chlainomonas, Chlamydolepharis, Chlamydocapsa, Chlamydomonas, Chlamydomonopsis, Chlamydomyxa, Chlamydonephris, Clorangiella, Clorangiopsis, Chlorella, Chlorobotrys, Chlorobrachis, Chlorochytrium, Chlorococcum, Chlorogloea, Chlorogloeopsis, Chlorogonium, Chlorolobion, Chloromonas, Chlorophysema, Chlorophyta, Chlorosaccus, Chlorosarcina, Choricystis, Chromophyton, Chromulina, Chroococciopsis, Chroococcus, Chroodactilon, Chroomonas, Chroothece, Chrysamoeba, Chrysapsis, Chrysidiastrum, Chrysocapsa, Chrysocapsella, Chrysochaete, Chrysochromulina, Chrysococcus, Chrysocrinus, Chrysolepidomonas, Chrysolykos, Chrysonebula, Chrysophyta, Chrysopyxis, Chrysosaccus, Chrysosphaerella, Chrysostephanosphaera, Clodophora, Cladidium, Closteriopsis, Closterium, Coccomyxa, Cocconeis, Coelastrella, Coelastrum, Coelosphaerium, Coenochloris, Coenococcus, Coenocystis, Colacium, Coleochaete, Collodictyon, Compsogonopsis, Compsopogon, Conjugatophyta, Conochaete, Coronastrum, Cosmarium, Cosmioneis, Cosmocladium, Crateriportula, Craticula, Crinalium, Crucigenia, Crucigeniella, Cryptoaulax, Cryptomonas, Cryptophyta, Ctenophora, Cyanodictyon, Cyanonephron, Cyanophora, Cyanophyta, Cyanothece, Cyanothomonas, Cyclonexis, Cyclostephanos, Cyclotella, Cylindrocapsa, Cylindrocystis, Cylindrospermum, Cylindrotheca, Cymatopleura, Cymbella, Cymbellonitzschia, Cystodinium, Dactylococciopsis, Debarya, Denticula, Dermatochrysis, Dermocarpa, Dermocarpella, Desmatractum, Desmidium, Desmococcus, Desmonema, Desmosiphon, Diacanthos, Diacronema, Diadesmis, Diatoma, Diatomella, Dicellula, Dichothrix, Dichotomococcus, Dicranochaete, Dictyochloris, Dictyococcus, Dictyosphaerium, Didymocystis, Didymogenes, Didymosphenia, Dilabifilum, Dimorphococcus, Dinobryon, Dinococcus, Diplochlorella, Diploneis, Diplostauron, Distrionella, Docidium, Draparnaldia, Dunaliella, Dysmorphococcus, Ecbalocystis, Elakatothrix, Ellerbeckia, Encyonema, Enteromorpha, Entocladia, Entomoneis, Entophysalis, Epichrysis, Epipyxis, Epithemia, Eremosphaera, Euastropsis, Euastrum, Eucapsis, Eucocconeis, Eudorina, Euglena, Euglenophyta, Eunotia, Eustigmatophyta, Eutreptia, Fallacia, Fischerella, Fragilaria, Fragilariforma, Franceia, Frustulia, Curcilla, Geminella, Genicularia, Glaucocystis, Glaucophyta, Glenodiniopsis, Glenodinium, Gloeocapsa, Gloeochaete, Gloeochrysis, Gloeococcus, Gloeocystis, Gloeodendron, Gloeomonas, Gloeoplax, Gloeotheca, Gloeotila, Gloeotrichia, Gloeodictyon, Gleiocystis, Golenkinia, Golenkiniopsis, Gomontia, Gomphocymbella, Gomphonema, Gomfosphaeria, Gonatozygon, Gongrosia, Gongrosira, Goniocloris, Gonium, Gonyostomum, Granulochloris, Granulocystopsis, Groenbladia, Grymnodinium, Gymnozyga, Gyrosigma, Haematococcus, Hafniomonas, Hallassia, Hammatoidea, Hannaea, Hantzschia, Hapalosiphon, Haplotaenium, Haptophyta, Haslea, Hemidinium, Hemitonia, Heribaudiella, Heteromastix, Heterothrix, Hibberdia, Hildenbrandia, Hillea, Holopedium, Homoeothrix, Hormanthonema, Hormotila, Hyalobranchion, Hyalocardium, Hyalodiscus, Hyalogonium, Hyalothece, Hydrianium, Hydrococcus, Hydrocoleum, Hydrocoryne, Hydrodictyon, Hydrosera, Hydrurus, Hyella, Hymenomonas, Isthmochloron, Johannesebaptistia, Juranyiella, Karayevia, Kathablepharis, Katodinium, Kephyrion, Keratococcus, Kirchneriella, Klebsormidium, Kolbesia, Koliella, Komarekia, Korshikoviella, Kraskella, Lagerheimia, Lagynion, Lamprothamnium, Lemanea, Lepocinclis, Leptosira, Lobococcus, Lobocystis, Lobomonas, Luticola, Lyngbya, Malleochloris, Mallomonas, Mantoniella, Marssoniella, Martyana, Mastigocoleus, Gastogloia, Melosira, Merismopedia, Mesostigma, Mesotaenium, Micractinium, Micrasterias, Microchaete, Microcoleus, Microcystis, Microglana, Micromonas, Microspora, Microthamnion, Mischococcus, Monochrysis, Monodus, Monomastix, Monoraphidium, Monostroma, Mougeotia, Mougeotiopsis, Myochloris, Myromecia, Myxosarcina, Naegeliella, Nannochloris, Nautococcus, Navicula, Neglectella, Neidium, Nephroclampus, Nephrocystium, Nephrodiella, Nephroselmis, Netricium, Nitella, Nitellopsis, Nitzschia, Nodularia, Nostoc, Ochromonas, Oedogonium, Oligochaetophora, Onychonema, Oocardium, Oocystis, Opephora, Ophiocytium, Orthoseira, Oscillatoria, Oxyneis, Pachycladella, Palmella, Palmodictyon, Pnadorina, Pannus, Paralia, Pascherina, Paulschulzia, Pediastrum, Pedinella, Pedinomonas, Pedinopera, Pelagodictyon, Penium, Peranema, Peridiniopsis, Peridinium, Peronia, Petroneis, Phacotus, Phacus, Phaeaster, Phaeodermatium, Phaeophyta, Phaeosphaera, Phaeothamnion, Phormidium, Phycopeltis, Phyllariochloris, Phyllocardium, Phyllomitax, Pinnularia, Pitophora, Placoneis, Planctonema, Planktosphaeria, Planothidium, Plectonema, Pleodorina, Pleurastrum, Pleurocapsa, Pleurocladia, Pleurodiscus, Pleurosigma, Pleurosira, Pleurotaenium, Pocillomonas, Podohedra, Polyblepharides, Polychaetophora, Polyedriella, Polyedriopsis, Polygoniochloris, Polyepidomonas, Polytaenia, Polytoma, Polytomella, Porphyridium, Posteriochromonas, Prasinocloris, Prasinocladus, Prasinophyta, Prasiola, Prochlorophyta, Prochlorothrix, Protoderma, Protosiphon, Provasoliella, Prymnesium, Psammodictyon, Psammothidium, Pseudanabaena, Pseudoclonium, Pseudocarteria, Pseudochate, Pseudocharacium, Pseudococcomyxa, Pseudodictyosphaerium, Pseudokephyrion, Pseudoncobyrsa, Pseudoquadrigula, Pseudosphaerocystis, Pseudostaurastrum, Pseudostaurisira, Pseudotetrastrum, Pteromonas, Punctastruata, Pyramichlamys, Pyramophyta, Pyramidochloris, Quadrichloris, Quadricoccus, Quadrigula, Radiococcus, Radioflum, Raphidiopsis, Raphidocelis, Raphidonema, Raphidophyta, Peimeria, Rhabdoderma, Rhabdomonas, Rhizoclonium, Rhodomonas, Rhodophyta, Rhoicosfenia, Rhopalodia,*

5 *Rivularia, Rosenvingiella, Rossithidium, Roya, Scenedesmus, Scherffelia, Schizochlamydella, Schizochlamys, Schizomeris, Schizothrix, Schroederia, Scolioneis, Scotiella, Scotiellopsis, Scourfieldia, Scytonema, Selenastrum, Selenochloris, Sellaphora, Semiorbis, Siderocelis, Diderocystopsis, Dimonsenia, Siphononema, Sirocladium, Sirogonium, Skeletonema, Sorastrum, Spermatozopsis, Sphaerelloctis, Sphaerellopsis, Sphaerodinium, Sphaeroplea, Sphaerozosma, Spiniferomonas, Spirogyra, Spirotaenia, Spirulina, Spondylomorom, Spondylosium, Sporotetras, Spumella, Staurastrum, Stauerodesmus, Stauroneis, Staurosira, Staurosirella, Stenopterobia, Stephanocostis, Stephanodiscus, Stephanoporus, Stephanosphaera, Stichococcus, Stichogloea, Stigeoclonium, Stigonema, Stipitococcus, Stokesiella, Strombomonas, Stylochrysalis, Stylodinium, Styloxis, Stylosphaeridium, Surirella, Sykidion, Symploca, Synechococcus, Synechocystis, Synedra, Synochromonas, Synura, Tabellaria, Tabularia, Teilingia, Temnogametum, Tetmemorus, Tetrachlorella, Tetracyclus, Tetrademus, Tetraedriella, Tetradron, Tetraselmis, Tetraspora, Tetrastrum, Thalassiosira, Thamniochaete, Thorakochloris, Thorea, Tolypella, Tolypothrix, Trachelomonas, Trachydiscus, Trebouxia, Trentepohlia, Treubaria, Tribonema, Trichodesmium, Trichodiscus, Trochiscia, Tryblionella, Ulothrix, Uroglena, Uronema, Urosolenia, Urospora, Uva, Vacuolaria, Vaucheria, Volvox, Volvulina, Westella, Woloszynskia, Xanthidium, Xanthophyta, Xenococcus, Zygnema, Zygnemopsis y Zygonium.*

10 Microorganismos a modo de ejemplo de los que puede derivarse la célula huésped incluyen, sin limitación, *Arabidopsis thaliana, Botryococcus braunii, Chlamydomonas reinhardtii, Dunaliella salina, Synechococcus Sp. PCC 7002, Synechococcus Sp. PCC 7942, Synechocystis Sp. PCC 6803, Thermosynechococcus elongatus BP-1, Chlorobium tepidum, Chloroflexus auranticus, Chromatium vinosum, Chromatium tepidum, Rhodospirillum rubrum, Rhodobacter capsulatus, Rhodopseudomonas palustris, Clostridium ljungdahlii, Clostridium thermocellum, Panicum virgatum, Penicillium chrysogenum, Pichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae, Yarrowia lipolytica, Schizosaccharomyces pombe, Pseudomonas fluorescens, Miscanthus giganteus, Zea mays o Zymomonas mobilis.*

15 Aún otros organismos adecuados de los que puede ser la célula huésped incluyen células sintéticas o células producidas mediante genomas sintéticos tal como se describe en la publicación de la patente estadounidense 2007/0264688 ó 2007/0269862.

20 La célula huésped puede ser una célula CHO, una célula COS, una célula VERO, una célula BHK, una célula HeLa, una célula Cv1, una célula MDCK, una célula 293, una célula 3T3 o una célula PC12.

25 La célula huésped puede ser una célula de *E. coli*. La célula de *E. coli* puede ser una célula de *E. coli* de cepa B, cepa C, cepa K o cepa W.

30 La célula huésped puede ser una célula huésped cianobacteriana.

Una célula huésped modificada por ingeniería genética descrita en el presente documento puede producir ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos a un título de aproximadamente 50 mg/l o más, aproximadamente 100 mg/l o más, aproximadamente 150 mg/l o más, aproximadamente 200 mg/l o más, aproximadamente 500 mg/l o más o aproximadamente 1000 mg/l o más.

35 La célula huésped puede sobreexpresar una secuencia de ácido nucleico que codifica para una éster sintasa o una variante descrita en el presente documento. Pueden aplicarse técnicas de alteración genómica para cambiar las características de una o más enzimas éster sintasa endógenas de manera que se sobreexpresen. El método puede incluir además transformar la célula huésped para sobreexpresar una secuencia de ácido nucleico que codifica para una éster sintasa heteróloga descrita en el presente documento.

40 Una tioesterasa endógena de la célula huésped, si está presente, puede no estar modificada. La célula huésped puede expresar un nivel atenuado de una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos tal como una acil-CoA sintasa o ambas. En un ejemplo, una tioesterasa, una acil-CoA sintasa o ambas, están delecionadas funcionalmente.

45 La célula huésped puede sobreproducir un sustrato descrito en el presente documento. Por ejemplo, la célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para sobreproducir un sustrato de alcohol o un sustrato de tioéster. La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para producir o sobreproducir un ácido graso libre, que puede convertirse en ésteres grasos usando los métodos descritos en el presente documento. El método puede incluir además modificar una o más enzimas éster sintasa endógenas de manera que la célula huésped sobreexpresa esas enzimas éster sintasa. El método puede incluir transformar la célula huésped con una secuencia de ácido nucleico que codifica para una éster sintasa, y la célula huésped produce un ácido graso y/o un derivado de ácido graso descrito en el presente documento.

50 El método puede incluir además cultivar la célula huésped en presencia de al menos un sustrato en el presente documento, que se expresa o sobreexpresa por la misma célula huésped. El sustrato puede ser un tioéster graso tal como, por ejemplo, una acil graso-ACP o una acil graso-CoA. El sustrato puede ser un alcohol o un ácido graso libre, tal como se describe en el presente documento.

55 El sustrato puede ser un alcohol. El sustrato de alcohol puede ser un alcohol exógeno que se introduce en la célula huésped. El sustrato de alcohol puede producirse por la célula huésped modificada por ingeniería genética. Por

- ejemplo, el sustrato de alcohol, tal como un sustrato de alcohol graso, puede producirse de manera adecuada por la célula huésped, que coexpresa o sobreexpresa uno o más genes de biosíntesis de aldehído graso y/o uno o más genes de biosíntesis de alcohol graso. El sustrato de alcohol tal como un sustrato de alcohol graso puede producirse por una célula huésped, que coexpresa o sobreexpresa uno o más genes de acil-ACP reductasa y/o uno o más genes de biosíntesis de alcohol graso. Métodos de producción de alcoholes grasos en una célula o microorganismo huésped recombinante se han descrito en, por ejemplo, la publicación de patente internacional n.º WO/2010/042664.
- El sustrato puede ser un ácido graso libre. El ácido graso libre puede ser un producto secundario no deseado, que puede convertirse por la célula huésped en un éster graso deseable usando los métodos descritos en el presente documento.
- Se proporciona un método de producción de un ácido graso o un derivado de ácido graso tal como, por ejemplo, un éster graso. El método incluye poner en contacto un sustrato con (i) una éster sintasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26, o una variante de la misma, o (ii) un polipéptido de éster sintasa codificado por una secuencia de polinucleótido que tiene al menos aproximadamente el 50% de identidad con la secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO: 27, 28, 29 o 30, o una variante de la misma. El método puede incluir además aislar y/o purificar el ácido graso y/o derivado de ácido graso.
- El polipéptido de éster sintasa puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26, con una o más sustituciones, adiciones, inserciones o deleciones de aminoácido, en la que el polipéptido tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. En determinadas realizaciones, el polipéptido de éster sintasa está modificado, en el que el polipéptido tiene una actividad éster sintasa y/o aciltransferasa mejorada.
- El polipéptido de éster sintasa puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26, con una o más sustituciones de aminoácido no conservadas, en la que el polipéptido tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. El polipéptido puede comprender una o más sustituciones de aminoácido conservadas. El polipéptido puede tener aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, o más sustituciones, adiciones, inserciones o deleciones de aminoácidos. El polipéptido puede tener actividad éster sintasa y/o aciltransferasa mejorada. Por ejemplo, el polipéptido puede, o tiene capacidad mejorada de, catalizar la conversión de tioésteres o ácidos grasos libres en ésteres grasos, usando alcoholes como sustratos.
- El polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, o al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26. El polipéptido puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26.
- En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótido tiene al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, o al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO: 27, 28, 29 ó 30. La secuencia de polinucleótido puede ser SEQ ID NO: 27, 28, 29 ó 30.
- Se proporciona un ácido graso libre producido mediante un método en el presente documento. El ácido graso libre puede comprender uno o más puntos de ramificación, uno o más puntos de insaturación y/o uno o más restos cíclicos.
- Se proporciona un derivado de ácido graso producido mediante un método en el presente documento. El derivado de ácido graso puede seleccionarse de un derivado de metilo de ácido graso, un derivado de etilo de ácido graso, otros derivados de ácidos grasos y una combinación de los mismos. La cadena de carbono del derivado de ácido graso puede comprender uno o más puntos de ramificación, uno o más puntos de insaturación y/o uno o más restos cíclicos.
- Se proporciona un éster graso producido mediante un método en el presente documento. El éster graso puede comprender un lado A (es decir, la cadena de carbono unida al oxígeno del carboxilato) y un lado B (es decir, la cadena de carbono que comprende el carboxilato original). El lado B del éster graso puede incluir una cadena lineal. El lado B del éster graso puede incluir una cadena ramificada. Las cadenas ramificadas pueden tener uno o más puntos de ramificación. El lado B del éster graso puede comprender al menos un resto cíclico.
- El éster de ácido graso puede ser un éster etílico de ácido graso o un éster metílico de ácido graso. El éster de ácido

graso puede tener al menos aproximadamente 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 ó 20 carbonos de longitud. Las cadenas de carbono que comprenden el lado A o el lado B pueden ser de cualquier longitud adecuada. El lado A del éster puede tener al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16 ó 18 carbonos de longitud. El lado B del éster tiene al menos aproximadamente 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ó 20 carbonos de longitud. En algunas realizaciones, el éster graso está saturado. El éster graso puede estar insaturado. El éster graso puede estar monoinsaturado. Si está insaturado, el lado A y/o el lado B pueden tener uno o más puntos de insaturación.

El lado B puede tener un doble enlace en uno o más puntos en la cadena de carbono. El lado B puede tener un doble enlace en la posición 7 de la cadena de carbono, numerando desde el extremo reducido de la cadena de carbono. Un experto habitual en la técnica reconocerá que, en un éster metílico graso, un extremo del lado B tendrá un grupo metilo, y el otro extremo del lado B tendrá un grupo carboxilo (C(=O)O-). El extremo del lado B que es un grupo metilo es el extremo reducido de la cadena de carbono que comprende el lado B, por tanto, el doble enlace está en el carbono 7 contando desde el extremo terminal del grupo metilo del grupo B (por ejemplo, entre los carbonos 7 y 8 del grupo B). El doble enlace puede tener cualquier geometría, por tanto, el doble enlace en el B grupo puede ser *cis* o *trans*. Por consiguiente, el éster graso comprende un doble enlace en la posición 7 en la cadena de carbono (entre C<sub>7</sub> y C<sub>8</sub>) desde el extremo reducido del éster graso.

El éster graso puede comprender uno o más puntos de ramificación. El éster graso puede ser lineal y no comprende ninguna cadena ramificada.

Se proporciona un microorganismo modificado por ingeniería genética que comprende una secuencia de control exógena incorporada de manera estable dentro del ADN genómico del microorganismo en el sentido de 5' de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 50% de identidad con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 27, 28, 29 ó 30, en el que el microorganismo produce un nivel aumentado de un ácido graso o derivado de ácido graso en relación con un microorganismo silvestre. El polinucleótido puede ser endógeno para el microorganismo. La secuencia de polinucleótido puede tener al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98% o al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO: 27, 28, 29 ó 30. La secuencia de polinucleótido puede ser SEQ ID NO: 27, 28, 29 ó 30.

El microorganismo puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel modificado de un gen que codifica para una éster sintasa. El microorganismo puede expresar un gen heterólogo que codifica para una éster sintasa o expresa un nivel aumentado de una éster sintasa endógena. Una tioesterasa endógena del microorganismo, si está presente, puede no estar modificada. El microorganismo puede expresar un nivel atenuado de un gen endógeno que codifica para una tioesterasa. Alternativamente, una tioesterasa endógena está delecionada funcionalmente. La tioesterasa puede codificarse por *tesA*, *tesA* sin secuencia líder, *tesB*, *fatB*, *fatB2*, *fatB3*, *fatA* o *fatA1*.

El microorganismo puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos con respecto a su nivel en un microorganismo silvestre. Las enzimas de degradación de ácidos grasos a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, enzimas acil-CoA sintasa de EC 2.3.1.86 o EC 6.2.1.3. El microorganismo puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una acil-CoA sintasa codificada por *fadD*, *fadK*, *BH3103*, *yhfL*, *pfl-4354*, *EAV15023*, *fadD1*, *fadD2*, *rpc\_4074*, *fadDD35*, *fadDD22*, *faa3p* o el gen que codifica para la proteína ZP\_01644857. La enzima de degradación de ácidos grasos mencionada anteriormente, tal como el gen de acil-CoA sintasa, puede delecionarse funcionalmente de manera que el microorganismo no comprende una actividad o funcionalidad acil-CoA sintasa.

El microorganismo puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel atenuado de una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos tal como una acil-CoA sintasa o ambas. Una tioesterasa endógena, una enzima de degradación de ácidos grasos, o ambas, pueden estar delecionadas funcionalmente. El microorganismo puede no tener actividad tioesterasa o acil-CoA sintasa detectable. El microorganismo puede poder producir ácidos grasos y/o derivados de los mismos.

El microorganismo puede modificarse por ingeniería genética para expresar, en relación con un microorganismo silvestre, un nivel disminuido de al menos uno de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa y un gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos. Uno o más de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, un gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa y un gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos pueden estar delecionados funcionalmente. El gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa puede ser *fadE*. El gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa puede ser uno que codifica para un receptor para ferricromo, colicina M, fago T1, fago T5 o fago phi80. El gen que codifica para un receptor de proteína de membrana externa puede ser *thuA*

(también conocido como *tonA*). Aún en otras realizaciones, el gen que codifica para un regulador de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos puede ser *fabR*.

El microorganismo puede ser una bacteria. La bacteria puede ser una bacteria Gram-negativa o una Gram-positiva.

5 El microorganismo puede ser una micobacteria seleccionada del grupo que consiste en *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium marinum* y *Mycobacterium ulcerans*. En otras realizaciones, la bacteria es *Nocardia* sp. NRRL 5646, *Nocardia farcinica*, *Streptomyces griseus*, *Salinispora arenicola* o *Clavibacter michiganensis*.

10 El microorganismo puede seleccionarse del grupo que consiste en *Acinetobacter Alcanivorax*, *Alcaligenes*, *Arabidopsis*, *Fundibacter*, *Marinobacter*, *Mus musculus*, *Pseudomonas* o *Simmondsia*.

15 El microorganismo puede seleccionarse del grupo que consiste en algas, cianobacterias, bacterias verdes del azufre (incluyendo, por ejemplo, *Chlorobium*, *Clathrochloris*, *Prosthecochloris*), bacterias verdes no del azufre (incluyendo, por ejemplo, *Chloroflexus*, *Chloronema*, *Oscillochloris*, *Heliobacterium*, *Herpetosiphon*, *Roseiflexus* y *Termomicrobium*), bacterias púrpuras del azufre (incluyendo, por ejemplo, *Allochrochromatium*, *Chromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Rhodovulum*, *Thermochromatium*, *Thiocapsa*, *Thiorhodococcus* y *Thiocystis*), bacterias púrpuras no del azufre (incluyendo, por ejemplo, *Phaeospirillum*, *Rhodobac*, *Rhodobacter*, *Rhodomicrobium*, *Rhodospira*, *Rhodospseudomonas*, *Rhodothalassium*, *Rhodovibrio*, *Roseospira*) o extremófilos.

20 El microorganismo puede seleccionarse del grupo que consiste en: *Arabidopsis thaliana*, *Botryococcus braunii*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Synechococcus* Sp. PCC 7002, *Synechococcus* Sp. PCC 7942, *Synechocystis* Sp. PCC 6803, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Chlorobium tepidum*, *Chloroflexus auranticus*, *Chromatium vinosum*, *Chromatium tepidum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodospseudomonas palustris*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium thermocellum*, *Panicum virgatum*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pseudomonas fluorescens*, *Miscanthus giganteus*, *Zea mays* o *Zymomonas mobilis*.

25 El microorganismo puede ser una levadura oleaginosa, por ejemplo, una *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* o *Lipomyces*. El microorganismo puede ser un *Rhodospiridium toruloide*, *Lipomyces starkeyii*, *L. Lipoferus*, *Candida revkaufi*, *C. pulcherrima*, *C. Tropicalis*, *C. utilis*, *Trichosporon pullas*, *T. cutaneum*, *Rhodotorula glutinous*, *R. Garminis* y *Yarrowia lipolytica* (clasificada anteriormente como *Candida lipolytica*). El microorganismo puede ser *Yarrowia lipolytica* cepa ATCC n.º 20362, ATCC n.º 8862, ATCC n.º 18944, ATCC n.º 76982 y/o LGAM S(7)1 (Papanikolaou S., y Aggelis G., Bioresour. Technol., 82(1):43-9, 2002).

30 Se proporciona un ácido graso o derivado de ácido graso producido mediante cualquiera de los métodos o cualquiera de los microorganismos descritos en el presente documento, o una composición que comprende un ácido graso o derivado del mismo producido mediante cualquiera de los métodos o cualquiera de los microorganismos descritos en el presente documento.

35 El ácido graso o derivado de ácido graso puede tener un  $\delta^{13}\text{C}$  de aproximadamente -15,4 o mayor. El ácido graso o derivado de ácido graso puede tener un  $\delta^{13}\text{C}$  de aproximadamente -15,4 a aproximadamente -10,9, o de aproximadamente -13,92 a aproximadamente -13,84.

40 El ácido graso o derivado de ácido graso puede tener una  $f_M^{14}\text{C}$  de al menos aproximadamente 1,003. El ácido graso o derivado de ácido graso puede tener una  $f_M^{14}\text{C}$  de al menos aproximadamente 1,01 o al menos aproximadamente 1,5. El ácido graso o derivado de ácido graso puede tener una  $f_M^{14}\text{C}$  de aproximadamente 1,111 a aproximadamente 1,124.

Se proporciona una composición de biocombustible que comprende los ácidos grasos o derivados de ácidos grasos producidos mediante cualquiera de los métodos o mediante cualquiera de los microorganismos descritos en el presente documento.

45 En cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento, se produce un ácido graso o derivado de ácido graso en una célula huésped o un microorganismo descrito en el presente documento a partir de una fuente de carbono, incluyendo, por ejemplo, un alcohol, un ácido graso libre o un tioéster.

50 En cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento, los sustratos de fuentes de carbono pueden ser, por ejemplo, sustratos de alcohol, sustratos de tioéster y ácidos grasos libres. Los sustratos de alcohol adecuados incluyen alcoholes de cadena corta tales como metanol, etanol, propanol (isopropanol), butanol, pentanol, hexanol, heptanol, y similares, así como diversos alcoholes de cadena larga tales como alcoholes grasos, por ejemplo, octanol, tetradecanol, hexadecanol, hexadecenol, octadecenol, y otros. Además, la invención se refiere a convertir metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, y/u otros sustratos de alcohol en derivados de ácidos grasos, tales como, por ejemplo, ésteres grasos, usando el huésped de producción modificado por ingeniería genética. Puede convertirse etanol mediante un huésped de producción modificado por ingeniería genética adecuadamente. Preferiblemente, se producen uno o más ésteres etílicos de ácidos grasos y/o ácidos grasos libres.

5 Puede convertirse metanol mediante un huésped de producción modificado por ingeniería genética adecuadamente. Preferiblemente, se producen uno o más ésteres metílicos de ácidos grasos y/o ácidos grasos libres. Puede convertirse butanol mediante un huésped de producción modificado por ingeniería genética adecuadamente. Puede convertirse una mezcla de etanol, metanol y/u otros sustratos de alcohol adecuados en una mezcla de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos cultivando uno o más de los huéspedes de producción modificados por ingeniería genética según los métodos en el presente documento en condiciones que permiten la producción de tales ácidos grasos libres y/o derivados de ácidos grasos. Por ejemplo, se producen uno o más ácidos grasos libres, uno o más ésteres etílicos de ácidos grasos y/o uno o más ésteres metílicos de ácidos grasos.

10 En cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento, sustratos de fuente de carbono adecuados pueden ser ácidos grasos libres y tioésteres. Por ejemplo, el ácido graso libre puede comprender una cadena de carbono ramificada. Alternativamente, el ácido graso libre puede comprender una cadena de carbono lineal. El ácido graso libre puede comprender un grupo cíclico, o uno o más puntos de insaturación. El sustrato de tioéster es una acil graso-CoA o acil graso-ACP. Aún en otro aspecto, la invención presenta un método de producción de ésteres grasos a partir de los ácidos grasos libres en la corriente de desechos de un procedimiento de producción de ésteres grasos convencional.

15 En cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento, el polipéptido de éster sintasa puede tener de aproximadamente 200 aminoácidos a aproximadamente 2.000 aminoácidos de longitud, por ejemplo, desde aproximadamente 250 hasta aproximadamente 1.500 residuos de aminoácido de longitud, desde aproximadamente 300 hasta aproximadamente 1.200 residuos de aminoácido de longitud, desde aproximadamente 350 hasta aproximadamente 1.000 residuos de aminoácido de longitud, desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 800 residuos de aminoácido de longitud o desde aproximadamente 450 hasta aproximadamente 600 residuos de aminoácido de longitud. El polipéptido de éster sintasa puede tener aproximadamente 300 residuos de aminoácido de longitud o más, por ejemplo, aproximadamente 400 residuos de aminoácido de longitud o más, o aproximadamente 450 residuos de aminoácido de longitud o más. El polipéptido de éster sintasa tiene aproximadamente 1.000 residuos de aminoácido de longitud o menos, por ejemplo, aproximadamente 800 residuos de aminoácido de longitud o menos, aproximadamente 700 residuos de aminoácido de longitud o menos o aproximadamente 600 residuos de aminoácido de longitud o menos. Una éster sintasa a modo de ejemplo tiene aproximadamente 500 residuos de aminoácido de longitud.

20 Los dibujos y ejemplos proporcionados en el presente documento únicamente pretenden ilustrar las características de la presente invención. No pretenden ser limitativos.

### 30 Breve descripción de los dibujos

La figura 1A es un diagrama que ilustra una ruta de biosíntesis típica conocida en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO2007/136762, cuya divulgación se incorpora como referencia en el presente documento), que produce ácido graso y/o derivados de ácidos grasos dependiendo de los sustratos proporcionados. La figura 1B es un diagrama que ejemplifica una ruta alternativa y más eficaz de la presente invención.

La figura 2 representa la secuencia del promotor del operón de la proteína ribosómica *spc* de *E. coli*, *Pspc* (SEQ ID NO: 13).

La figura 3 representa un plásmido de expresión plásmido bacteriano, pDS33.ES9 (SEQ ID NO: 22), en el que la expresión de un gen de éster sintasa de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798 (n.º de registro de GenBank ABO21021) está bajo el control del promotor del operón de la proteína ribosómica *spc* de *E. coli*, *Pspc* (SEQ ID NO: 13).

La figura 4 representa un plásmido de expresión bacteriano, pDS57 (SEQ ID NO: 23), en el que la expresión de un gen de éster sintasa está bajo el control de un promotor *Trc*.

45 La figura 5 representa la cantidad de ácido graso libre (FFA) y éter etílico de acilo graso (FAEE) producidos por cada cultivo según el ejemplo 6, sin coexpresión de una acil-CoA sintasa o una tioesterasa, en presencia y ausencia de etanol en placas de micropocillos. ES9 generó casi 200 mg/l de FAEE en presencia de etanol, pero sólo una pequeña cantidad (<20%) de FFA. Las otras éster sintasas, incluyendo ES8, *atfA1* y *atfA2*, produjeron cantidades sustancialmente inferiores de FAEE en presencia de etanol, acompañadas por una proporción superior de FFA. El *tesA* de *E. coli* en cultivo produjo títulos globales superiores de FFA y FAEE en presencia de etanol, pero la cantidad de FFA fue significativamente mayor que la cantidad de FAEE generada.

50 La figura 6 representa la producción de FFA y/o FAEE según el ejemplo 7, sin coexpresión de acil-CoA sintasa o una tioesterasa, pero en presencia de etanol en frascos de agitación. Las éster sintasas ES9, ES8, *atfA1* y *atfA2* podían producir todas FAEE *in vivo* en las condiciones prescritas. ES9 generó un alto nivel de FAEE en presencia de etanol, pero sólo se produjo poco FFA. En comparación con ES9, se produjeron cantidades notablemente más pequeñas de FAEE por *atfA1*, *atfA2* y ES8. De manera consecuente con los resultados del ejemplo 6 y la figura 5, la expresión de *tesA* de *E. coli* solo produjo títulos globales altos de FFA y FAEE, pero con una proporción significativamente superior de FFA.

- 5 La figura 7 representa la producción de FFA y/o FAME según el ejemplo 8, sin coexpresión de acil-CoA sintasa o una tioesterasa, pero en presencia de metanol en frascos de agitación. La cantidad de FFA producida estuvo por debajo del límite de detección. También se observaron niveles inferiores de títulos globales, en comparación con los obtenidos en presencia de etanol, en cultivos que expresaban atfA1, atfA2, ES8 y ES9. Sin embargo, ES9 produjo una cantidad sustancial de FAME.
- La figura 8 representa un transcurso de tiempo tras la inducción de la producción de ésteres grasos por *E. coli* MG1655 DV2  $\Delta$ *fadD* que expresa ES9, sin coexpresión de una acil-CoA sintasa o una tioesterasa.
- La figura 9 representa las puntuaciones z de la producción de ácidos grasos/ésteres grasos por las cepas de la biblioteca de mutagénesis de la posición 395 de ES9, tal como se describe en el ejemplo 11.
- 10 La figura 10A representa la producción *in vivo* de ácidos grasos libres y/o ésteres grasos por la *E. coli* DV2  $\Delta$  *fadD* que expresa ES9, y los mutantes de ES9 G395R, G395K, G395S, G395D y G395E. La figura 10B representa la DO600 obtenida a partir de las cepas durante la fermentación.
- La figura 11 representa los títulos de producción de éster metílico de ácidos grasos por ES1, ES2, ES3 y ES4, los homólogos de ES9, según los ejemplos 12-13, que convertían acil-ACP y metanol en ésteres metílicos.
- 15 La figura 12 representa los títulos de producción de éster etílico de ácidos grasos por ES1, ES2, ES3 y ES4, los homólogos de ES9, según los ejemplos 12-13, que convertían acil-ACP y etanol en ésteres etílicos.
- La figura 13 es un perfil de CG/EM tras la producción de éster a partir de la cepa *F. jadensis* T9 alimentada con palmitato de sodio y alcoholes de cadena corta. El panel superior es un control sin alimentación con alcohol. El panel del medio representa los productos preparados como resultado de la alimentación con etanol. El panel inferior representa los productos preparados como resultado de la alimentación con isopropanol.
- 20 La figura 14 compara los perfiles de crecimiento celular de los procesos de producción de ésteres grasos que implican cepas huésped recombinantes con o sin un *fadE* atenuado/deleciónado, tal como se describe en el ejemplo 18. En este ejemplo, se usaron acil-ACP y etanol como sustratos.
- 25 La figura 15 compara la producción de ésteres grasos totales usando cepas huésped recombinantes con o sin un *fadE* atenuado/deleciónado, tal como se describe en el ejemplo 18. En este ejemplo, se usaron acil-ACP y etanol como sustratos.
- La figura 16 representa diversas secuencias de aminoácidos y polinucleótido de éster sintasa y homólogas. Esta lista también incluye diversas secuencias de polinucleótido con codones optimizados que codifican para los cuatro homólogos ES1, ES2, ES3 y ES4.
- 30 La figura 17 representa otras secuencias de enzimas que pueden usarse en relación con la presente invención.
- La figura 18 representa las características de un vector pFBAIN-MOD-1, que es útil para llevar a cabo los métodos descritos en el ejemplo 20.

#### Descripción detallada de la invención

- 35 A menos que se defina 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 invención. 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 invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos sólo son ilustrativos y no pretenden ser limitativos.
- 40 Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

#### Definiciones

- 45 Los artículos “un” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.
- Tal como se usa en el presente documento, un “gen de biosíntesis de aldehídos” o un “polinucleótido de biosíntesis de aldehídos” es un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de biosíntesis de aldehídos.
- 50 Tal como se usa en el presente documento, un “polipéptido de biosíntesis de aldehídos” es un polipéptido que forma parte de la ruta de biosíntesis de un aldehído. Tales polipéptidos pueden actuar sobre un sustrato biológico para producir un aldehído. En algunos casos, el polipéptido de biosíntesis de aldehídos tiene actividad reductasa.

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

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “biocrudo” se refiere a un producto derivado de biomasa, derivados de biomasa u otras fuentes biológicas que, como el crudo de petróleo, pueden convertirse en otros combustibles. Por ejemplo, el biocrudo puede convertirse en gasolina, diésel, combustible para motores a reacción o gasóleo de calefacción. Además, el biocrudo, como el crudo de petróleo, puede convertirse en otros productos químicos útiles industrialmente para su uso, por ejemplo, en productos farmacéuticos, cosméticos, bienes de consumo, procesos industriales, y similares.

10 El biocrudo puede incluir, por ejemplo, hidrocarburos, productos de hidrocarburos, ésteres de ácidos grasos y/o cetonas alifáticas. En una realización preferida, el biocrudo está compuesto por hidrocarburos, por ejemplo hidrocarburos alifáticos (por ejemplo, alcanos, alquenos, alquinos) o hidrocarburos aromáticos.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “biodiésel” significa un biocombustible que puede ser un sustituto de diésel, que se deriva de petróleo. Puede usarse biodiésel en motores diésel de combustión interna o bien en forma pura, que se denomina biodiésel “no mezclado”, o bien como mezcla en cualquier concentración con diésel a base de petróleo. En una realización, biodiésel puede incluir ésteres o hidrocarburos, tales como aldehídos y alcanos o alquenos.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “biocombustible” se refiere a cualquier combustible derivado a partir de biomasa, derivados de biomasa u otras fuentes biológicas. Los combustibles a base de petróleo pueden sustituirse por biocombustibles. Por ejemplo, los biocombustibles incluyen combustibles de transporte (por ejemplo, gasolina, diésel, combustible para motores a reacción, etc.), combustibles para calefacción y combustibles para la generación de electricidad. Los biocombustibles son una fuente de energía renovable.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “biomasa” se refiere a una fuente de carbono derivada de material biológico. La biomasa puede convertirse en un biocombustible. Una fuente de biomasa a modo de ejemplo es materia vegetal. Por ejemplo puede usarse maíz, caña de azúcar o césped como biomasa. Otro ejemplo no limitativo de biomasa es materia animal, por ejemplo estiércol de vaca. La biomasa también incluye productos de desecho procedentes de la industria, agricultura, silvicultura y desechos domésticos. Ejemplos de tales productos de desecho que pueden usarse como biomasa son desechos de fermentación, paja, madera, aguas residuales, basura y restos de comida. La biomasa también incluye fuentes de carbono, tales como hidratos de carbono (por ejemplo, monosacáridos, disacáridos o polisacáridos).

30 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “fuente de carbono” se refiere a un sustrato o compuesto adecuado para usarse como fuente de carbono para el crecimiento de células procariontas o eucariotas simples. Las fuentes de carbono pueden estar en diversas formas, incluyendo, pero sin limitarse a polímeros, hidratos de carbono, ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, aminoácidos, péptidos y gases (por ejemplo, CO y CO<sub>2</sub>). Estas incluyen, por ejemplo, diversos monosacáridos, tales como glucosa, fructosa, manosa y galactosa; oligosacáridos, tales como fructo-oligosacárido y galacto-oligosacárido; polisacáridos tales como xilosa y arabinosa; disacáridos, tales como sacarosa, maltosa y turanosa; material celulósico, tal como metilcelulosa y carboximetilcelulosa de sodio; ésteres de ácidos grasos saturados o insaturados, tales como succinato, lactato y acetato; alcoholes, tales como metanol, etanol, propanol o mezclas de los mismos. La fuente de carbono también puede ser un producto de fotosíntesis, incluyendo, pero sin limitarse a, glucosa. Una fuente de carbono preferida es biomasa. Otra fuente de carbono preferida es glucosa.

Tal como se usa en el presente documento, un “aditivo que reduce el punto de turbidez” es un aditivo añadido a una composición para disminuir o reducir el punto de turbidez de una disolución.

45 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “punto de turbidez de un fluido” significa la temperatura a la que los sólidos disueltos ya no son completamente solubles. Por debajo de esta temperatura, los sólidos empiezan a precipitar como una segunda fase dando al fluido una apariencia turbia. En la industria petrolera, el punto de turbidez se refiere a la temperatura por debajo de la cual un material solidificado u otro hidrocarburo pesado cristaliza para dar un aceite crudo, aceite refinado o combustible para formar una apariencia turbia. La presencia de materiales solidificados influye en el comportamiento de flujo del fluido, la tendencia del fluido a obstruir los filtros de combustible, inyectores, etc., la acumulación de materiales solidificados sobre superficies frías (por ejemplo, incrustación de una tubería o un intercambiador de calor) y las características de emulsión del fluido con agua.

50 Una secuencia de nucleótidos es “complementaria” a otra secuencia de nucleótidos si cada una de las bases de las dos secuencias se aparean (es decir, puede formar pares de bases de Watson Crick). El término “hebra complementaria” se usa en el presente documento de manera intercambiable con el término “complemento”. El complemento de una hebra de ácido nucleico puede ser el complemento de una hebra codificante o el complemento de una hebra no codificante.

55 Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” deben interpretarse como términos abiertos (por ejemplo, que significan “incluyendo, pero sin limitarse a”,) a menos que se indique lo contrario.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “condiciones suficientes para permitir la expresión” significa cualquier condición que permite a una célula huésped o huésped de producción producir un producto deseado, tal como un polipéptido, acil-CoA, derivado de ácido graso (por ejemplo, ácidos grasos, hidrocarburos, alcoholes grasos, ésteres grasos, etc.) u otro producto descrito en el presente documento. Las condiciones adecuadas incluyen, por ejemplo, condiciones de fermentación. Las condiciones de fermentación pueden comprender muchos parámetros, tales como intervalos de temperatura, niveles de aireación y composición de medios. Cada una de estas condiciones, individualmente y en combinación, permite que la célula huésped crezca.

10 Los medios de cultivo a modo de ejemplo incluyen caldos o geles. Generalmente, el medio incluye una fuente de carbono, tal como glucosa, fructosa, celulosa, o similares, que pueden metabolizarse por una célula huésped directamente. Además, pueden usarse enzimas en el medio para facilitar la movilización (por ejemplo, la despolimerización de almidón o celulosa para dar azúcares fermentables) y el posterior metabolismo de la fuente de carbono.

15 Para determinar si las condiciones son suficientes para permitir la expresión, puede cultivarse una célula huésped, por ejemplo, durante aproximadamente 4, 8, 12, 24, 36 ó 48 horas. Durante y/o tras el cultivo, pueden obtenerse muestras y analizarse para determinar si las condiciones permiten la expresión. Por ejemplo, las células huésped en la muestra o el medio en el que se hacen crecer las células huésped pueden someterse a prueba para determinar la presencia de un producto deseado. Cuando se someten a prueba para determinar la presencia de un producto, pueden usarse ensayos tales como, pero sin limitarse a, CCF, HPLC, CG/FID, CG/EM, CL/EM, EM.

20 Tal como se usa en el presente documento, “condiciones que permiten la producción de producto” se refiere a cualquier condición de fermentación que permite a un huésped de producción producir un producto deseado, tal como acil-CoA o derivados de ácidos grasos (por ejemplo, ácidos grasos, hidrocarburos, alcoholes grasos, ceras o ésteres grasos). Las condiciones de fermentación comprenden habitualmente muchos parámetros. Las condiciones a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, intervalos de temperatura, niveles de aireación y composición de medios. Cada una de estas condiciones, individualmente y/o en combinación, permite que el huésped de producción crezca.

25 Los medios a modo de ejemplo incluyen caldos y/o geles. Generalmente, un medio adecuado incluye una fuente de carbono (por ejemplo, glucosa, fructosa, celulosa, etc.) que puede metabolizarse por el microorganismo directamente. Además, pueden usarse enzimas en el medio para facilitar la movilización (por ejemplo, la despolimerización de almidón o celulosa para dar azúcares fermentables) y el posterior metabolismo de la fuente de carbono.

30 Para determinar si las condiciones de fermentación permiten la producción de producto, el huésped de producción puede cultivarse durante aproximadamente 4, 8, 12, 24, 36 ó 48 horas. Durante el cultivo o tras el cultivo, pueden obtenerse muestras y analizarse para determinar si las condiciones de fermentación han permitido la producción de producto. Por ejemplo, pueden someterse a prueba los huéspedes de producción en la muestra o el medio en el que se hacen crecer los huéspedes de producción para detectar la presencia del producto deseado. Pueden usarse ensayos a modo de ejemplo, tales como CCF, HPLC, CG/FID, CG/EM, CL/EM, EM, así como los proporcionados en el presente documento, para identificar y cuantificar la presencia de un producto.

35 Tal como se usa en el presente documento, “sustitución de aminoácido conservativa” significa que un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido las familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

40 Se entiende que los polipéptidos descritos en el presente documento pueden tener sustituciones de aminoácidos conservativas o no esenciales adicionales, que no tienen un efecto sustancial sobre las funciones del polipéptido. Puede determinarse si se tolerará o no una sustitución particular (por ejemplo, no afectará de manera adversa a las propiedades biológicas deseadas, tales como actividad descarboxilasa) tal como se describe en Bowie *et al.*, Science 247:1306 1310 (1990).

45 Tal como se usa en el presente documento, “elemento de control” significa un elemento de control de la transcripción. Los elementos de control incluyen promotores y potenciadores. El término “elemento promotor”, “promotor” o “secuencia promotora” se refiere a una secuencia de ADN que funciona como interruptor que activa la expresión de un gen. Si se activa el gen, se dice que se transcribe o que participa en la transcripción. La transcripción implica la síntesis de ARNm a partir del gen. Por tanto, un promotor sirve como elemento regulador de la transcripción y también proporciona un sitio para el inicio de la transcripción del gen para dar ARNm. Los elementos de control interactúan específicamente con proteínas celulares implicadas en la transcripción (Maniatis *et al.*, Science 236:1237, 1987).

- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término “deleción funcional” o “desactivación” significa modificar o inactivar una secuencia de polinucleótido que codifica para una proteína diana con el fin de reducir o eliminar la función de la proteína diana. Puede realizarse una deleción de polinucleótido mediante métodos bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo Datsenko *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 97:6640-45 (2000) o las solicitudes de patente internacional n.<sup>os</sup> PCT/US2007/011923 y PCT/US2008/058788).
- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término “endógeno” significa un polinucleótido que está en la célula y no se introdujo en la célula usando técnicas de modificación por ingeniería genética recombinantes. Por ejemplo, un gen que estaba presente en la célula cuando la célula se aisló originalmente de la naturaleza. Un polinucleótido se considera todavía endógeno si las secuencias de control, tales como un promotor o secuencias potenciadoras que activan la transcripción o traducción, se han alterado a través de técnicas recombinantes.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, el término “éster sintasa” significa un péptido que puede producir ésteres grasos. Más específicamente, una éster sintasa es un péptido que convierte un tioéster en un éster graso. La éster sintasa puede convertir un tioéster (por ejemplo, acil-CoA) en un éster graso.
- Una éster sintasa puede usar un tioéster y un alcohol como sustratos para producir un éster graso. Las éster sintasas pueden usar tioésteres de cadena corta y larga como sustratos. Además, las éster sintasas pueden usar alcoholes de cadena corta y larga como sustratos.
- 20 Ejemplos no limitativos de éster sintasas son cera sintasas, éster de cera sintasas, acil CoA:alcohol transacilasas, aciltransferasas y acil graso-coenzima A:alcohol graso aciltransferasas. Éster sintasas a modo de ejemplo se clasifican en el número de clasificación de enzimas EC 2.3.1.75. Varias de estas enzimas, así como otras enzimas útiles para preparar los productos descritos en el presente documento, se han dado a conocer, por ejemplo, en las solicitudes de patente internacional n.<sup>os</sup> PCT/US2007/011923 y PCT/US2008/058788.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término “exógeno” significa un polinucleótido que no se origina a partir de una célula particular tal como se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, “polinucleótido exógeno” podría referirse a un polinucleótido que se insertó dentro de la secuencia de polinucleótido genómica de un microorganismo o a un polinucleótido extracromosómico que se introdujo en el microorganismo. Por tanto, se considera que un polinucleótido que no se produce de manera natural es exógeno para una célula una vez que se introduce en la célula. Un polinucleótido que se produce de manera natural también puede ser exógeno para una célula particular. Por ejemplo, un polinucleótido completo aislado de una primera célula puede ser un polinucleótido exógeno con respecto a una segunda célula si se introduce ese polinucleótido a partir de la primera célula en la segunda célula.
- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido graso” significa un ácido carboxílico que tiene la fórmula RCOOH. R representa un grupo alifático, preferiblemente un grupo alquilo. R puede comprender entre aproximadamente 4 y aproximadamente 22 átomos de carbono. Los ácidos grasos pueden estar saturados, monoinsaturados o poliinsaturados. El ácido graso puede prepararse a partir de una ruta de biosíntesis de ácidos grasos.
- 35 Tal como se usa en el presente documento, el término “ruta de biosíntesis de ácidos grasos” significa una ruta de biosíntesis que produce ácidos grasos. La ruta de biosíntesis de ácidos grasos incluye enzimas de ácido graso que pueden modificarse por ingeniería genética, tal como se describe en el presente documento, para producir ácidos grasos, y pueden expresarse con enzimas adicionales para producir ácidos grasos que tienen características de la cadena de carbono deseadas.
- 40 Tal como se usa en el presente documento, el término “enzima de degradación de ácidos grasos” significa una enzima implicada en la descomposición o conversión de un ácido graso o derivado de ácido graso en otro producto. Un ejemplo no limitativo de una enzima de degradación de ácidos grasos es una acil-CoA sintasa. Varias de estas enzimas, así como otras enzimas útiles para preparar los productos descritos en el presente documento, se han dado a conocer, por ejemplo, en las solicitudes de patente internacional n.<sup>os</sup> PCT/US2007/011923 y PCT/US2008/058788. En el presente documento se describen ejemplos adicionales de enzimas de degradación de ácidos grasos.
- 45 Tal como se usa en el presente documento, el término “derivado de ácido graso” significa productos preparados en parte a partir de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos del microorganismo huésped de producción. “Derivado de ácido graso” también incluye productos preparados en parte a partir de acil-ACP o derivados de acil-ACP. 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, ácidos grasos, acil-CoA, aldehídos grasos, alcoholes de cadena corta y larga, hidrocarburos, alcoholes grasos, cetonas y ésteres (por ejemplo, ceras, ésteres de ácidos grasos o ésteres grasos).
- 50 Tal como se usa en el presente documento, el término “enzimas de derivado de ácido graso” significa todas las enzimas que pueden expresarse o sobreexpresarse en la producción de derivados de ácidos grasos. Estas enzimas se denominan colectivamente en el presente documento enzimas de derivado de ácido graso. Estas enzimas
- 55

- 5 pueden ser parte de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. Los ejemplos no limitativos de enzimas de derivado de ácido graso incluyen ácido graso sintasas, tioesterasas, acil-CoA sintasas, acil-CoA reductasas, alcohol deshidrogenasas, alcohol aciltransferasas, ácido carboxílico reductasas, acil-CoA reductasa que forma alcohol graso, éster sintasas, polipéptidos de biosíntesis de aldehídos y polipéptidos de biosíntesis de alcanos. Las enzimas de derivado de ácido graso convierten un sustrato en un derivado de ácido graso. En algunos ejemplos, el sustrato puede ser un derivado de ácido graso que la enzima de derivado de ácido graso convierte en un derivado de ácido graso diferente. Varias de estas enzimas, así como otras enzimas útiles para preparar los productos descritos en el presente documento, se han dado a conocer, por ejemplo, en las solicitudes de patente internacional n.<sup>os</sup> PCT/US2007/011923 y PCT/US2008/058788.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, “enzima de ácido graso” significa cualquier enzima implicada en la biosíntesis de ácidos grasos. Pueden expresarse o sobreexpresarse enzimas de ácido graso en células huésped para producir ácidos grasos. Los ejemplos no limitativos de enzimas de ácido graso incluyen ácido graso sintasas y tioesterasas. Varias de estas enzimas, así como otras enzimas útiles para preparar los productos descritos en el presente documento, se han dado a conocer, por ejemplo, en las solicitudes de patente internacional n.<sup>os</sup> PCT/US2007/011923 y PCT/US2008/058788.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, el término “alcohol graso” significa un alcohol que tiene la fórmula ROH. En una realización preferida, el alcohol graso es cualquier alcohol preparado a partir de un ácido graso o derivado de ácido graso.
- 20 El grupo R puede tener al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 carbonos de longitud. R puede ser de cadena lineal o ramificada. Las cadenas ramificadas pueden tener uno o más puntos de ramificación. Además, las cadenas ramificadas pueden incluir ramificaciones cíclicas. Además, R puede estar saturado o insaturado. Si está insaturado, R puede tener uno o más puntos de insaturación.
- 25 El alcohol graso puede producirse de manera biosintética. Los alcoholes grasos tienen muchos usos. Por ejemplo, pueden usarse alcoholes grasos para producir muchos productos químicos especializados. Por ejemplo, se usan alcoholes grasos como biocombustible; como disolventes para grasas, ceras, gomas y resinas; en pomadas, emolientes y lociones farmacéuticas; como aditivos de aceite de lubricación; en detergentes y emulsionantes; como agentes de acabado y antiestáticos de materiales textiles; como plastificantes; como tensioactivos no iónicos; y en cosméticos, por ejemplo como espesantes.
- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término “éster graso” significa un éster. Un éster graso es cualquier éster compuesto por un ácido graso para producir, por ejemplo un éster de ácido graso. Un éster graso puede contener un lado A (es decir, la cadena de carbono unida al oxígeno del carboxilato) y un lado B (es decir, la cadena de carbono que comprende el carboxilato original). Cuando el éster graso se deriva de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos, al lado A puede contribuir un alcohol, y al lado B contribuye un ácido graso. Puede usarse cualquier alcohol para formar el lado A de los ésteres grasos. Por ejemplo, el alcohol puede derivarse de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. Alternativamente, el alcohol puede producirse a través de rutas de biosíntesis que no son de ácidos grasos. Además, el alcohol puede proporcionarse de manera exógena. Por ejemplo, el alcohol puede suministrarse en el caldo de fermentación en casos en los que el éster graso se produce por un microorganismo que también produce el ácido graso. Alternativamente, puede suministrarse de manera exógena un ácido carboxílico, tal como un ácido graso o ácido acético, en casos en los que el éster graso se produce por un microorganismo que también puede producir alcohol.
- 35 40 Las cadenas de carbono que comprenden el lado A o el lado B pueden ser de cualquier longitud. En una realización, el lado A del éster tiene al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16 ó 18 carbonos de longitud. El lado B del éster tiene al menos aproximadamente 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ó 26 carbonos de longitud. El lado A y/o el lado B pueden ser de cadena lineal o ramificada. Las cadenas ramificadas pueden tener uno o más puntos de ramificación. Además, las cadenas ramificadas pueden incluir ramificaciones cíclicas. Además, el lado A y/o el lado B puede estar saturado o insaturado. Si está insaturado, el lado A y/o el lado B puede tener uno o más puntos de insaturación.
- 45 El éster graso puede producirse de manera biosintética. En primer lugar el ácido graso se “activa”. Ejemplos no limitativos de ácidos grasos “activados” son acil-CoA, acil-ACP y fosfato de acilo. Acil-CoA puede ser un producto directo de la biosíntesis o degradación de ácidos grasos. Además, acil-CoA puede sintetizarse a partir de un ácido graso libre, una CoA o un trifosfato de nucleótido de adenosina (ATP). Un ejemplo de una enzima que produce acil-CoA es acil-CoA sintasa.
- 50 Tras activarse el ácido graso, puede transferirse fácilmente a un nucleófilo receptor. Nucleófilos a modo de ejemplo son alcoholes, tioles o fosfatos.
- 55 El éster graso puede ser una cera. La cera puede derivarse de un alcohol de cadena larga y un ácido graso de cadena larga. El éster graso puede derivarse de un tioéster de acilo graso y un alcohol. El éster graso puede ser un tioéster de ácido graso, por ejemplo acil graso-coenzima A (CoA). El éster graso puede ser un pantotenato de acilo graso, una proteína portadora de acilo (ACP) o un éster de fosfato graso. Los ésteres grasos tienen muchos usos.

Por ejemplo, pueden usarse ésteres grasos como biocombustibles, tensioactivos o formularse para dar aditivos que proporcionan lubricación y otros beneficios a combustibles y productos químicos industriales.

Tal como se usa en el presente documento, "fracción de carbono moderno" o " $f_M$ " tiene el mismo significado que el definido por el National Institute of Standards and Technology (NIST), Standard Reference Materials (SRM) 4990B y 4990C, conocido como patrones de ácidos oxálicos HOxI y HOxII, respectivamente. La definición fundamental se refiere a 0,95 veces la razón de isótopos  $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$  de HOxI (en referencia a 1950 DC). Esto es aproximadamente equivalente a madera anterior a la revolución industrial corregida para la descomposición. Para la biosfera viva actual (material vegetal),  $f_M$  es de aproximadamente 1,1.

Pueden realizarse cálculos de "homología" entre dos secuencias tal como sigue. Las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en uno o ambos de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico para la alineación óptima y puede no tenerse en cuenta las secuencias no homólogas con fines de comparación). La longitud de una secuencia de referencia que se alinea con fines de comparación puede ser de al menos aproximadamente el 30%, preferiblemente al menos aproximadamente del 40%, más preferiblemente al menos aproximadamente del 50%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente del 60%, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente del 70%, al menos aproximadamente del 80%, al menos aproximadamente del 90% o aproximadamente del 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Entonces se comparan los residuos de aminoácido o nucleótidos en las posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótido correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (tal como se usa en el presente documento, "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas que comparten las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias pueden lograrse usando un algoritmo matemático. El porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970), *J. Mol. Biol.* 48:444-453, que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG, usando o bien una matriz Blossum 62 o bien una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. El porcentaje de homología entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. Un conjunto particularmente preferido de parámetros (y el que debería usarse si el técnico no está seguro de qué parámetros deben aplicarse para determinar si una molécula está dentro de una limitación de homología de las reivindicaciones) son una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización de hueco de 12, una penalización de extensión de hueco de 4 y una penalización de hueco de desplazamiento de marco de 5.

En la técnica se conocen otros métodos para alinear secuencias para comparación. Se describen diversos programas y algoritmos de alineación, por ejemplo, en Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981); Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988); Higgins & Sharp, *Gene* 73:237-244 (1988); Higgins & Sharp, *CABIOS* 5:151-153 (1989); Corpet *et al.*, *Nucleic Acids Research* 16:10881-10890 (1988); Huang *et al.*, *CABIOS* 8:155-165 (1992); y Pearson *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 24:307-331 (1994) y Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990).

Tal como se usa en el presente documento, una "célula huésped" es una célula usada para producir un producto descrito en el presente documento (por ejemplo, un aldehído o alceno). Una célula huésped puede modificarse para expresar o sobreexpresar genes seleccionados o para tener una expresión atenuada de genes seleccionados. Los ejemplos no limitativos de células huésped incluyen células vegetales, animales, humanas, de bacterias, cianobacterias, levaduras u hongos filamentosos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "se hibrida en condiciones de baja rigurosidad, rigurosidad media, alta rigurosidad o muy alta rigurosidad" describe condiciones para la hibridación y el lavado. Puede encontrarse orientación para realizar reacciones de hibridación, por ejemplo en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1 – 6.3.6. En esta referencia se describen métodos acuosos y no acuosos y puede usarse cualquiera de los métodos. Condiciones de hibridación específicas a las que se hace referencia en el presente documento son tal como siguen: 1) condiciones de hibridación de baja rigurosidad en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por dos lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% al menos a 50°C (la temperatura de los lavados puede aumentarse hasta 55°C para las condiciones de baja rigurosidad); 2) condiciones de hibridación de rigurosidad media en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% a 60°C; 3) condiciones de hibridación de alta rigurosidad en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% a 65°C; y preferiblemente 4) condiciones de hibridación de muy alta rigurosidad son fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7% a 65°C, seguido por uno o más lavados a 0,2X SSC, SDS al 1% a 65°C. Las condiciones de muy alta rigurosidad (4) son las condiciones preferidas a menos que se especifique lo contrario.

- El término “aislado” tal como se usa en el presente documento con respecto a ácidos nucleicos, tales como ADN o ARN, se refiere a moléculas separadas de otros ADN o ARN, respectivamente, que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Además, un “ácido nucleico aislado” incluye fragmentos de ácido nucleico, tales como fragmentos que no se producen de manera natural. El término “aislado” también se usa en el presente documento para referirse a polipéptidos, que se aíslan de otras proteínas celulares y abarca tanto polipéptidos purificados endógenos como polipéptidos recombinantes. El término “aislado” tal como se usa en el presente documento también se refiere a un ácido nucleico o polipéptido que está sustancialmente libre de material celular, material viral o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante. El término “aislado” tal como se usa en el presente documento también se refiere a un ácido nucleico o polipéptido que está sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.
- Tal como se usa en el presente documento, el “nivel de expresión de un gen en una célula” se refiere al nivel de ARNm, transcripto(s) incipiente(s) pre-ARNm, productos intermedios de procesamiento de transcriptos, ARNm maduro(s) y productos de degradación codificados por el gen en la célula.
- Tal como se usa en el presente documento, el término “microorganismo” significa especies microbianas procariontas y eucariotas de los dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eucarya*, incluyendo este último levaduras y hongos filamentosos, protozoos, algas o protistas superiores. El término “célula microbiana”, tal como se usa en el presente documento, significa una célula de un microorganismo.
- Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico” se refiere a un polinucleótido, tal como ácido desoxirribonucleico (ADN) y, cuando sea apropiado, ácido ribonucleico (ARN). El término también incluye análogos de cualquiera de ARN o ADN preparados a partir de análogos de nucleótidos, y tal como puede aplicarse a la realización que está describiéndose, polinucleótidos mono (sentido o antisentido) y bicatenarios, EST, cromosomas, ADNc, ARNm y ARNr. El término “ácido nucleico” puede usarse de manera intercambiable con “polinucleótido”, “ADN”, “molécula de ácido nucleico”, “secuencia de nucleótidos” y/o “gen” a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente de otra forma por el contexto.
- Tal como se usa en el presente documento, el término “operativamente unido” significa que una secuencia de nucleótidos seleccionada (por ejemplo, que codifica para un polipéptido descrito en el presente documento) está en proximidad con un promotor para permitir que el promotor regule la expresión de la secuencia de nucleótidos seleccionada. Además, el promotor se localiza en el sentido de 5' de la secuencia de nucleótidos seleccionada en cuanto al sentido de transcripción y traducción. Por “operativamente unido” quiere decirse que una secuencia de nucleótidos y una(s) secuencia(s) reguladora(s) están conectadas de tal manera como para permitir la expresión génica cuando las moléculas apropiadas (por ejemplo, proteínas activadoras de la transcripción) se unen a la(s) secuencia(s) reguladora(s).
- El término “o” se usa en el presente documento para significar, y se usa de manera intercambiable con, el término “y/o”, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.
- Tal como se usa en el presente documento, “sobreexpresar” significa expresar o provocar que se exprese o se produzca un ácido nucleico, polipéptido o hidrocarburo en una célula a una concentración superior a la que se expresa normalmente en una célula silvestre correspondiente. Por ejemplo, un polipéptido puede “sobreexpresarse” en una célula huésped recombinante cuando el polipéptido está presente en una concentración superior en la célula huésped recombinante en comparación con su concentración en una célula huésped no recombinante de la misma especie.
- Tal como se usa en el presente documento, “coeficiente de reparto” o “P”, se define como la concentración en equilibrio de un compuesto en una fase orgánica dividida entre la concentración en equilibrio en una fase acuosa (por ejemplo, caldo de fermentación). En una realización de un sistema bifásico descrita en el presente documento, la fase orgánica se forma mediante el aldehído o alcanos durante el procedimiento de producción. Sin embargo, en algunos ejemplos, puede proporcionarse una fase orgánica, tal como proporcionando una fase de octano, para facilitar la separación del producto. Cuando se describe un sistema de dos fases, las características de reparto de un compuesto pueden describirse como logP. Por ejemplo, un compuesto con un logP de 1 se repartirá 10:1 en la fase orgánica. Un compuesto con un logP de -1 se repartirá 1:10 en la fase orgánica. Eligiendo un caldo de fermentación y una fase orgánica apropiados, un derivado de ácido graso o producto con un valor de logP alto puede separarse en la fase orgánica incluso a concentraciones muy bajas en el recipiente de fermentación.
- Tal como se usa en el presente documento, el término “polipéptido” puede usarse de manera intercambiable con “proteína”, “péptido” y/o “enzima” a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente de otra forma por el contexto.
- Tal como se usa en el presente documento, el término “huésped de producción” significa una célula usada para producir los productos dados a conocer en el presente documento. El huésped de producción se modifica para expresar, sobreexpresar, atenuar o delecionar la expresión de polinucleótidos seleccionados. Los ejemplos no limitativos de huéspedes de producción incluyen células vegetales, de algas, animales, humanas, de bacterias, levaduras y hongos filamentosos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “purificar”, “purificado” o “purificación” significa la retirada o el aislamiento de una molécula de su entorno mediante, por ejemplo, aislamiento o separación. Las moléculas “sustancialmente purificadas” están libres al menos aproximadamente al 60%, preferiblemente libres al menos aproximadamente al 75% y más preferiblemente libres al menos aproximadamente al 90% de otros componentes con los que están asociadas. Tal como se usa en el presente documento, estos términos también se refieren a la eliminación de contaminantes de una muestra. Por ejemplo, la eliminación de contaminantes puede dar como resultado un aumento en el porcentaje de derivado de ácido graso o producto en una muestra. Por ejemplo, cuando se producen derivados de ácidos grasos o productos en una célula huésped, los derivados de ácidos grasos o productos pueden purificarse mediante la eliminación de proteínas de la célula huésped. Tras la purificación, aumenta el porcentaje de derivados de ácidos grasos o productos en la muestra.

Los términos “purificar”, “purificado” y “purificación” no requieren pureza absoluta. Son términos relativos. Por tanto, por ejemplo, cuando se producen derivados de ácidos grasos o productos en células huésped, un derivado de ácido graso o producto purificado es uno que está sustancialmente separado de otros componentes celulares (por ejemplo, ácidos nucleicos, polipéptidos, lípidos, hidratos de carbono u otros hidrocarburos). En otro ejemplo, una preparación de derivado de ácido graso purificado o producto purificado es una en la que el derivado de ácido graso o producto está sustancialmente libre de contaminantes, tales como los que pueden estar presentes tras la fermentación. Un derivado de ácido graso o producto puede estar purificado cuando al menos aproximadamente el 50% en peso de una muestra está compuesto por el derivado de ácido graso o producto. En otras realizaciones, un derivado de ácido graso o producto está purificado 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 en peso de una muestra está compuesto por el derivado de ácido graso o producto.

Tal como se usa en el presente documento, el término “polipéptido recombinante” se refiere a un polipéptido que se produce mediante técnicas de ADN recombinante, en las que de manera general se inserta ADN que codifica para la el ARN o polipéptido expresado en un vector de expresión adecuado y que a su vez se usa para transformar una célula huésped para producir el polipéptido o ARN.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente idéntico” (o “sustancialmente homólogo”) se usa para referirse a una primera secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que contiene un número suficiente de residuos de aminoácido idénticos o equivalentes (por ejemplo, con una cadena lateral similar) (por ejemplo, sustituciones de aminoácido conservadas) o nucleótidos a una segunda secuencia de aminoácidos o de nucleótidos de manera que la primera y la segunda secuencia de aminoácidos o de nucleótidos tienen actividades similares.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sintasa” significa una enzima que cataliza un proceso de síntesis. Tal como se usa en el presente documento, el término sintasa incluye sintasas, sintetasas y ligasas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “transfección” significa la introducción de un ácido nucleico (por ejemplo, mediante un vector de expresión) en una célula receptora mediante transferencia de genes mediada por ácido nucleico.

Tal como se usa en el presente documento, el término “transformación” se refiere a un proceso en el que se cambia el genotipo de una célula como resultado de la captación celular de ácido nucleico exógeno. Esto puede dar como resultado que la célula transformada exprese una forma recombinante de un ARN o polipéptido. En el caso de expresión antisentido a partir del gen transferido, se altera la expresión de una forma que se produce de manera natural del polipéptido.

Tal como se usa en el presente documento, el término “proteína de transporte” significa un polipéptido que facilita el movimiento de uno o más compuestos al interior y/o al exterior de un orgánulo celular y/o una célula. Varias de estas proteínas, así como otras proteínas útiles para preparar los productos descritos en el presente documento, se han dado a conocer, por ejemplo, en las solicitudes de patente internacional n.<sup>os</sup> PCT/US2007/011923 y PCT/US2008/058788.

Tal como se usa en el presente documento, una “variante” de polipéptido X se refiere a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de polipéptido X en la que uno o más residuos de aminoácido están alterados. La variante puede tener cambios conservativos o cambios no conservativos. Puede encontrarse orientación en la determinación de qué residuos de aminoácido pueden sustituirse, insertarse o delecionarse sin afectar a la actividad biológica usando programas informáticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el software LASERGENE (DNASTAR).

El término “variante”, cuando se usa en el contexto de una secuencia de polinucleótido, puede abarcar una secuencia de polinucleótido relacionada con la de un gen o la secuencia codificante del mismo. Esta definición también puede incluir, por ejemplo, variantes “alélicas”, “de corte y empalme”, “de especies” o “polimórficas”. Una variante de corte y empalme puede tener identidad significativa con respecto a un polinucleótido de referencia, pero generalmente tendrá un número mayor o menor de polinucleótidos debido al corte y empalme alternativo de exones durante el procesamiento de ARNm. El polipéptido correspondiente puede presentar dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Las variantes de especies son secuencias de polinucleótido que varían de

una especie a otra. Los polipéptidos resultantes tendrán identidad de aminoácido significativa unos con respecto a otros. Una variante polimórfica es una variación en la secuencia de polinucleótido de un gen particular entre individuos de una especie dada.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector útil es un episoma (es decir, un ácido nucleico que puede realizar replicación fuera de los cromosomas). Los vectores útiles son los que pueden realizar replicación y/o expresión autónoma de ácidos nucleicos a los que están unidos. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos se denominan en el presente documento “vectores de expresión”. En general, vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de “plásmidos”, que se refieren generalmente a bucles de ADN bicatenario circular que, en su forma de vector, no están unidos al cromosoma. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” se usan de manera intercambiable, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, también se incluyen otras formas de vectores de expresión que sirven para funciones equivalentes y que lleguen a conocerse en la técnica posteriormente a esto.
- 10
- 15 Tal como se usa en el presente documento, el término “cera” significa una composición compuesta por ésteres grasos. En una realización preferida, el éster graso en la cera está compuesto por cadenas de carbono de medias a largas. Además de ésteres grasos, una cera puede comprender otros componentes (por ejemplo, hidrocarburos, ésteres de esteroles, aldehídos alifáticos, alcoholes, cetonas, beta-dicetonas, triacilgliceroles, etc.).
- 20 A lo largo de toda la memoria descriptiva, puede hacerse una referencia usando un nombre de polipéptido o nombre de gen abreviado, pero se entiende que un nombre de polipéptido o gen abreviado de este tipo representa el género de genes o polipéptidos. Tales nombres de genes incluyen todos los genes que codifican para el mismo polipéptido y polipéptidos homólogos que tienen la misma función fisiológica. Los nombres de polipéptido incluyen todos los polipéptidos que tienen la misma actividad (por ejemplo, que catalizan la misma reacción química fundamental).
- 25 Los números de registro a los que se hace referencia en el presente documento se derivan de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mantenida por el National Institute of Health, EE.UU. A menos que se indique lo contrario, los números de registro son tal como se proporcionan en la base de datos en abril de 2009.
- 30 Los números EC se establecen por el Nomenclature Committee de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) (disponible en <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>). Los números EC a los que se hace referencia en el presente documento se derivan de la base de datos KEGG Ligand, mantenida por la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics, subvencionada en parte por la Universidad de Tokio. A menos que se indique lo contrario, los números EC son tal como se proporcionan en la base de datos en abril de 2009.
- 35 A menos que se defina lo contrario, 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 invención.
- 40 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 invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente de otra forma por el contexto.
- 45 A menos que se mencione lo contrario, todas las cantidades indicadas en porcentaje (%) son en porcentaje en peso, basándose en el peso total de la composición.
- En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.
- La mención de intervalos de valores en el presente documento simplemente pretende servir como método abreviado de hacer referencia individual a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionase individualmente en el presente documento.
- 50 El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o expresiones a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionados en el presente documento, simplemente pretende ilustrar mejor la invención y no representa una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la puesta en práctica de la invención.
- Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.
- 55 La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que pueden producirse ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos tales como ésteres grasos cultivando células huésped modificadas por ingeniería

genética que comprenden una éster sintasa expresada o sobreexpresada, o una variante adecuada de la misma, pero un nivel atenuado o una ausencia de cualquiera o ambas de una enzima de degradación de ácidos grasos tal como una acil-CoA sintasa y una tioesterasa, en comparación con el nivel que se produce de manera natural de tales enzimas. En comparación con los métodos de producción de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos a través de procedimientos de fermentación microbianos dados a conocer anteriormente, que implican normalmente, además de una éster sintasa, al menos una de una tioesterasa y una enzima de degradación de ácidos grasos tal como una acil-CoA sintasa, que requieren preferiblemente la presencia de actividades o niveles aumentados de estas enzimas, el presente método es más eficaz y favorable desde el punto de vista energético. Por ejemplo, el método descrito en el presente documento permite la conversión directa de un tioéster, tal como una acil-ACP y/o una acil-CoA, en un ácido graso y/o un derivado de ácido graso, evitando el requisito de hidrolizar en primer lugar una ACP para preparar un ácido graso y luego reactivar el ácido graso para producir una acil-CoA.

#### Genes de éster sintasa y variantes

Pueden producirse ésteres grasos cultivando células huésped modificadas por ingeniería genética que comprenden enzimas éster sintasa, ácidos nucleicos que codifican para estas enzimas, vectores que comprenden ácidos nucleicos que codifican para estas enzimas, o cultivando células huésped recombinantes transformadas con los vectores, y células huésped recombinantes que comprenden polinucleótidos que codifican para estas enzimas éster sintasa, que se integran de manera cromosómica en las mismas. Específicamente, el método incluye expresar en una célula huésped un gen que codifica para una éster sintasa, seleccionado, por ejemplo, de las enzimas clasificadas como EC 2.3.1.75, que catalizan la transferencia enzimática de residuos de acilo saturados o insaturados, por ejemplo, aquéllos de longitud de cadena de C<sub>18</sub> a C<sub>20</sub>, a alcoholes. La éster sintasa puede ser una seleccionada del grupo que consiste en un éster de cera sintasa, una acil-CoA:alcohol transacilasa, una aciltransferasa y una acil graso-CoA:alcohol graso aciltransferasa. Por ejemplo, el gen de éster sintasa puede ser uno que codifica para *ws/dgat*, una éster sintasa/acil-CoA/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa bifuncional de *Simmondsia chinensis*, *Acinetobacter sp.*, *Acinetobacter sp. ADP1*, *alcanivorax borkumensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fundibacter jadensis*, *Arabidopsis thaliana* o *Alkaligenes eutrophus*. Se proporciona un método de preparación de un ácido graso o un derivado de ácido graso tal como, por ejemplo, un éster graso, en el que el método incluye expresar en una célula huésped un gen que codifica para una éster sintasa seleccionada del grupo que consiste en *AtfA1* (YP694462, SEQ ID NO: 25), *AtfA2* (YP693524, SEQ ID NO: 26), *ES9* (ABO21021, SEQ ID NO: 18) y *ES8* (ABO21020, SEQ ID NO: 24), o una variante de la misma.

Se proporciona un método de preparación de un ácido graso o un derivado de ácido graso tal como, por ejemplo un éster graso, en el que el método incluye expresar en una célula huésped un gen que codifica para un polipéptido de éster sintasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26, o una variante de la misma. El polipéptido o la variante puede tener actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. El polipéptido o la variante puede catalizar la conversión de un tioéster en un ácido graso y/o un derivado de ácido graso, usando un alcohol como sustrato. En un ejemplo, el polipéptido o la variante cataliza la conversión de una acil-CoA en un ácido graso y/o un derivado de ácido graso, usando un alcohol como sustrato. En otro ejemplo, el polipéptido o la variante cataliza la conversión de una acil-ACP en un ácido graso y/o un derivado de ácido graso, usando un alcohol como sustrato. Aún en otro ejemplo, el polipéptido o la variante también convierte un ácido graso libre en un éster graso usando un alcohol como sustrato. Los sustratos de alcohol pueden ser alcoholes de cadena corta o larga. El sustrato de alcohol puede ser un metanol, y por consiguiente, la célula huésped que expresa la éster sintasa o variante produce un ácido graso y/o un derivado de metilo de ácido graso, tal como un éster metílico. El sustrato de alcohol puede ser un etanol, y por consiguiente, la célula huésped que expresa la éster sintasa o variante produce un ácido graso y/o un derivado de etilo de ácido graso, tal como un éster etílico.

Una tioesterasa endógena de la célula huésped, si está presente, puede no estar modificada. La célula huésped puede expresar un nivel atenuado de una tioesterasa, en comparación con el nivel que se produce de manera natural de esa tioesterasa. Una tioesterasa puede estar delecionada funcionalmente. Puede no haber actividad tioesterasa detectable en la célula huésped. La célula huésped puede expresar un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos, tal como una acil-CoA sintasa, en comparación con el nivel que se produce de manera natural de esa enzima. Una acil-CoA sintasa puede estar delecionada funcionalmente. La célula huésped puede no tener actividad acil-CoA sintasa detectable. La célula huésped puede expresar niveles atenuados de una tioesterasa y una enzima de degradación de ácidos grasos tal como una acil-CoA sintasa. Una tioesterasa y una acil-CoA sintasa pueden estar delecionadas funcionalmente. La célula huésped puede no tener actividad detectable de una tioesterasa o una acil-CoA sintasa.

El método puede comprender expresar en una célula huésped un gen que codifica para un polipéptido de éster sintasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26, o una variante de la misma, en el que una tioesterasa, una acil-CoA sintasa, o ambas, están delecionadas o desactivadas funcionalmente de la célula huésped. La célula huésped puede no tener actividad tioesterasa o actividad acil-CoA sintasa detectable.

Las variantes pueden producirse de manera natural o crearse *in vitro*. En particular, las variantes pueden crearse usando técnicas de ingeniería genética, tales como mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis química al azar, procedimientos de deleción con exonucleasa III y técnicas de clonación convencionales. Alternativamente, tales variantes, fragmentos, análogos o derivados pueden crearse usando procedimientos de síntesis química o

modificación.

5 En la técnica se conocen bien métodos de preparación de variantes. Estos incluyen procedimientos en los que se modifican secuencias de ácido nucleico obtenidas a partir de aislados naturales para generar ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos que tienen características que potencian su valor en aplicaciones industriales o de laboratorio. En tales procedimientos, se generan y caracterizan un gran número de secuencias de variantes que tienen una o más diferencias de nucleótido con respecto a la secuencia obtenida a partir del aislado natural. Normalmente, estas diferencias de nucleótido dan como resultado cambios de aminoácido con respecto a los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos a partir de aislados naturales.

10 Por ejemplo, pueden crearse variantes usando PCR propensa a errores (véase, por ejemplo, Leung *et al.*, Technique 1:11-15, (1989); y Caldwell *et al.*, PCR Methods Applic. 2:28-33, (1992)). En PCR propensa a errores, se realiza PCR en condiciones en las que la fidelidad de copiado de la ADN polimerasa es baja, de manera que se obtiene una alta tasa de mutaciones puntuales a lo largo de toda la longitud del producto de PCR. En resumen, en tales procedimientos, se mezclan ácidos nucleicos que van a mutarse (por ejemplo, una secuencia de éster sintasa), con cebadores de PCR, tampón de reacción, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, Taq polimerasa y una concentración apropiada de dNTP para lograr una alta tasa de mutación puntual a lo largo de toda la longitud del producto de PCR. Por ejemplo, puede realizarse la reacción usando 20 fmoles de ácido nucleico que va a mutarse (por ejemplo, una secuencia de polinucleótido de éster sintasa), 30 pmoles de cada cebador de PCR, un tampón de reacción que comprende KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM (pH 8,3) y gelatina al 0,01%, MgCl<sub>2</sub> 7 mM, MnCl<sub>2</sub> 0,5 mM, 5 unidades de Taq polimerasa, dGTP 0,2 mM, dATP 0,2 mM, dCTP 1 mM y dTTP 1 mM. Puede realizarse la PCR durante 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 45°C durante 1 min y 72°C durante 1 min. Sin embargo, se apreciará que estos parámetros pueden variarse según sea apropiado. Entonces se clonan los ácidos nucleicos mutados en un vector apropiado y se evalúan las actividades de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos mutados.

25 También pueden crearse variantes usando mutagénesis dirigida a oligonucleótidos para generar mutaciones específicas de sitio en cualquier ADN clonado de interés. La mutagénesis de oligonucleótidos se describe, por ejemplo, en Reidhaar-Olson *et al.*, Science 241:53-57, (1988). En resumen, en tales procedimientos se sintetizan una pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios que portan una o más mutaciones que van a introducirse en el ADN clonado y se insertan en el ADN clonado que va a mutarse (por ejemplo, una secuencia de polinucleótido de éster sintasa). Se recuperan clones que contienen el ADN mutado, y se evalúan las actividades de los polipéptidos para los que codifican.

30 Otro método para generar variantes es PCR de ensamblaje. La PCR de ensamblaje implica el ensamblaje de un producto de PCR a partir de una mezcla de fragmentos de ADN pequeños. Un gran número de diferentes reacciones de PCR se producen en paralelo en el mismo vial, cebando los productos de una reacción a los productos de otra reacción. La PCR de ensamblaje se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.965.408.

35 Todavía otro método de generación de variantes es mutagénesis mediante PCR sexual. En la mutagénesis mediante PCR sexual, se produce la recombinación homóloga forzada entre moléculas de ADN de secuencias de ADN diferentes, pero altamente relacionadas, *in vitro* como resultado de fragmentación al azar de la molécula de ADN basándose en la homología de secuencia. Esto va seguido por la fijación del cruzamiento mediante extensión del cebador en una reacción de PCR. La mutagénesis mediante PCR sexual se describe, por ejemplo, en Stemmer, PNAS, USA 91:10747-10751, (1994).

40 También pueden crearse variantes mediante mutagénesis *in vivo*. En algunas realizaciones, se generan mutaciones al azar en una secuencia de ácido nucleico propagando la secuencia en una cepa bacteriana, tal como una cepa de *E. coli*, que porta mutaciones en una o más de las rutas de reparación de ADN. Tales cepas "mutadoras" tienen una mayor tasa de mutación al azar que la de una cepa silvestre. La propagación de una secuencia de ADN (por ejemplo, una secuencia de polinucleótido de éster sintasa) en una de estas cepas generará finalmente mutaciones al azar dentro del ADN. Las cepas mutadoras adecuadas para su uso para la mutagénesis *in vivo* se describen, por ejemplo, en la publicación PCT n.º WO 91/16427.

También pueden generarse variantes usando mutagénesis de casete. En la mutagénesis de casete, se reemplaza una región pequeña de un molécula de ADN bicatenario por un "casete" de oligonucleótido sintético que difiere de la secuencia nativa. El oligonucleótido a menudo contiene una secuencia nativa completa y/o parcialmente al azar.

50 También puede usarse mutagénesis de conjunto recursivo para generar variantes. La mutagénesis de conjunto recursivo es un algoritmo para el diseño por ingeniería genética de proteínas (es decir, mutagénesis de proteínas) desarrollado para producir diversas poblaciones de mutantes relacionados fenotípicamente cuyos miembros difieren en la secuencia de aminoácidos. Este método usa un mecanismo de retroalimentación para controlar las tandas sucesivas de mutagénesis de casete combinatoria. La mutagénesis de conjunto recursivo se describe, por ejemplo, en Arkin *et al.*, PNAS, USA 89:7811-7815, (1992).

55 Pueden crearse variantes usando mutagénesis de conjunto exponencial. La mutagénesis de conjunto exponencial es un procedimiento para generar bibliotecas combinatorias con un alto porcentaje de mutantes únicos y funcionales, en los que se aleatorizan pequeños grupos de residuos en paralelo para identificar, en cada posición

alterada, aminoácidos que conducen a proteínas funcionales. La mutagénesis de conjunto exponencial se describe, por ejemplo, en Delegrave *et al*, *Biotech. Res.* 11: 1548-1552, (1993). La mutagénesis dirigida al sitio y al azar se describen, por ejemplo, en Arnold, *Curr. Opin. Biotech.* 4:450-455, (1993).

5 Pueden crearse variantes usando procedimientos de intercambio en los que se fusionan entre sí porciones de una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican para distintos polipéptidos para crear secuencias de ácido nucleico quiméricas que codifican para polipéptidos quiméricos tal como se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 5.965.408 y 5.939.250.

10 Las variantes de polinucleótido también incluyen análogos de ácido nucleico. Los análogos de ácido nucleico pueden modificarse en el resto básico, resto azúcar o estructura principal de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, hibridación o solubilidad del ácido nucleico. Las modificaciones en el resto básico incluyen desoxiuridina para desoxitimidina y 5-metil-2'-desoxicitidina o 5-bromo-2'-doxicitidina para desoxicitidina. Las modificaciones del resto azúcar incluyen modificación del 2'-hidroxilo del azúcar ribosa para formar azúcares 2'-O-metilo, 2'-halo o 2'-O-alilo. La estructura principal de fosfato de desoxirribosa puede modificarse para producir ácidos morfolino-nucleicos, en los que cada resto básico está unido a un anillo morfolino de seis miembros, o ácidos nucleicos peptídicos, en los que la estructura principal de desoxifosfato se reemplaza por una estructura principal de pseudopéptido y se mantienen las cuatro bases. (Véase, por ejemplo, Summerton *et al.*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* (1997) 7:187-195; e Hyrup *et al*, *Bioorgan. Med. Chem.* (1996) 4:5-23). Además, la estructura principal de desoxifosfato puede reemplazarse por, por ejemplo, una estructura principal de fosforitoato o fosforoditoato, una fosforoamidita o una estructura principal de fosfotriéster de alquilo.

20 El polipéptido de éster sintasa puede ser una variante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26, con una o más sustituciones, adiciones, inserciones o deleciones de aminoácido, y el polipéptido tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. Por ejemplo, la variante de éster sintasa cataliza la conversión de tioésteres en ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos, usando alcoholes como sustratos. La variante de éster sintasa también puede catalizar la conversión de ácidos grasos libres en ésteres grasos.

25 En algunos casos, los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para producir ácidos grasos o derivados de ácidos grasos usando un polipéptido de éster sintasa que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26, así como variantes de polipéptido del mismo. Variante de polipéptido de éster sintasa puede ser variantes en las que uno o más residuos de aminoácido se sustituyen por residuos de aminoácido conservados o no conservados. Tales residuos de aminoácido sustituidos pueden ser o no los codificados por el código genético.

30 El polipéptido de éster sintasa puede ser una variante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26, con una o más sustituciones de aminoácido no conservadas, en el que la variante de polipéptido tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. En algunas realizaciones, el residuo de glicina en la posición 395 de SEQ ID NO: 18 está sustituido por un residuo de aminoácido básico, en las que la variante de éster sintasa resultante conserva o tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa mejorada.

35 El polipéptido de éster sintasa puede ser una variante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26, con una o más sustituciones de aminoácido conservadas. Sustituciones conservadas son las que sustituyen un residuo de aminoácido dado en un polipéptido por otro aminoácido de características similares. Las sustituciones conservadas típicas incluyen los siguientes reemplazos: reemplazo de un aminoácido alifático, tal como alanina, valina, leucina e isoleucina, por otro aminoácido alifático; reemplazo de una serina por una treonina; reemplazo de una treonina por una serina; reemplazo de un residuo ácido, tal como ácido aspártico y ácido glutámico, por otro residuo ácido; reemplazo de residuo que porta un grupo amida; intercambio de un residuo básico, tal como lisina y arginina, por otro residuo básico; y reemplazo de un residuo aromático, tal como fenilalanina y tirosina, por otro residuo aromático. La variante de polipéptido de éster sintasa puede tener actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. Por ejemplo, la variante de polipéptido de éster sintasa cataliza la conversión de un tioéster en un ácido graso y/o un derivado de ácido graso. En otro ejemplo, el polipéptido de éster sintasa cataliza la conversión de un ácido graso libre en un éster graso.

Otras variantes de polipéptido incluyen aquellas en las que uno o más residuos de aminoácido incluyen un grupo sustituyente. Todavía otras variantes de polipéptido incluyen aquellas en las que el polipéptido está asociado con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol).

50 Variantes de polipéptido adicionales son aquellas en las que se fusionan residuos de aminoácido adicionales con el polipéptido, tal como una secuencia líder, una secuencia secretora, una secuencia de proproteína, o una secuencia que facilita la purificación, el enriquecimiento o la estabilización del polipéptido.

55 En determinados casos, las variantes de polipéptido conservan la misma función biológica que un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26 y tienen secuencias de aminoácidos sustancialmente idénticas a las mismas. En casos particulares, las variantes de polipéptido conservan la actividad éster sintasa y/o aciltransferasa, por ejemplo, de un polipéptido de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18.

En otros casos, las variantes de polipéptido tienen al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente

- el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% de homología con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26. En otro caso, las variantes de polipéptido incluyen un fragmento que comprende al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 residuos de aminoácido consecutivos de las mismas.
- Las variantes de polipéptido o fragmentos de las mismas pueden obtenerse aislando ácidos nucleicos que codifican para las mismas usando técnicas descritas en el presente documento o expresando ácidos nucleicos sintéticos que codifican para las mismas. Alternativamente, pueden obtenerse variantes de polipéptido o fragmentos de las mismas a través de procedimientos de enriquecimiento o purificación bioquímicos. La secuencia de variantes de polipéptido o fragmentos puede determinarse mediante digestión proteolítica, electroforesis en gel y/o microsecuenciación. Por ejemplo, la secuencia de las variantes de polipéptido o fragmentos puede compararse entonces con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26 usando cualquiera de los programas descritos en el presente documento.
- Las variantes de polipéptido y fragmentos de las mismas pueden someterse a ensayo para determinar la actividad éster sintasa y/o actividad aciltransferasa usando métodos de rutina. Por ejemplo, las variantes de polipéptido o fragmentos pueden ponerse en contacto con un sustrato (por ejemplo, una acil-CoA, una acil-ACP, un ácido graso libre o un alcohol) en condiciones que permiten que el polipéptido funcione. Puede medirse una disminución en el nivel del sustrato o un aumento en el nivel de un ácido graso y/o un producto de derivado de ácido graso para determinar la actividad éster sintasa/aciltransferasa.
- La variante de polipéptido de éster sintasa puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26, con una o más sustituciones de aminoácido no conservadas pero sigue teniendo actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. El residuo de glicina en la posición 395 puede sustituirse por un residuo de aminoácido básico, en el que la variante de éster sintasa resultante conserva o tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa mejorada, en relación con la de una éster sintasa nativa o silvestre. En un caso particular, el residuo de glicina en la posición 395 de SEQ ID NO: 18 se sustituye por una arginina o una lisina, en el que la variante de éster sintasa resultante tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa mejorada, en relación con la actividad de la éster sintasa silvestre de SEQ ID NO: 18.
- El polipéptido puede comprender una o más sustituciones de aminoácido conservadas. El polipéptido puede tener aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más sustituciones, adiciones, inserciones o deleciones de aminoácidos. El polipéptido que comprende la una o más sustituciones, adiciones, inserciones o deleciones de aminoácidos puede conservar la misma actividad biológica que un polipéptido de SEQ ID NO: 18, 24, 25 ó 26. Tal como se usa en el presente documento, "que conserva una actividad biológica" se refiere a la conservación de un nivel detectable de esa actividad biológica, en vez de la conservación del mismo nivel de una actividad. Por ejemplo, el polipéptido que comprende una o más sustituciones, adiciones, inserciones o deleciones de aminoácidos tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. Por ejemplo, el polipéptido puede catalizar la conversión de tioésteres en ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos tales como ésteres grasos, usando alcoholes como sustratos. Los sustratos de tioéster adecuados incluyen, por ejemplo, tioésteres grasos tales como acil graso-CoA o acil graso-ACP. En otro ejemplo, el polipéptido puede catalizar la conversión de un ácido graso libre en un éster graso usando un alcohol como sustrato. Los sustratos de alcohol adecuados incluyen, por ejemplo, alcoholes de cadena larga o corta tales como metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, decanol, dodecanol, tetradecanol o hexadecanol.
- En determinadas realizaciones, la invención se refiere a métodos de producción de un ácido graso o un derivado de ácido graso tal como, por ejemplo, un éster graso, en el que el método incluye expresar en una célula huésped un gen o polinucleótido que codifica para una variante de éster sintasa, ES9 (n.º de registro de GenBank ABO21021, SEQ ID NO: 18), en el que la célula huésped expresa un nivel atenuado de una tioesterasa, o en el que la tioesterasa está delecionada funcionalmente. Se proporcionan métodos de producción de un ácido graso o un derivado de ácido graso tal como, por ejemplo, un éster graso, en el que método incluye expresar en una célula huésped un gen que codifica para una variante de ES9 (SEQ ID NO: 18), en el que la célula huésped expresa un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos tal como una acil-CoA sintasa, o en el que la acil-CoA sintasa está delecionada funcionalmente. Se proporcionan métodos de producción de un ácido graso o un derivado del mismo, en el que el método incluye expresar en una célula huésped un gen que codifica para una variante de ES9 (SEQ ID NO: 18), en el que la célula huésped expresa niveles atenuados de una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos tal como una acil-CoA sintasa o ambas, o en el que la tioesterasa, la acil-CoA sintasa o ambas están delecionadas funcionalmente. La célula huésped puede no tener actividad tioesterasa o actividad acil-CoA sintasa detectable.
- La variante de éster sintasa puede comprender una sustitución en el residuo de aminoácido correspondiente a la posición 395 de SEQ ID NO: 18. La variante comprende un residuo de aminoácido básico en la posición 395, que

reemplaza al residuo de glicina en esa posición de SEQ ID NO: 18. Por ejemplo, el residuo de aminoácido básico puede ser un residuo de lisina o uno de arginina. La variante puede tener una actividad éster sintasa y/o aciltransferasa igual o mejorada, en relación con la del el polipéptido de SEQ ID NO: 18.

5 Se proporcionan métodos de producción de un ácido graso o un derivado de ácido graso en los que el método incluye expresar en una célula huésped un polinucleótido que codifica para una variante de éster sintasa ES9, en los que la célula huésped expresa además un nivel atenuado de tioesterasa, una acil-CoA sintasa o ambas, o en los que la tioesterasa, la acil-CoA sintasa o ambas, están delecionadas funcionalmente. La variante de éster sintasa puede comprender una sustitución en el residuo de aminoácido correspondiente a la posición 395 de SEQ ID NO: 18 y una o más de otras sustituciones, adiciones, inserciones o delecciones de aminoácidos, y la variante tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. La variante puede catalizar la conversión de sustratos de tioéster y/o sustrato de alcohol en ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos. La variante puede catalizar la conversión de ácidos grasos libres en ésteres grasos.

15 El polipéptido de éster sintasa o una variante del mismo puede tener de aproximadamente 200 aminoácidos a aproximadamente 2.000 aminoácidos de longitud, por ejemplo, desde aproximadamente 250 hasta aproximadamente 1500 residuos de aminoácido de longitud, desde aproximadamente 300 hasta aproximadamente 1200 residuos de aminoácido de longitud, desde aproximadamente 350 hasta aproximadamente 1000 residuos de aminoácido de longitud, desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 800 residuos de aminoácido de longitud o desde aproximadamente 450 hasta aproximadamente 600 residuos de aminoácido de longitud. El polipéptido de éster sintasa que se produce de manera natural puede tener aproximadamente 300 residuos de aminoácido de longitud o más, por ejemplo, aproximadamente 400 residuos de aminoácido de longitud o más o aproximadamente 450 residuos de aminoácido de longitud o más. El polipéptido de éster sintasa o la variante del mismo tiene aproximadamente 1000 residuos de aminoácido de longitud o menos, por ejemplo, aproximadamente 800 residuos de aminoácido de longitud o menos, aproximadamente 700 residuos de aminoácido de longitud o menos o aproximadamente 600 residuos de aminoácido de longitud o menos. Una éster sintasa a modo de ejemplo tiene aproximadamente 500 residuos de aminoácido de longitud.

Se describen éster sintasas adicionales que pueden usarse en la solicitud de patente PCT titulada "Production of Fatty Acid Derivatives", presentada simultáneamente con el presente documento, con el número de expediente del apoderado 2001235.15WO1.

#### Anticuerpos frente a polipéptidos de éster sintasa

30 Los polipéptidos de éster sintasa descritos en el presente documento pueden usarse para producir anticuerpos dirigidos frente a polipéptidos de éster sintasa. Pueden usarse tales anticuerpos, por ejemplo, para detectar la expresión de un polipéptido de éster sintasa usando métodos conocidos en la técnica. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo policlonal; un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo; un anticuerpo modificado tal como un anticuerpo quimérico, anticuerpo reconformado, anticuerpo humanizado, o fragmento de los mismos (por ejemplo, Fab', Fab, F(ab')<sub>2</sub>); o un anticuerpo biosintético, por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla, anticuerpo de un solo dominio (DAB), Fv, Fv de cadena sencilla (scFv), o similares.

40 Se describen métodos de preparación y uso de anticuerpos policlonales y monoclonales, por ejemplo, en Harlow *et al.*, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol I. Cold Spring Harbor Laboratory (1 de diciembre de 1998). En la técnica se conocen métodos para preparar anticuerpos modificados y fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos reconformados, anticuerpos humanizados, o fragmentos de los mismos, por ejemplo, fragmentos Fab', Fab, F(ab')<sub>2</sub>); o anticuerpos biosintéticos (por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de un solo dominio (DAB), Fv, Fv de cadena sencilla (scFv), y similares), y pueden encontrarse, por ejemplo, en Zola, Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives, Springer Verlag (15 de diciembre del 2000; 1ª edición).

#### Sustratos

50 Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para producir ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos, por ejemplo, a partir de tioésteres y alcoholes, o a partir de ácidos grasos libres y alcoholes, que pueden producirse a su vez a partir de sustratos apropiados en la misma célula huésped. Sin querer restringirse a ninguna teoría, se cree que el huésped de producción modificado de manera recombinante puede modificarse para aumentar la producción de sustratos de tioéster tales como, por ejemplo, acil-CoA o acil-ACP, de ácidos grasos libres o de sustratos de alcohol adecuados tales como, por ejemplo, alcoholes grasos. Además, el huésped de producción modificado de manera recombinante puede modificarse para reducir el catabolismo de ácidos grasos o derivados de ácidos grasos y/o productos intermedios en las rutas de biosíntesis de ácidos grasos, o para reducir la inhibición por retroalimentación en puntos específicos en la misma ruta. Además de modificar los genes descritos en el presente documento, pueden desviarse recursos celulares adicionales a la sobreproducción de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos. Por ejemplo, pueden atenuarse las rutas de lactato, succinato y/o acetato, y pueden sobreexpresarse acetil-CoA carboxilasas (codificadas por genes *acc*). Las modificaciones en el huésped de producción pueden lograrse, por ejemplo, a través de alteraciones genómicas, adición de sistemas de expresión recombinante o combinaciones de los mismos.

En la figura 1A se representa una ruta representativa de biosíntesis de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos. Las siguientes secciones describen las etapas en estas rutas. Se catalizan diferentes etapas en la ruta mediante una variedad de enzimas. Cada etapa dentro de una ruta que conduce a la producción de un ácido graso y/o un sustrato derivado de ácido graso puede modificarse para producir o sobreproducir el sustrato de interés.

5 Por ejemplo, pueden expresarse, sobreexpresarse o atenuarse genes conocidos implicados en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos en una célula huésped para producir el sustrato deseado (véase, por ejemplo, el enfoque descrito en el documento PCT/US08/05877). Los genes a modo de ejemplo que pueden servir como puntos de cambio incluyen, sin limitación, *accA* (EC 6.4.1.2), *accB* (EC 6.4.1.2), *accC* (EC 6.4.1.2, EC 6.3.4.14), *accD* (EC 6.4.1.2), *aceE* (EC 1.2.4.1), *aceF* (EC 2.3.1.12), *fabD* (EC 2.3.1.39), *fabG* (EC 1.1.1.100), *fabH* (EC 2.3.1.180), *panD* (EC 4.1.1.11), *panK* (EC 2.7.1.33), *pdh* (EC 1.2.4.1), *udhA* (EC 1.6.1.1).

10 Ácido graso sintasa (FAS) es un grupo de polipéptidos que catalizan el inicio y la elongación de cadenas de acilo (Marrakchi *et al.*, Biochemical Society, 30:1050-1055 (2002)). La proteína portadora 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 etapas en esta ruta se catalizan por enzimas de las familias de genes de biosíntesis de ácidos grasos (*fab*) y acetil-CoA carboxilasa (*acc*) (véase, por ejemplo, Heath *et al.*, Prog. Lipid Res. 40(6):467-97 (2001)). Dependiendo del producto deseado, pueden atenuarse o sobreexpresarse uno o más de estos genes.

15 Pueden modificarse por ingeniería genética células huésped para expresar sustratos de derivado de ácido graso expresando o sobreexpresando de manera recombinante uno o más genes de ácido graso sintasa, tales como genes de acetil-CoA y/o malonil-CoA sintasa. Por ejemplo, para aumentar la producción de acetil-CoA, pueden expresarse o sobreexpresarse uno o más de los siguientes genes en una célula huésped: *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*, y *fabF*. Los números de registro de GenBank a modo de ejemplo para estos genes se enumeran entre paréntesis tras los nombres de los genes: *pdh* (BAB34380, AAC73227, AAC73226), *panK* (también conocido como *coaA*, AAC96952), *aceEF* (AAC73227, AAC73226), *fabH* (AAC74175), *fabD* (AAC74176), *fabG* (AAC74177), *acpP* (AAC74178), *fabF* (AAC74179).

20 Adicionalmente, los niveles de expresión de *fadE*, *gpsA*, *ldhA*, *pflB*, *adhE*, *pta*, *poxB*, *ackA* y/o *ackB* pueden reducirse o deletarse funcionalmente en el microorganismo modificado por ingeniería genética mediante transformación con plásmidos condicionalmente replicativos o no replicativos que contienen mutaciones nulas o por delección de los genes correspondientes o sustituyendo secuencias de promotor o potenciador. Los números de registro de GenBank a modo de ejemplo para estos genes se enumeran entre paréntesis: *fadE* (AAC73325), *gpsA* (AAC76632), *ldhA* (AAC74462), *pflB* (AAC73989), *adhE* (AAC74323), *pta* (AAC75357), *poxB* (AAC73958), *ackA* (AAC75356) y *ackB* (BAB81430). En una realización a modo de ejemplo, la expresión de *fadE* se atenúa o se deleta funcionalmente en una célula huésped de producción de la presente invención. Los huéspedes de producción modificados por ingeniería genética resultantes pueden producir niveles aumentados de acetil-CoA cuando se cultivan en un entorno apropiado.

30 De manera similar, puede efectuarse la sobreproducción de malonil-CoA modificando por ingeniería genética el huésped de producción tal como se describió con *accABCD* (por ejemplo, n.º de registro de GenBank AAC73296, clasificada como EC 6.4.1.2) incluido en el plásmido sintetizado *de novo*. Puede lograrse la sobreproducción de ácidos grasos incluyendo además una secuencia de ADN que codifica para lipasas (por ejemplo, n.º de registro de GenBank: CAA89087, CAA98876), en el plásmido sintetizado *de novo*.

35 Las células huésped resultantes, en algunas realizaciones, sobreexpresan acetil-CoA de manera que su concentración intracelular aumenta en más de aproximadamente 2 veces, por ejemplo, en más de aproximadamente 5 veces o más de aproximadamente 10 veces, en relación con los niveles de expresión nativos de acetil-CoA.

40 Puede verificarse la sobreproducción de acetil-CoA y malonil-CoA usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando precursores radiactivos, HPLC y CG-EM tras la lisis celular.

Adicionalmente, el mutante D311E de PlsB (por ejemplo, n.º de registro de GenBank AAC77011) puede usarse para aumentar la cantidad de acil-CoA disponible.

45 Además, puede efectuarse la sobreexpresión de un gen *sfa* (supresor de FabA, por ejemplo, n.º de registro de GenBank AAN79592) en un huésped de producción para aumentar la producción de ácidos grasos monoinsaturados (Rock *et al.*, J. Bacteriology 178:5382-5387 (1996)).

50 En un modelo de procedimiento microbiano típico para la síntesis de ácidos grasos y derivados de ácidos grasos, se convierten acetil-CoA y malonil-CoA a través de una serie de etapas para formar las cadenas de acil-ACP. Entonces se convierte acil-ACP por medio de una serie de etapas enzimáticas alternativas en diversos productos finales, incluyendo derivados de ácidos grasos. Por ejemplo, normalmente se convierte acil-ACP en ésteres grasos mediante las reacciones consecutivas combinadas de una tioesterasa, una acil-CoA ligasa/sintetasa y una éster sintasa. Una limitación al uso comercial de estas enzimas en una ruta metabólica es el requisito de hidrólisis de ACP para producir ácidos grasos que posteriormente se reactivan para producir los sustratos de acil graso-CoA, lo que requiere al menos dos etapas enzimáticas y el gasto de energía metabólica a partir de enlaces de fosfoanhídrido. Se

- ha descubierto que los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos tales como, por ejemplo, ésteres grasos, pueden producirse en presencia de una éster sintasa, evitando las participaciones de una tioesterasa, y/o evitando la participación de una enzima de degradación de ácidos grasos tal como una acil-CoA sintasa. Este enfoque más económico y eficaz mitiga la pérdida de ATP provocada por una ruta por lo demás de múltiples etapas.
- 5 Específicamente, se ha descubierto que una éster sintasa adecuada, en ausencia de una tioesterasa coexpresada, y/o una enzima de degradación de ácidos grasos coexpresada tal como una acil-CoA sintasa, puede utilizar eficazmente tioésteres tales como acil-ACP o acil-CoA, ácidos grasos libres y/o alcoholes tales como alcoholes de cadena corta o larga, como sustratos para producir ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos deseables en condiciones apropiadas.
- 10 Un experto habitual en la técnica puede determinar la idoneidad de usar una enzima éster sintasa particular para producir directamente ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos a partir de sustratos de tioéster. El ejemplo 14 describe ensayos representativos que pueden usarse, entre otros métodos adecuados, para determinar si se produce un ácido graso y/o derivados de ácidos grasos y/o la cantidad que se produce en un sistema de producción dado.
- 15 Pueden utilizarse diversas éster sintasas para producir directamente ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos, en presencia o en ausencia de una tioesterasa, y/o en presencia o en ausencia de una enzima de degradación de ácidos grasos tal como, por ejemplo, una acil-CoA sintasa. Por ejemplo, la expresión o sobreexpresión de una éster sintasa que puede catalizar la producción directa de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos en una cepa huésped recombinante. Esto puede usarse para complementar la producción de derivados de ácidos grasos cuando
- 20 la cepa también expresa una tioesterasa y/o una enzima de degradación de ácidos grasos. Por ejemplo, en ocasiones en las que los ácidos grasos libres son productos no deseados de un procedimiento de producción de ésteres grasos, los ácidos grasos libres pueden convertirse en ésteres grasos usando las éster sintasas, las variantes, las células huésped y los microorganismos y los métodos en el presente documento. Adicionalmente, la expresión de una éster sintasa que puede catalizar la producción directa de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos tales como ésteres grasos en una célula huésped recombinante puede usarse cuando no hay expresión de tioesterasa o es baja.

El término "tioesterasa" se refiere a una enzima que tiene actividad tioesterasa. Las tioesterasas incluyen tioéster hidrolasas, que se identifican como miembros de la clasificación de enzimas E.C. 3.1.2 y pueden obtenerse a partir de una variedad de fuentes. Se describen tioesterasas vegetales, por ejemplo, en Voelker & Davies, *J. Bact.*, 176 (23): 7320-27 (1994), las patentes estadounidenses n.ºs 5.667.997 y 5.455.167. También pueden obtenerse tioesterasas a partir de fuentes microbianas, tales como las descritas en Akoh *et al.*, *Prog. Lipid Res.*, 43(6):534-52 (2004); Diczfalusy & Alexson, *Arch. Biochem. Biophys.*, 334(1):104-12 (1996); Larson & Kolattukudy, *Arch. Biochem. Biophys.*, 237(1):27-37(1985); Lawson *et al.*, *Biochemistry* 33(32):9382-88 (1994); Lee *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 184 (1):21-28 (1989); Naggert *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266(17):11044-50 (1991); Nie *et al.*, *Biochemistry*, 47 (29):7744-51 (2008); Seay & Lueking, *Biochemistry* 25(9): 2480-85 (1986); Spencer *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 253(17):5922-26 (1978); y Zhuang *et al.*, *Biochemistry* 47(9):2789-96 (2008). También pueden obtenerse tioesterasas a partir, por ejemplo, de fuentes de cianobacterianas, algas, mamíferos, insectos y fúngicas. Una tioesterasa puede tener actividad distinta de actividad tioesterasa, por ejemplo actividad proteolítica o actividad de hidrólisis de éster de oxígeno. Una tioesterasa particularmente útil es la enzima 'TesA (también denominada "tioesterasa I" o "tioesterasa sin secuencia líder") de *E. coli*, que es una versión truncada de la enzima serina tioesterasa TesA de longitud completa que se describe en Cho & Cronan, *J. Biol. Chem.*, 268(13): 9238-45 (1992). Un polipéptido de 'TesA de *E. coli* comprende 182 aminoácidos, y es el producto de una reacción de escisión en la que se elimina la secuencia líder de 26 aminoácidos de TesA de *E. coli*.

El término "actividad tioesterasa" se refiere a la capacidad para catalizar una reacción de escisión de tioéster, que implica habitualmente la hidrólisis de un tioéster en un grupo tiol para dar un ácido y un tiol, pero también puede incluir una etapa de transesterificación en la que se escinde un enlace tioéster y se forma un nuevo enlace éster. En general, una acil-ACP tioesterasa puede catalizar la escisión hidrolítica de tioésteres de acil graso-proteína portadora de acilo y/o tioésteres de acil graso-CoA. Los ejemplos de enzimas que tienen actividad tioesterasa incluyen acetil-CoA hidrolasa, palmitoil-CoA hidrolasa, succinil-CoA hidrolasa, formil-CoA hidrolasa, acil-CoA hidrolasa, palmitoil-proteína tioesterasa y ubiquitin tioesterasa. La actividad tioesterasa puede establecerse mediante cualquiera de los siguientes ensayos:

#### *Ensayo de hidrólisis de acil-CoA:*

Se usan un tampón Tris-HCl, 0,1 M, pH 8,0; palmitoil-CoA, 5 µM; DTNB, 0,01 M en tampón fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,0 para preparar una mezcla de ensayo completa. La mezcla de ensayo contiene por tanto una concentración final de 10 µmol de tampón Tris-HCl, pH 8,0, 0,05 µmol de DTNB y 0,01 µmol de palmitoil-CoA. Entonces se mezcla la mezcla de ensayo completa con la tioesterasa, en un volumen final de 2,0 ml. Se mide la tasa de escisión del sustrato acil-CoA monitorizando el cambio en absorbancia a 412 nm, usando un coeficiente de extinción molar de 13.600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

#### *Ensayo in vivo:*

5 Tras la expresión de la proteína de interés, se acidifica el cultivo, que tiene posiblemente actividad tioesterasa, con HCl 1 N hasta un pH final de aproximadamente 2,5 y luego se extrae con un volumen igual de acetato de butilo. Se derivatizan los ácidos grasos libres en la fase orgánica con BSTFA (N,O-bis(trimetil(silil)trifluoroacetamida) y TMCS al 1% (trimetilclorosilano) para generar los respectivos ésteres de TMS (trimetilsililo), que entonces se analizan en un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama.

*Ensayo de 4-MU-6S-Palm-βGlc:*

10 En primer lugar se prepara una disolución de sustrato de 20 μl. La disolución de sustrato contiene MU-6S-Palm-β-Glc 0,64 mM, ditiotreitól 15 mM, Triton X-100 al 0,375% (p/v) y 0,1 U de β-glucosidasa de almendras en tampón fosfato/citrato de Mcllvain, pH 4,0. Entonces se mezcla una mezcla de cultivo que tiene posiblemente actividad tioesterasa con la disolución de sustrato. Se incuba la mezcla de reacción durante 1 hora a 37°C. Se añade β-glucosidasa de almendras exógena para hidrolizar el producto intermedio de reacción, MU-6-tio-β-glucósido, cuantitativamente. Se termina la reacción de hidrólisis mediante la adición de 200 μl de carbonato de sodio 0,5 M, pH 10,7, que contiene Triton X-100 al 0,025%, y se mide la fluorescencia de la 4-metilumbeliferona (MU) liberada en un fluorómetro ( $\lambda_{\text{ex}} = 372$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 445$  nm).

15 *Ensayo de lisofosfolipasa:*

20 Se prepara una mezcla de reacción que contiene 10 μl de una mezcla de cultivo que tiene posiblemente actividad tioesterasa mezclada con 10 μl de 1-oleoil-fosfatidiletanolamina 3 mM, 25 μl de Tris-HCl 100 mM (pH 7,0) y 5 μl de EDTA 5 mM. Se termina la reacción con la adición de 1,5 ml de CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (1:2), seguido por la adición de agua para llevar el volumen acuoso total hasta 0,9 ml. Entonces se analiza la fase orgánica mediante cromatografía en capa fina junto con patrones adecuados, usando placas preparadas a partir de 40 g de gel de sílice H suspendido en 95 ml de tetraborato de sodio 1 mM. El sistema de disolventes consiste en CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (95:35:5).

*Ensayo de sustrato de proteasa:*

25 Se prepara una mezcla de reacción que contiene 10 μl de una mezcla de cultivo que tiene posiblemente actividad tioesterasa mezclada con 800 μl de Tris-HCl 12,5 mM (pH 8,0) que contiene Triton X-100 al 0,25% y 10 μl de Cbz-Phe-ONp disuelto en DMSO. Se mide el p-nitrofenol liberado por medio de escisión del sustrato monitorizando la absorbancia a 405 nm.

*Ensayo de hidrólisis de acil graso-PNP:*

30 Se prepara en primer lugar una disolución de reactivo que contiene Triton X-100 al 2% en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0 y C<sub>12</sub>-p-nitrofenol 10 mM (acil-PNP) en acetona. Entonces se prepara una disolución de trabajo de C<sub>12</sub>-PNP mezclando 600 μl de C<sub>12</sub>-PNP 10 mM en 9,4 ml de tampón fosfato. Se realiza el ensayo añadiendo 40 μl de la disolución de trabajo de acil-PNP a cada pocillo de una placa de 96 pocillos, seguido por la adición rápida de 40 ml de la mezcla de cultivo que tiene posiblemente actividad tioesterasa. Se mezcla la disolución durante 15 segundos, y se lee el cambio de absorbancia a 405 nm en un lector de placas de microtitulación a 25°C.

*Formación de éster a partir de tioéster:*

35 Se prepara una mezcla de reacción que contiene una mezcla de cultivo que tiene posiblemente actividad tioesterasa, miristoil-CoA 100 μM, metanol al 10% (v/v) y fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0. Se incuba la mezcla de reacción durante 1 hora a 20°C y se termina con la adición de HCl 1 N para disminuir el pH hasta aproximadamente 2,5. Se extrae la mezcla con un volumen igual de acetato de etilo y se determina la cantidad de éster graso producido por medio de CG-EM u otros métodos convencionales tales como CG-FID, CL-EM o cromatografía en capa fina.

*Formación de éster a partir de éster:*

45 Se prepara una mezcla de reacción que contiene una mezcla de cultivo que tiene posiblemente actividad tioesterasa, lauroil-CoA 300 μM, metanol al 10% (v/v) y fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0. Se incuba la mezcla de reacción durante 1 hora a 20°C y se termina con la adición de HCl 1 N para disminuir el pH hasta aproximadamente 2,5. Se extrae la mezcla con un volumen igual de acetato de etilo y se determina la cantidad de éster laurílico producido por medio de CG-EM u otros métodos convencionales tales como CG-FID, CL-EM o cromatografía en capa fina.

50 Por tanto, puede atenuarse y/o deleccionarse funcionalmente una tioesterasa endógena de las células huésped de la presente invención. En determinadas realizaciones la tioesterasa se selecciona del grupo que consiste en *tesA*, *'tesA*, *fatB1*, *fatB2*, *fatB3*, *fatA1*, *fatA* y *atfata*. En la tabla 1 se enumeran ejemplos no limitativos de tioesterasas y células huésped.

Tabla 1: Tioesterasas

Número de registro	Organismo fuente	Gen
AAC73596	<i>E. coli</i>	<i>tesA</i> sin secuencia líder
AAC73555	<i>E. coli</i>	<i>tesB</i>
Q41635, AAA34215	<i>Umbellularia californica</i>	<i>fatB</i>
AAC49269	<i>Cuphea hookeriana</i>	<i>fatB2</i>
Q39513; AAC72881	<i>Cuphea hookeriana</i>	<i>fatB3</i>
Q39473; AAC49151	<i>Cinnamomum camphorum</i>	<i>fatB</i>
CAA85388	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>fatB</i> [M141T]*
NP 189147; NP 193041	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>fatA</i>
CAC39106	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>fatA</i>
AAC72883	<i>Cuphea hookeriana</i>	<i>fatA</i>
AAL79361	<i>Helianthus annuus</i>	<i>fatA1</i>

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

5 En otros casos, se producen ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos en una célula huésped que contiene una o más mutaciones que se producen de manera natural que dan como resultado un nivel aumentado de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos en la célula huésped. En algunos casos, la célula huésped se modifica por ingeniería genética para aumentar el nivel de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos en la célula huésped en relación con una célula huésped silvestre correspondiente. Por ejemplo, la célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para expresar un nivel reducido de una enzima de degradación de ácidos grasos tal como una acil-CoA sintasa en relación con una célula huésped silvestre correspondiente. En una realización, el nivel de expresión de uno o más genes (por ejemplo, un gen de acil-CoA sintasa) se atenúa o se deleciona funcionalmente modificando por ingeniería genética una célula huésped "deficiente".

10 Puede reducirse o deleccionarse funcionalmente cualquier gen conocido de acil-CoA sintasa en una célula huésped. Los ejemplos no limitativos de genes de acil-CoA sintasa incluyen *fadD*, *fadK*, *BH3103*, *yhfL*, *Pfl-4354*, *EAV15023*, *fadD1*, *fadD2*, *RPC\_4074*, *fadDD35*, *fadDD22*, *faa3p* o el gen que codifica para la proteína ZP\_01644857. Los ejemplos específicos de genes de acil-CoA sintasa incluyen *fadDD35* de *M. tuberculosis* H37Rv [NP\_217021], *fadDD22* de *M. tuberculosis* H37Rv [NP\_217464], *fadD* de *E. coli* [NP\_416319], *fadK* de *E. coli* [YP\_416216], *fadD* de *Acinetobacter* sp. ADP1 [YP\_045024], *fadD* de *Haemophilus influenzae* RdkW20 [NP\_438551], *fadD* de *Rhodopseudomonas palustris* Bis B18 [YP\_533919], *BH3101* de *Bacillus halodurans* C-125 [NP\_243969], *Pfl-4354* de *Pseudomonas fluorescens* Pfo-1 [YP\_350082], *EAV15023* de *Comamonas testosterone* KF-1 [ZP\_01520072], *yhfL* de *B. subtilis* [NP\_388908], *fadD1* de *P. aeruginosa* PAO1 [NP\_251989], *fadD1* de *Ralstonia solanacearum* GM1 1000 [NP\_520978], *fadD2* de *P. aeruginosa* PAO1 [NP\_251990], el gen que codifica para la proteína ZP\_01644857 de *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3, *faa3p* de *Saccharomyces cerevisiae* [NP\_012257], *fallp* de *Saccharomyces cerevisiae* [NP\_014962], *lcfA* de *Bacillus subtilis* [CAA99571], o los descritos en Shockey *et al.*, Plant. Physiol. 129:1710-1722 (2002); Caviglia *et al.*, J. Biol. Chem. 279:1163-1169 (2004); Knoll *et al.*, J. Biol. Chem. 269(23):16348-56 (1994); Johnson *et al.*, J. Biol. Chem. 269: 18037-18046 (1994); y Black *et al.*, J. Biol. Chem. 267: 25513-25520 (1992).

15 Los sustratos de alcohol pueden suministrarse a las células huésped. En realizaciones alternativas, cuando se usan alcoholes grasos como sustratos, los sustratos de alcohol graso pueden prepararse por la célula huésped coexpresando uno o más genes de biosíntesis de aldehídos grasos y/o uno o más genes de biosíntesis de alcoholes grasos. Pueden introducirse genes de biosíntesis de aldehídos grasos heterólogos en la célula huésped, o pueden modificarse genes de biosíntesis de aldehídos grasos endógenos de manera que se sobreexpresan en la célula huésped. Los genes de biosíntesis de aldehídos grasos adecuados incluyen, sin limitación, los que codifican para ácido carboxílico reductasas y variantes, por ejemplo, de una cualquiera de SEQ ID NO: 54-97. También pueden introducirse genes de biosíntesis de alcoholes grasos heterólogos en la célula huésped, o pueden modificarse genes de biosíntesis de alcoholes grasos endógenos de manera que se sobreexpresan en la célula huésped. Los genes de biosíntesis de alcoholes grasos adecuados incluyen, sin limitación, los que codifican para alcohol deshidrogenasas y variantes, por ejemplo, de una cualquiera de SEQ ID NO: 98-147. Pueden prepararse sustratos de alcohol graso por la célula huésped coexpresando uno o más genes de acil-ACP reductasa y/o uno o más genes de biosíntesis de alcoholes grasos. Pueden introducirse genes de acil-ACP reductasa heterólogos en la célula huésped, o pueden modificarse genes de acil-ACP reductasa endógenos de manera que se sobreexpresan en la célula huésped. Los genes de acil-ACP reductasa adecuados incluyen, sin limitación, los que codifican para acil-ACP reductasas y variantes, por ejemplo, de una cualquiera de SEQ ID NO: 148-156. Métodos, células huésped y microorganismos de producción de alcoholes grasos se han descrito previamente, por ejemplo, en la publicación de patente internacional n. ° WO/2010/042664.

20 Los polipéptidos de éster sintasa y variantes pueden catalizar la conversión de un ácido graso libre en un éster graso en presencia de sustratos de alcohol adecuados. Por consiguiente, cuando un ácido graso libre no es un producto deseado, los polipéptidos de éster sintasa y variantes de la invención pueden usarse para reducir la cantidad de ácido graso libre generado durante la producción de ésteres grasos convirtiéndolos en ésteres grasos.

Formación de ácidos grasos ramificados y/o derivados de ácidos grasos

5 Pueden producirse ácidos grasos y derivados de los mismos que contienen puntos de ramificación usando tioéster ramificado y/o alcohol ramificado como sustratos. Por ejemplo, aunque *E. coli* produce de manera natural ácidos grasos de cadena lineal (sFA), puede modificarse por ingeniería genética *E. coli* para producir ácidos grasos de cadena ramificada (brFA) y/o derivados de brFA introduciendo y expresando o sobreexpresando genes heterólogos que proporcionan precursores ramificados en la *E. coli* (por ejemplo, familias de genes *bkd*, *ilv*, *icm* y *fab*). Adicionalmente, puede modificarse por ingeniería genética una célula huésped para expresar o sobreexpresar genes que codifican para proteínas para la elongación de brFA (por ejemplo, ACP, FabF, etc.) o derivados, y/o para delectonar o atenuar los genes correspondientes de la célula huésped que conducen normalmente a ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos de cadena lineal.

15 La primera etapa en la formación de brFA o derivados de brFA es la producción de los  $\alpha$ -cetoácidos correspondientes mediante una aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa. Las células huésped pueden incluir de manera endógena genes que codifican para tales enzimas o tales genes pueden introducirse de manera recombinante o heteróloga. *E. coli*, por ejemplo, expresa de manera endógena una enzima de este tipo, IlvE (EC 2.6.1.42; número de registro de GenBank YP\_026247). En algunas células huésped, puede no expresarse una aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa heteróloga. Sin embargo, IlvE de *E. coli* o cualquier otra aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa (por ejemplo, IlvE de *Lactococcus lactis* (registro de GenBank AAF34406), IlvE de *Pseudomonas putida* (número de registro de GenBank NP\_745648) o IlvE de *Streptomyces coelicolor* (número de registro de GenBank NP\_629657)), si no es endógena, puede introducirse.

20 La producción de  $\alpha$ -cetoácidos puede lograrse usando los métodos descritos en Atsumi *et al.*, Nature 451:86-89 (2008). Por ejemplo, puede producirse 2-cetoisovalerato sobreexpresando los genes que codifican para IlvI, IlvH, IlvC o IlvD. En otro ejemplo, puede producirse 2-ceto-3-metil-valerato sobreexpresando los genes que codifican para IlvA y IlvI, IlvH (o AlsS de *Bacillus subtilis*), IlvC, IlvD o sus homólogos correspondientes. Puede producirse 2-ceto-4-metil-pentanoato sobreexpresando los genes que codifican para IlvI, IlvH, IlvC, IlvD y LeuA, LeuB, LeuC, LeuD, o sus homólogos correspondientes.

30 La segunda etapa es la descarboxilación oxidativa de los  $\alpha$ -cetoácidos para dar la correspondiente acil-CoA de cadena ramificada. Esta reacción puede catalizarse por un complejo de  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa (*bkd*; EC 1.2.4.4.) (Denoya *et al.*, J. Bacteriol. 177:3504, (1995), que consiste en las subunidades E1 $\alpha$ / $\beta$  (descarboxilasa), E2 (dihidrolipoil transacilasa) y E3 (dihidrolipoil deshidrogenasa). Estos complejos de  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa son similares a complejos de piruvato y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa. Puede usarse cualquier microorganismo que comprenda brFA y/o componentes celulares de brFA y/o pueda crecer sobre aminoácidos de cadena ramificada como fuente para aislar genes *bkd* para su expresión en células huésped, 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, número de registro de GenBank NP\_414658). Por tanto, puede ser suficiente expresar sólo los genes E1  $\alpha$ / $\beta$  y E2 *bkd*. La tabla 2 enumera ejemplos no limitativos de genes *bkd* de varios microorganismos que pueden introducirse y expresarse de manera heteróloga o recombinante en una célula huésped para proporcionar precursores de acil-CoA de cadena ramificada.

Tabla 2: Genes *Bkd* de microorganismos seleccionados

Organismo	Gen	N.º de registro de GenBank
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>bkdA1</i> (E1 $\alpha$ ) <i>bkdB1</i> (E1 $\beta$ ) <i>bkdC1</i> (E2)	NP_628006 NP_628005 NP_638004
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>bkdA2</i> (E1 $\alpha$ ) <i>bkdB2</i> (E1 $\beta$ ) <i>bkdC2</i> (E2)	NP_733618 NP_628019 NP_628018
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>bkdA</i> (E1 $\alpha$ ) <i>bkdB</i> (E1 $\beta$ ) <i>bkdC</i> (E2)	BAC72074 BAC72075 BAC72076
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>bkdF</i> (E1 $\alpha$ ) <i>bkdG</i> (E1 $\beta$ ) <i>bkdH</i> (E2)	BAC72088 BAC72089 BAC72090
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>bkdAA</i> (E1 $\alpha$ ) <i>bkdAB</i> (E1 $\beta$ ) <i>bkdB</i> (E2)	NP_390288 NP_390288 NP_390288
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>bkdA1</i> (E1 $\alpha$ ) <i>bkdA2</i> (E1 $\beta$ ) <i>bkdC</i> (E2)	AAA65614 AAA65615 AAA65617

40 En otro ejemplo, puede prepararse isobutiril-CoA en una célula huésped, por ejemplo en *E. coli*, a través de la coexpresión de una crotonil-CoA reductasa (Ccr, EC 1.6.5.5, 1.1.1.1) e isobutiril-CoA mutasa (subunidad grande

IcmA, EC 5.4.99.2; subunidad pequeña IcmB, EC 5.4.99.2) (Han y Reynolds, J. Bacteriol. 179:5157 (1997)). Crotonil-CoA es un producto intermedio en la biosíntesis de ácidos grasos en *E. coli* y otros microorganismos. En la tabla 3 se enumeran ejemplos no limitativos de genes *ccr* e *icm* de microorganismos seleccionados.

Tabla 3: Genes *ccr* e *icm* de microorganismos seleccionados

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

5 Además de la expresión de los genes *bkd*, el inicio de la biosíntesis de brFA usa proteína portadora de  $\beta$ -cetoacil-acilo sintasa III (FabH, EC 2.3.1.41) con especificidad por acil-CoA de cadena ramificada (Li *et al.*, J. Bacteriol. 187:3795-3799, 2005). En la tabla 4 se enumeran ejemplos no limitativos de enzimas FabH. Pueden expresarse en una célula huésped genes *fabH* que están implicados en la biosíntesis de ácidos grasos de cualquier microorganismo u organismo que contiene brFA. Las enzimas Bkd y FabH de células huésped que no preparan de manera natural brFA no pueden respaldar la producción de brFA. Por tanto, *bkd* y *fabH* pueden expresarse de manera recombinante o heteróloga. Pueden insertarse vectores que contienen los genes *bkd* y/o *fabH* en una célula huésped de este tipo. De manera similar, el nivel endógeno de la producción de Bkd y FabH puede no ser suficiente para producir brFA. En este caso, pueden sobreexpresarse el *bkd* y/o *fabH* endógenos. O el *bkd* y/o *fabH* endógenos pueden delecionarse funcionalmente y reemplazarse por un *bkd* y/o *fabH* heterólogos. Preferiblemente, el *bkd* y/o *fabH* heterólogos que se introducen en una célula huésped codifican para enzimas BKD y/o FabH más eficaces que las codificadas por el *bkd* y/o *fabH* endógenos. Adicionalmente, pueden expresarse o sobreexpresarse otros componentes de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos, tales como proteínas portadoras de acilo (ACP) y proteína portadora de  $\beta$ -cetoacil-acilo sintasa II (*fabF*, EC 2.3.1.41) (en la tabla 4 se enumeran ejemplos no limitativos). Además de expresar estos genes, algunos genes en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos endógena pueden atenuarse en la célula huésped (por ejemplo, los genes de *E. coli* *fabH* (n.º de registro de GenBank NP\_415609) y/o *fabF* (n.º de registro de GenBank NP\_415613)).

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

#### Formación de ácidos grasos cíclicos y/o derivados de ácidos grasos

25 Pueden producirse ácidos grasos cíclicos y/o derivados de los mismos tales como, por ejemplo, ésteres grasos cíclicos, usando sustratos cíclicos adecuados. Para producir sustratos cíclicos, pueden introducirse genes que proporcionan precursores cíclicos (por ejemplo, las familias de genes *ans*, *chc* y *plm*) en la célula huésped y expresarse para permitir el inicio de la biosíntesis de ácidos grasos a partir de precursores cíclicos. Por ejemplo, para convertir una célula huésped, tal como *E. coli*, en una que puede sintetizar derivados de ácidos grasos  $\omega$ -cíclicos (cyFA), puede introducirse un gen que proporciona el precursor cíclico ciclohexilcarbonil-CoA (CHC-CoA) (Cropp *et al.*, Nature Biotech. 18:980-983, (2000)) y expresarse en la célula huésped. Los ejemplos no limitativos de genes que proporcionan CHC-CoA en *E. coli* incluyen: *ansJ*, *ansK*, *ansL*, *chcA* y *ansM* de la agrupación de genes de ansatrienina de *Streptomyces collinus* (Chen *et al.*, Eur. J. Biochem. 261: 98-107, (1999)) o *plmJ*, *plmK*, *plmL*, *chcA* y *plmM* de la agrupación de genes de foslactomicina B de *Streptomyces* sp. HK803 (Palaniappan *et al.*, J. Biol. Chem. 278:35552-35557, (2003)) junto con el gen *chcB* (Patton *et al.*, Biochem. 39:7595-7604, (2000)) de *S. collinus*, *S. avermitilis* o *S. coelicolor* (véase la tabla 5). Los genes enumerados en la tabla 4 pueden expresarse entonces para

permitir el inicio y la elongación de ácidos grasos  $\omega$ -cíclicos. Alternativamente, pueden aislarse los genes homólogos de microorganismos que fabrican cyFA y expresarse en una célula huésped (por ejemplo, *E. coli*).

Tabla 5: Genes para la síntesis de CHC-CoA

Organismo	Gen	N.º de registro de GenBank
<i>Streptomyces collinus</i>	<i>ansJK</i>	U72144*
	<i>ansL</i> <i>chcA</i> <i>ansM</i> <i>chcB</i>	AF268489
<i>Streptomyces</i> sp. HK803	<i>pmIJK</i>	AAQ84158
	<i>pmLL</i>	AAQ84159
	<i>chcA</i>	AAQ84160
	<i>pmIM</i>	AAQ84161
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>chcB/caiD</i>	NP_629292
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>chcB/caiD</i>	NP_629292

\*Sólo se indica *chcA* como entrada en GenBank U72144, *ansJKLM* son según Chen *et al.* (Eur. J. Biochem. 261:98-107, 1999).

Los genes enumerados en la tabla 4, anterior (*fabH*, *ACP* y *fabF*) permiten el inicio y la elongación de ácidos grasos  $\omega$ -cíclicos porque tienen una amplia especificidad de sustrato. Si la coexpresión de cualquiera de estos genes con los genes enumerados en la tabla 5 no proporciona cyFA, entonces pueden aislarse homólogos de *fabH*, *ACP* y/o *fabF* de microorganismos que fabrican cyFA (por ejemplo, los enumerados en la tabla 6) (por ejemplo, usando cebadores de PCR degenerados o sondas de secuencias de ADN heterólogas) y coexpresarse.

Tabla 6: Ejemplos no limitativos de microorganismos que contienen ácidos grasos  $\omega$ -cíclicos

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

\*Usa cicloheptilcarbonil-CoA y no ciclohexilcarbonil-CoA como precursor para la biosíntesis de cyFA.

#### Niveles de saturación de ácidos grasos y derivados de ácidos grasos

El grado de saturación en ácidos grasos y/o derivados de los mismos puede controlarse regulando el grado de saturación de productos intermedios. Por ejemplo, las familias de genes *sfa*, *gns* y *fab* pueden expresarse, sobreexpresarse o expresarse a niveles reducidos para controlar la saturación de ácidos grasos. Los genes a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, *fabB* (EC 2.3.1.41), *fabK* (EC 1.3.1.9), *fabL* (EC 1.3.1.9), *fabM* (EC 4.2.1.17), que pueden usarse en los métodos y las células huésped descritos en el presente documento.

Por ejemplo, pueden modificarse por ingeniería genética células huésped para producir ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos insaturados modificando por ingeniería genética el huésped de producción para sobreexpresar *fabB* o haciendo crecer el huésped de producción a bajas temperaturas (por ejemplo, menos de 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* da como resultado la producción de un porcentaje significativo de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos insaturados (de Mendoza *et al.*, J. Biol. Chem. 258:2098-2101 (1983)). El gen *fabB* puede insertarse y expresarse en células huésped que no tienen de manera natural el gen. Estos ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos insaturados pueden usarse entonces como productos intermedios en células huésped.

En otros casos, puede delecionarse un represor de la biosíntesis de ácidos grasos, por ejemplo, *fabR* (n.º de registro de GenBank NP\_418398), lo que también dará como resultado un aumento de la producción de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos insaturados en *E. coli* (Zhang *et al.*, J. Biol. Chem. 277:15558 (2002)). Pueden hacerse delecciones similares en otras células huésped. Puede lograrse un aumento adicional en ácidos grasos insaturados, por ejemplo, mediante la sobreexpresión de *fabM* (trans-2, cis-3-decenoil-ACP isomerasa, n.º de registro de GenBank DAA05501) y la expresión controlada de *fabK* (trans-2-enoil-ACP reductasa II, n.º de registro de GenBank NP\_357969) a partir de *Streptococcus pneumoniae* (Marrakchi *et al.*, J. Biol. Chem. 277: 44809 (2002)), al mismo tiempo que se deleciona *fabI* de *E. coli* (trans-2-enoil-ACP reductasa, n.º de registro de GenBank NP\_415804). En algunos ejemplos, el gen *fabF* endógeno puede atenuarse, amentando así el porcentaje de palmitoleato (C16:1) producido.

Aún en otros ejemplos, pueden modificarse por ingeniería genética células huésped para producir ácidos grasos saturados reduciendo la expresión de un gen *sfa*, *gns* o *fab*.

Por ejemplo, puede modificarse por ingeniería genética una célula huésped para expresar un nivel disminuido de *fabA* y/o *fabB*. En algunos casos, la célula huésped puede hacerse crecer en presencia de ácidos grasos insaturados. En otros casos, la célula huésped puede modificarse por ingeniería genética adicionalmente para expresar o sobreexpresar un gen que codifica para una enzima desaturasa. Un ejemplo no limitativo de una desaturasa es DesA de *B. subtilis* (AF037430). En la técnica se conocen otros genes que codifican para enzimas desaturasa y pueden usarse en las células huésped y los métodos descritos en el presente documento, tales como desaturasas que usan acil-ACP, tal como hexadecanoil-ACP u octadecanoil-ACP.

#### Modificación por ingeniería genética de células huésped para producir ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos

Pueden usarse diversas células huésped para producir ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos, tal como se describe en el presente documento. Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido descrito en el presente documento puede expresarse en células bacterianas (tales como *E. coli*), células de insecto, células de levadura o de mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, células VERO, células BHK, células HeLa, células Cv1, células MDCK, células 293, células 3T3 o células PC12). Otras células huésped a modo de ejemplo incluyen células de los miembros del género *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Chrysosporium*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia* o *Streptomyces*. Aún otras células huésped a modo de ejemplo pueden ser una célula de *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor michei*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces murinus* o *Actinomycetes*. Otras células huésped son células huésped de cianobacterias.

La célula huésped puede ser una célula de *E. coli* célula, una célula de *Saccharomyces cerevisiae* o una célula de *Bacillus subtilis*. La célula huésped puede ser de las cepas de *E. coli* B, C, K o W. Los expertos en la técnica conocen otras células huésped adecuadas.

Pueden usarse diversos métodos bien conocidos en la técnica para modificar por ingeniería genética células huésped para producir ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos. Los métodos pueden incluir el uso de vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de éster sintasa descrito en el presente documento, variante de polipéptido, o un fragmento del mismo. Los expertos en la técnica apreciarán que pueden usarse una variedad de vectores virales (por ejemplo, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales y vectores virales adenoasociados) y vectores no virales en los métodos descritos en el presente documento.

Los vectores de expresión recombinante descritos en el presente documento incluyen un ácido nucleico descrito en el presente documento en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped. Los vectores de expresión recombinantes pueden incluir una o más secuencias de control, seleccionadas basándose en la célula huésped que va a usarse para la expresión. La secuencia de control está operativamente unida a la secuencia de ácido nucleico que va a expresarse. Tales secuencias de control se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Las secuencias de control incluyen aquéllas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y aquéllas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en determinadas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que va a transformarse, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los vectores de expresión descritos en el presente documento pueden introducirse en células huésped para producir polipéptidos, incluyendo polipéptidos de fusión, codificados por los ácidos nucleicos tal como se describe en el presente documento.

Pueden diseñarse vectores de expresión recombinante para la expresión de un polipéptido de biosíntesis de ácidos grasos o variante en células procariotas o eucariotas (por ejemplo, células bacterianas, tales como *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, usando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamífero). Se comentan adicionalmente células huésped adecuadas en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Alternativamente, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo, usando secuencias reguladoras de promotor de T7 y polimerasa de T7.

La expresión de polipéptidos en procariotas, por ejemplo, *E. coli*, se lleva a cabo con la mayor frecuencia con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de polipéptidos o bien de fusión o bien no de fusión. Los vectores de fusión añaden varios aminoácidos a un polipéptido codificado en los mismos, habitualmente en el extremo amino-terminal del polipéptido recombinante. Tales vectores de fusión sirven normalmente para tres fines: (1) aumentar la expresión del polipéptido recombinante; (2) aumentar la solubilidad del polipéptido recombinante; y (3) ayudar en la purificación del polipéptido recombinante actuando como ligando en la

purificación por afinidad. Con frecuencia, en vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y el polipéptido recombinante. Esto permite la separación del polipéptido recombinante del resto de fusión tras la purificación del polipéptido de fusión. Los ejemplos de tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento relacionadas, incluyen factor Xa, trombina y enterocinasa. Los vectores de expresión de fusión a modo de ejemplo incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith *et al.*, Gene 67:31-40 (1988)), pMAL (New England Biolabs, Ipswich, M.A.) y pRITS (Pharmacia, Piscataway, NJ), que fusionan glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E o proteína A, respectivamente, al polipéptido recombinante diana.

Los ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* inducibles, no de fusión, incluyen pTrc (Amann *et al.*, Gene 69:301-315 (1988)) y pET 11d (Studier *et al.*, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 60-89 (1990)). La expresión génica diana a partir del vector pTrc se basa en la transcripción de ARN polimerasa del huésped a partir de un promotor de fusión de trp-lac híbrido. La expresión génica diana a partir del vector pET 11d se basa en la transcripción de un promotor de fusión de gn10-lac de T7 mediada por una ARN polimerasa viral coexpresada (gn1 de T7). Esta polimerasa viral se suministra por cepas huésped BL21(DE3) o HMS174(DE3) a partir de un profago  $\lambda$  residente que aloja un gen gn1 de T7 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5.

Una estrategia para maximizar la expresión de polipéptido recombinante es expresar el polipéptido en una célula huésped con una capacidad alterada para escindir proteolíticamente el polipéptido recombinante (véase Gottesman, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 119-128 (1990)). Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico que va a insertarse en un vector de expresión de modo que los codones individuales para cada aminoácido son los usados preferiblemente en la célula huésped (Wada *et al.*, Nucleic Acids Res. 20:2111-2118 (1992)). Tal alteración de secuencias de ácido nucleico puede llevarse a cabo mediante técnicas de síntesis de ADN convencionales.

La célula huésped puede ser una célula de levadura. El vector de expresión puede ser un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores para la expresión en levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari *et al.*, EMBO J. 6:229-234 (1987)), pMFa (Kurjan *et al.*, Cell 30:933-943 (1982)), pJRY88 (Schultz *et al.*, Gene 54:113-123 (1987)), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) picZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA) y pRS425 (Christianson *et al.*, Gene 110:119-122 (1992)).

Alternativamente, puede expresarse un polipéptido descrito en el presente documento en células de insecto usando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto en cultivo (por ejemplo, células Sf9) incluyen, por ejemplo, la serie pAc (Smith *et al.*, Mol. Cell Biol. 3:2156-2165 (1983)) y la serie pVL (Lucklow *et al.*, Virology 170:31-39 (1989)).

En aún otra realización, los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden expresarse en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero. Los ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed, Nature 329:840 (1987)) y pMT2PC (Kaufman *et al.*, EMBO J. 6:187-195 (1987)). Cuando se usan en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión pueden proporcionarse por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores habitualmente usados se derivan de polioma, adenovirus 2, citomegalovirus y virus del simio 40. Otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procariotas como eucariotas se describen en los capítulos 16 y 17 de Sambrook *et al.*, eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

Pueden introducirse vectores en células procariotas o eucariotas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Tal como se usan en el presente documento, los términos "transformación" y "transfección" se refieren a una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico foráneo (por ejemplo, ADN) en una célula huésped, incluyendo coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. Pueden encontrarse métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (citado anteriormente).

Para la transformación estable de células bacterianas, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transformación usados, sólo una pequeña fracción de células captarán y replicarán el vector de expresión. Con el fin de identificar y seleccionar estos transformantes, puede introducirse un gen que codifica para un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) en las células huésped junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables incluyen los que confieren resistencia a fármacos, tales como ampicilina, canamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Pueden introducirse ácidos nucleicos que codifican para un marcador seleccionable en una célula huésped en el mismo vector que el que codifica para un polipéptido descrito en el presente documento o pueden introducirse en un vector separado. Pueden identificarse células transfectadas de manera estable con el ácido nucleico introducido mediante selección con fármaco (por ejemplo, las células que han incorporado el gen de marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

Para una transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección usados, sólo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN foráneo en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, puede introducirse un gen que codifica para un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) en las células huésped junto con el gen de interés. Los

5 marcadores seleccionables preferidos incluyen aquéllos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Pueden introducirse ácidos nucleicos que codifican para un marcador seleccionable en una célula huésped en el mismo vector que el que codifica para un polipéptido descrito en el presente documento o pueden introducirse en un vector separado. Pueden identificarse las células transfectadas de manera estable con el ácido nucleico introducido mediante selección con fármaco (por ejemplo, las células que han incorporado el gen de marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

#### Proteínas de transporte

10 Las proteínas de transporte pueden exportar polipéptidos (por ejemplo, éster sintasa) y compuestos orgánicos (por ejemplo, ácidos grasos, derivados de ácidos grasos) fuera de una célula huésped. Muchas proteínas de transporte y eflujo sirven para excretar una amplia variedad de compuestos y pueden modificarse de manera natural para ser selectivas para tipos particulares de hidrocarburos.

15 Ejemplos no limitativos de proteínas de transporte adecuadas son proteínas de transporte de casete de unión a ATP (ABC), proteínas de eflujo y proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP). Los ejemplos no limitativos adicionales de proteínas de transporte adecuadas incluyen las proteínas de transporte de ABC de organismos tales como *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Alkaligenes eutrophus* y *Rhodococcus erythropolis*. Las proteínas de transporte de ABC a modo de ejemplo que pueden usarse incluyen sin limitación CER5, AtMRP5, AmiS2, AtPGP1, AcrA, AcrB, TolC, AcrE, AcrF, tll1618, tell1619 y tll0139. También pueden elegirse células huésped por su capacidad endógena para secretar compuestos orgánicos. La eficacia de la producción de compuestos orgánicos y secreción en el entorno de la célula huésped (por ejemplo, medio de cultivo, caldo de fermentación) puede expresarse como una razón de producto intracelular con respecto a producto extracelular. En algunos ejemplos, la razón puede ser de aproximadamente 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 ó 1:5.

#### Fermentación

25 La producción y el aislamiento de ácidos grasos y/o derivados de los mismos producidos según la presente divulgación pueden potenciarse empleando técnicas de fermentación beneficiosas. Un método para maximizar la producción al tiempo que se reducen los costes es aumentar el porcentaje de la fuente de carbono que se convierte en productos hidrocarbonados.

30 Durante ciclos de vida celulares normales, se usa carbono en funciones celulares, tales como producción de lípidos, sacáridos, proteínas, ácidos orgánicos y ácidos nucleicos. Reducir la cantidad de carbono necesaria para actividades relacionadas con el crecimiento puede aumentar la eficacia de conversión de la fuente de carbono en producto. Esto puede lograrse, por ejemplo, haciendo crecer en primer lugar células huésped hasta una densidad deseada (por ejemplo, una densidad que se alcanza al máximo de la fase de crecimiento logarítmica). En tal punto, pueden emplearse genes de punto de control de la replicación para detener el crecimiento de células. Específicamente, pueden usarse mecanismos de percepción de quórum (revisado en Camilli *et al.*, Science 311:1113, (2006); Venturi FEMS Microbio. Rev. 30:274-291, (2006); y Reading *et al.*, FEMS Microbiol. Lett. 254:1-11, (2006)) para activar genes de punto de control, tales como *p53*, *p21* u otros genes de punto de control.

35 Los genes que pueden activarse para detener la replicación y el crecimiento celular en *E. coli* incluyen genes *umuDC*. La sobreexpresión de genes *umuDC* detiene la progresión desde la fase estacionaria hasta el crecimiento exponencial (Murli *et al.*, J. of Bact. 182: 1127, (2000)). UmuC es una ADN polimerasa que puede llevar a cabo la síntesis translesión sobre lesiones no codificantes (la base mecánica de la mayoría de las mutagénesis por UV y químicas). Los productos del gen *umuDC* están implicados en el proceso de síntesis translesión y también sirven como un punto de control de daño de la secuencia de ADN. Los productos del gen *umuDC* incluyen UmuC, UmuD, umuD', UmuD<sub>2</sub>C, UmuD<sub>2</sub>' y UmuD<sub>2</sub>. Simultáneamente, pueden activarse genes que producen productos, minimizando así la necesidad de usar rutas de replicación y mantenimiento mientras se prepara un aldehído graso. También pueden modificarse por ingeniería células huésped para expresar *umuC* y *umuD* de *E. coli* en pBAD24 bajo el sistema del promotor *prpBCDE* mediante síntesis *de novo* de este gen con los genes de producción de producto final apropiados.

40 El porcentaje de carbonos introducidos convertidos en ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos puede ser un impulsor de coste. Cuanto más eficaz es el proceso (es decir, mayor es el porcentaje de carbonos introducidos convertidos en ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos), menos caro será el proceso. Para fuentes de carbono que contienen oxígeno (por ejemplo, fuentes a base de glucosa y otros hidratos de carbono), el oxígeno debe liberarse en forma de dióxido de carbono. Por cada 2 átomos de oxígeno liberados, también se libera un átomo de carbono conduciendo a una eficacia metabólica teórica máxima de aproximadamente el 34% (p/p) (para productos derivados de ácidos grasos). Sin embargo, esta cifra cambia para otros compuestos orgánicos y fuentes de carbono. Las eficacias típicas en la bibliografía son aproximadamente inferiores al 5%. Las células huésped modificadas por ingeniería genética para producir ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos pueden tener una eficacia superior a aproximadamente el 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30%. En un ejemplo, las células huésped pueden mostrar una eficacia de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 25%. En otros ejemplos, tales células huésped pueden mostrar una eficacia de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 30%. En otros ejemplos, las células huésped pueden mostrar una eficacia superior al 30%.

La célula huésped puede modificarse por ingeniería genética adicionalmente para expresar celulosomas recombinantes, tales como los descritos en la solicitud de PCT número PCT/US2007/003736. Estos celulosomas pueden permitir que la célula huésped use material celulósico como fuente de carbono. Por ejemplo, la célula huésped puede modificarse por ingeniería genética adicionalmente para expresar invertasas (EC 3.2.1.26) de modo que puede usarse sacarosa como fuente de carbono. De manera similar, la célula huésped puede modificarse por ingeniería genética usando las enseñanzas descritas en las patentes estadounidenses n.ºs 5.000.000; 5.028.539; 5.424.202; 5.482.846 y 5.602.030; de modo que la célula huésped puede asimilar carbono eficazmente y usar materiales celulósicos como fuentes de carbono.

En un ejemplo, la cámara de fermentación puede encerrar una fermentación que está experimentando una reducción continua. En este caso, puede crearse un entorno reductor estable. El equilibrio electrónico puede mantenerse mediante la liberación de dióxido de carbono (en forma gaseosa). Esfuerzos para aumentar el equilibrio de NAD/H y NADP/H también pueden facilitar la estabilización del equilibrio electrónico. También puede potenciarse la disponibilidad de NADPH intracelular modificando por ingeniería genética la célula huésped para expresar una NADH:NADPH transhidrogenasa. La expresión de una o más NADH:NADPH transhidrogenasas convierte la NADH producida en la glicólisis en NADPH, lo que puede potenciar la producción de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos.

Para la producción a pequeña escala, las células huésped modificadas por ingeniería genética pueden hacerse crecer en lotes de, por ejemplo, aproximadamente 100 ml, 500 ml, 1 l, 2 l, 5 l o 10 l; fermentarse; e inducirse para expresar los genes biosintéticos deseados basándose en los genes específicos codificados en los plásmidos apropiados. Para la producción a gran escala, las células huésped modificadas por ingeniería genética pueden hacerse crecer en lotes de aproximadamente 10 l, 100 l, 1000 l, 10.000 l, 100.000 l, 1.000.000 l o más; fermentarse; e inducirse para expresar los genes biosintéticos deseados basándose en los genes específicos codificados en los plásmidos apropiados o incorporados en el genoma de la célula huésped.

Por ejemplo, un huésped de producción adecuado, tal como células de *E. coli*, que aloja plásmidos que contienen los genes biosintéticos deseados o que tiene los genes biosintéticos integrados en su cromosoma, puede incubarse en un reactor adecuado, por ejemplo un reactor de 1 l, durante 20 horas a 37°C en medio M9 complementado con el 2% de glucosa, carbenicilina y cloranfenicol. Cuando la DO<sub>600</sub> del cultivo alcanza 0,9, el huésped de producción puede inducirse con IPTG para activar los sistemas génicos diseñados por ingeniería genética para la producción de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos. Tras la incubación, puede extraerse el medio gastado y puede examinarse la fase orgánica para determinar la presencia de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos usando métodos de detección conocidos tales como, por ejemplo, CG-EM.

En algunos casos, tras la primera hora de inducción, pueden extraerse alícuotas de no más de aproximadamente el 10% del volumen celular total cada hora y dejarlas reposar sin agitación para permitir que los ésteres de ácidos grasos suban hasta la superficie y experimenten una precipitación o separación de fases espontánea. Entonces puede recogerse el componente de ácido graso / derivado de ácido graso y devolverse la fase acuosa a la cámara de reacción. La cámara de reacción puede hacerse funcionar de manera continua. Cuando la DO<sub>600</sub> disminuye por debajo de aproximadamente 0,6, pueden sustituirse las células por un nuevo lote que se hizo crecer a partir de un cultivo de siembra.

#### Glucosa

En algunos casos, los métodos dados a conocer en el presente documento se realizan usando glucosa como fuente de carbono. En determinados casos, se hacen crecer microorganismos en un medio de cultivo que contiene una concentración de glucosa inicial de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 50 g/l, tal como de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 20 g/l. En algunos casos, la concentración de glucosa del medio de cultivo disminuye desde la concentración de glucosa inicial a medida que los microorganismos consumen la glucosa, y se mantiene una concentración de glucosa de aproximadamente 0 g/l a aproximadamente 5 g/l en el medio de cultivo durante el procedimiento de producción de ácidos grasos / derivados de ácidos grasos. En determinados casos, la glucosa se alimenta a los microorganismos en una disolución de glucosa a de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 65%.

En algunos casos, la tasa de alimentación de glucosa se fija para coincidir con la tasa de crecimiento de las células para evitar la acumulación en exceso de glucosa (es decir, >0% de glucosa) en el fermentador. En otros casos, se mantiene una baja concentración de glucosa en exceso (por ejemplo, de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 5 g/l).

En determinados casos, pueden producirse ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos a partir de hidratos de carbono distintos de glucosa, incluyendo pero sin limitarse a, fructosa, sacarosa hidrolizada, molasas hidrolizadas y glicerol.

#### Procesamiento tras la producción

Los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos producidos durante la fermentación pueden separarse de los medios de fermentación. Puede usarse cualquier técnica conocida para separar ácidos grasos y/o derivados de

ácidos grasos de medios acuosos. Un procedimiento de separación a modo de ejemplo es un procedimiento de separación de dos fases (bifásico). Este procedimiento implica fermentar las células huésped modificadas por ingeniería genética en condiciones suficientes para producir un ácido graso y/o derivado de ácido graso, permitir que el ácido graso y/o derivado de ácido graso se recoja en una fase orgánica y separar la fase orgánica del caldo de fermentación acuoso. Este método puede ponerse en práctica en procedimientos de fermentación tanto continuos como discontinuos.

La separación bifásica usa la relativa inmiscibilidad de los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos para facilitar la separación. Inmiscible se refiere a la relativa incapacidad de un compuesto de disolverse en agua y se define por el coeficiente de reparto del compuesto. Un experto habitual en la técnica apreciará que eligiendo un caldo de fermentación y una fase orgánica, de tal manera que el ácido graso y/o derivado de ácido graso que está produciéndose tiene un valor de logP alto, el ácido graso y/o derivado de ácido graso puede separarse en la fase orgánica, incluso a concentraciones muy bajas, en el recipiente de fermentación.

Los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos producidos mediante los métodos descritos en el presente documento pueden ser relativamente inmiscibles en el caldo de fermentación, así como en el citoplasma. Por tanto, los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos pueden recogerse en una fase orgánica o bien de manera intracelular o bien extracelular. La recogida de los productos en la fase orgánica puede reducir el impacto del ácido graso y/o derivado de ácido graso sobre la función celular y puede permitir que la célula huésped produzca más producto.

Los métodos descritos en el presente documento pueden dar como resultado la producción de compuestos homogéneos en los que al menos aproximadamente el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 95% de los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos producidos tendrán longitudes de cadena de carbono que varían en menos de aproximadamente 8 carbonos, menos de aproximadamente 6 carbonos, menos de aproximadamente 4 carbonos o menos de aproximadamente 2 carbonos. Estos compuestos también pueden producirse con un grado de saturación relativamente uniforme. Estos compuestos pueden usarse directamente como combustibles, aditivos para combustibles, materiales de partida para la producción de otros compuestos químicos (por ejemplo, polímeros, tensioactivos, plásticos, materiales textiles, disolventes, adhesivos, etc.), o aditivos para el cuidado personal. Estos compuestos también pueden usarse como materia prima para reacciones posteriores, por ejemplo, hidrogenación, craqueo catalítico (por ejemplo, mediante hidrogenación, pirólisis o ambas), para preparar otros productos.

Los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos producidos usando métodos descritos en el presente documento pueden contener entre aproximadamente el 50% y aproximadamente el 90% de carbono; o entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 25% de hidrógeno. Los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos producidos usando métodos descritos en el presente documento pueden contener entre aproximadamente el 65% y aproximadamente el 85% de carbono; o entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 15% de hidrógeno.

#### Producción de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos usando métodos libres de células

Determinados métodos descritos en el presente documento también engloban un ácido graso o un derivado del mismo producido usando un polipéptido de éster sintasa purificado, una variante o un fragmento del mismo descritos en el presente documento y un sustrato, proporcionado o producido mediante, por ejemplo, un método descrito en el presente documento. Por ejemplo, puede modificarse por ingeniería genética una célula huésped para expresar una éster sintasa adecuada, una variante o un fragmento de la misma, tal como se describe en el presente documento. La célula huésped puede cultivarse en condiciones que permiten la expresión del polipéptido de éster sintasa. Entonces pueden generarse extractos libres de células usando métodos conocidos. Por ejemplo, pueden lisarse las células huésped usando detergentes o mediante sonicación. Entonces pueden purificarse o purificarse sustancialmente los polipéptidos expresados usando métodos conocidos. Tras obtener los extractos libres de células, pueden proporcionarse sustratos descritos en el presente documento a los extractos libres de células e incubarse en condiciones que permiten la conversión de los sustratos en los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos deseados. Entonces pueden separarse y purificarse los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos usando técnicas conocidas. Por consiguiente, pueden producirse ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos de la presente invención extracelularmente y aislarse *in vitro*.

#### Bioproductos

No se han producido bioproductos que comprenden compuestos orgánicos producidos biológicamente, particularmente ácidos grasos y derivados de ácidos grasos producidos biológicamente usando la ruta de biosíntesis de ácidos grasos, a partir de fuentes renovables y, como tales, son composiciones de materia nuevas. Estos nuevos bioproductos pueden distinguirse de los compuestos orgánicos derivados del carbono petroquímico basándose en la huella de carbono isotópico doble o la datación de  $^{14}\text{C}$ . Adicionalmente, la fuente específica de carbono de biofuentes (por ejemplo, glucosa frente a glicerol) puede determinarse mediante la huella de carbono isotópico doble (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7.169.588).

La capacidad de distinguir bioproductos de compuestos orgánicos a base de petróleo es beneficiosa en el seguimiento de estos materiales en el comercio. Por ejemplo, pueden distinguirse productos químicos o compuestos

orgánicos que comprenden perfiles de isótopos de carbono tanto de base biológica como a base de petróleo de productos químicos y compuestos orgánicos preparados únicamente a partir de materiales a base de petróleo. Por tanto, puede realizarse un seguimiento de los presentes materiales en el comercio basándose en su perfil de isótopos de carbono único.

5 Los bioproductos pueden distinguirse de los compuestos orgánicos a base de petróleo comparando la razón de isótopos de carbono estables ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) en cada combustible. La razón  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  en un bioproducto dado es una consecuencia de la razón  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  en el dióxido de carbono atmosférico en el momento de fijar el dióxido de carbono. También refleja la ruta metabólica precisa. También se producen variaciones regionales. El petróleo, las plantas de  $\text{C}_3$  (de hoja ancha), las plantas de  $\text{C}_4$  (las hierbas) y los carbonatos marinos muestran diferencias significativas en  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  y los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  correspondientes. Además, los análisis de materia lipídica de plantas  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$  son diferentes de los materiales derivados de componentes de hidratos de carbono de las mismas plantas como consecuencia de la ruta metabólica.

15 Dentro de la precisión de la medición,  $^{13}\text{C}$  muestra grandes variaciones debido a efectos de fraccionamiento isotópico, el más significativo de los cuales para bioproductos es el mecanismo fotosintético. La principal causa de diferencias en la razón de isótopos de carbono en 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 " $\text{C}_3$ " (o de Calvin-Benson) y las que incorporan el ciclo fotosintético " $\text{C}_4$ " (o de Hatch-Slack).

20 En las plantas  $\text{C}_3$ , la reacción de carboxilación o fijación de  $\text{CO}_2$  principal implica la enzima ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa, y el primer producto estable es un compuesto de 3 carbonos. Las plantas  $\text{C}_3$ , tales como de madera dura y coníferas, son dominantes en las zonas de clima templado.

25 En las plantas  $\text{C}_4$ , una reacción de carboxilación adicional que implica otra enzima, fosfoenol-piruvato carboxilasa, es la reacción de carboxilación principal. 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 en el ciclo  $\text{C}_3$ . Ejemplos de plantas  $\text{C}_4$  son hierbas tropicales, maíz y caña de azúcar.

30 Tanto las plantas  $\text{C}_4$  como  $\text{C}_3$  muestran un intervalo de razones isotópicas  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , pero los valores normales son de aproximadamente -7 a aproximadamente -13 por mil para plantas  $\text{C}_4$  y de aproximadamente -19 a aproximadamente -27 por mil para plantas  $\text{C}_3$  (véase, por ejemplo, Stuiver *et al.*, Radiocarbon 19:355, 1977). 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 por la caliza Pee Dee Belemnite (PDB), en la que los valores se facilitan en partes por mil desviaciones a partir de este material. Los valores de " $\delta^{13}\text{C}$ " se expresan en partes por mil (por mil), abreviado, ‰, y se calculan de la siguiente manera:

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

35 Dado que el material de referencia (RM) PDB se ha agotado, se ha desarrollado una serie de RM alternativos en colaboración con IAEA, USGS, NIST, y otros laboratorios de isótopos internacionales seleccionados. Las anotaciones para las desviaciones por mil a partir de PDB son de  $\delta^{13}\text{C}$ . Las mediciones se realizan con  $\text{CO}_2$  mediante espectrometría de masas de razón estable de alta precisión (IRMS) con iones moleculares con masas de 44, 45 y 46.

40 Las composiciones descritas en el presente documento incluyen bioproductos producidos mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Específicamente, el bioproducto puede tener una  $\delta^{13}\text{C}$  de aproximadamente -28 o superior, aproximadamente -27 o superior, -20 o superior, -18 o superior, -15 o superior, -13 o superior, -10 o superior o -8 o superior. Por ejemplo, el bioproducto puede tener una  $\delta^{13}\text{C}$  de aproximadamente -30 a aproximadamente -15, de aproximadamente -27 a aproximadamente -19, de aproximadamente -25 a aproximadamente -21, de aproximadamente -15 a aproximadamente -5, de aproximadamente -13 a aproximadamente -7 o de aproximadamente -13 a aproximadamente -10. En otros casos, el bioproducto puede tener una  $\delta^{13}\text{C}$  de aproximadamente -10, -11, -12 o -12,3.

50 Los bioproductos también pueden distinguirse de compuestos orgánicos a base de petróleo comparando la cantidad de  $^{14}\text{C}$  en cada compuesto. Dado que  $^{14}\text{C}$  tiene una semivida nuclear de 5730 años, los combustibles a base de petróleo que contienen carbono "más antiguo" pueden distinguirse de los bioproductos que contienen carbono "más reciente" (véase, por ejemplo, Currie, "Source Apportionment of Atmospheric Particles", Characterization of Environmental Particles, J. Buffle y H. P. van Leeuwen, Eds., 1 de vol. I de IUPAC Environmental Analytical Chemistry Series (Lewis Publishers, Inc) (1992) 3-74).

55 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. Sin embargo, debido a pruebas nucleares atmosféricas desde 1950 y al quemado de combustible fósil desde 1850,  $^{14}\text{C}$  ha adquirido una segunda característica temporal geoquímica. Su concentración en el  $\text{CO}_2$  atmosférico, y por tanto en la biosfera viva, aproximadamente se duplicó en

el máximo de las pruebas nucleares, a mediados de la década de 1960. Desde entonces ha vuelto gradualmente a la tasa de isótopos ( $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) inicial cosmogénica (atmosférica) en estado estacionario de aproximadamente  $1,2 \times 10^{-12}$ , con una "semivida" de relajación aproximada de 7-10 años. (Esta última semivida no debe interpretarse de manera literal; en vez de eso, debe usarse la función de introducción/degradación nuclear atmosférica detallada para rastrear la variación de  $^{14}\text{C}$  atmosférico y biosférico desde el inicio de la era nuclear).

Esta última característica temporal de  $^{14}\text{C}$  biosférico es la que mantiene la promesa de una datación anual de carbono biosférico reciente.  $^{14}\text{C}$  puede medirse mediante espectrometría de masas con acelerador (AMS), con resultados facilitados en unidades de "fracción de carbono moderno" ( $f_M$ ).  $f_M$  se define por el National Institute of Standards and Technology (NIST) Standard Reference Materials (SRM) 4990B y 4990C. Tal como se usa en el presente documento, la "fracción de carbono moderno" o " $f_M$ " tiene el mismo significado que el definido por el National Institute of Standards and Technology (NIST) Standard Reference Materials (SRM) 4990B y 4990C, conocidos como patrones de ácidos oxálicos HOxI y HOxII, respectivamente. La definición fundamental se refiere a 0,95 veces la razón de isótopos  $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$  de HOxI (denominado AD 1950). Esto es aproximadamente equivalente a la madera previa a la revolución industrial corregida para la degradación. Para la biosfera viva actual (material vegetal),  $f_M$  es de aproximadamente 1,1.

Se proporciona un bioproducto que comprende un ácido graso y/o un derivado de ácido graso producido según los métodos en el presente documento que puede tener una  $f_M$  de  $^{14}\text{C}$  de al menos aproximadamente 1. Por ejemplo, el bioproducto puede tener una  $f_M$  de  $^{14}\text{C}$  de al menos aproximadamente 1,01, una  $f_M$  de  $^{14}\text{C}$  de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5, una  $f_M$  de  $^{14}\text{C}$  de aproximadamente 1,04 a aproximadamente 1,18 o una  $f_M$  de  $^{14}\text{C}$  de aproximadamente 1,111 a aproximadamente 1,124.

Otra medición de  $^{14}\text{C}$  se conoce como el porcentaje de carbono moderno, pMC. Para un arqueólogo o geólogo que usa dataciones de  $^{14}\text{C}$ , AD 1950 es igual a "cero años de edad". Esto también representa 100 pMC. El "carbono bomba" en la atmósfera alcanzó casi el doble del nivel normal en 1963 en el máximo de las armas termonucleares. Su distribución dentro de la atmósfera se ha aproximado desde su aparición, mostrando valores que son superiores a 100 pMC para plantas y animales vivos desde AD 1950. Ha disminuido gradualmente a lo largo del tiempo, siendo el valor actual próximo a 107,5 pMC. Esto significa que un material de biomasa reciente, tal como maíz, tendrá una firma de  $^{14}\text{C}$  próxima a 107,5 pMC. Los compuestos a base de petróleo tendrán un valor de pMC de cero. Combinar carbono fósil con carbono actual dará como resultado una dilución del contenido de pMC actual. Suponiendo que 107,5 pMC representa el contenido de  $^{14}\text{C}$  de los materiales de biomasa actuales y 0 pMC representa el contenido de  $^{14}\text{C}$  de los productos a base de petróleo, el valor de pMC medido para ese material reflejará las proporciones de los dos tipos de componentes. Por ejemplo, un material derivado al 100% de semillas de soja actuales dará una firma de radiocarbono próxima a 107,5 pMC. Si ese material se diluyó al 50% con productos a base de petróleo, dará una firma de radiocarbono de aproximadamente 54 pMC.

Un contenido de carbono de base biológica se deriva asignando "el 100%" igual a 107,5 pMC y "el 0%" igual a 0 pMC. Por ejemplo, una muestra que mide 99 pMC dará un contenido de carbono de base biológica equivalente del 93%. Este valor se denomina el resultado de carbono de base biológica medio y supone que todos los componentes dentro del material analizado se originaron o bien de material biológico actual o bien de material a base de petróleo.

Un bioproducto que comprende un ácido graso y/o derivado de ácido graso producido según los métodos descritos en el presente documento puede tener un pMC de al menos aproximadamente 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100. En otros casos, un ácido graso y/o derivado de ácido graso descrito en el presente documento puede tener un pMC de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100; aproximadamente 60 y aproximadamente 100; aproximadamente 70 y aproximadamente 100; aproximadamente 80 y aproximadamente 100; aproximadamente 85 y aproximadamente 100; aproximadamente 87 y aproximadamente 98; o aproximadamente 90 y aproximadamente 95. En aún otros casos, un bioproducto que comprende un ácido graso y/o derivado de ácido graso puede tener un pMC de aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94 ó 94,2.

Por ejemplo, los ácidos grasos y/o derivados de los mismos producidos mediante los métodos descritos en el presente documento pueden usarse como biocombustibles. Por ejemplo, los ácidos grasos y/o derivados de los mismos tal como se describen en el presente documento pueden usarse por sí solos o como un componente de biodiésel. Los ácidos grasos y/o derivados de los mismos producidos según los métodos en el presente documento también pueden usarse como, o como componentes o materias primas de, diversos productos químicos industriales, incluyendo sin limitación, aditivos para combustibles. El biocombustible o los productos químicos industriales resultantes son bioproductos y por tanto tendrán una  $\delta^{13}\text{C}$  de aproximadamente -28 o superior, aproximadamente -27 o superior, -20 o superior, -18 o superior, -15 o superior, -13 o superior, -10 o superior, o -8 o superior. Por ejemplo, el bioproducto puede tener una  $\delta^{13}\text{C}$  de aproximadamente -30 a aproximadamente -15, de aproximadamente -27 a aproximadamente -19, de aproximadamente -25 a aproximadamente -21, de aproximadamente -15 a aproximadamente -5, de aproximadamente -13 a aproximadamente -7, o de aproximadamente -13 a aproximadamente -10. Además, el biocombustible o los productos químicos industriales resultantes tendrán una  $f_M$   $^{14}\text{C}$  de al menos aproximadamente 1. Por ejemplo, el bioproducto puede tener una  $f_M$   $^{14}\text{C}$  de al menos aproximadamente 1,01, una  $f_M$   $^{14}\text{C}$  de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5, una  $f_M$   $^{14}\text{C}$  de aproximadamente 1,04 a aproximadamente 1,18, o una  $f_M$  de  $^{14}\text{C}$  de aproximadamente 1,111 a aproximadamente 1,124.

Composiciones de combustible

Los ácidos grasos y/o derivados de los mismos producidos según los métodos y las composiciones en el presente documento presentan diversas características ventajosas para su uso como combustible. Un experto habitual en la técnica apreciará que, dependiendo del propósito previsto del combustible, diferentes ácidos grasos y/o derivados de los mismos pueden tener ventajas en comparación con otros ácidos grasos y/o derivados. Por ejemplo, los ácidos grasos ramificados y/o derivados de los mismos pueden ser más deseables como combustibles para automóviles o componentes de combustibles para automóviles que están previstos para usos en climas fríos. De manera similar, para determinadas aplicaciones, puede ser ventajoso producir un combustible que esté o bien más o menos oxigenado o bien más o menos saturado.

Usando los métodos descritos en el presente documento, pueden producirse combustibles que comprenden ácidos grasos relativamente homogéneos y/o derivados de los mismos que, al mismo tiempo, tienen las características y cualidades deseadas. Tales combustibles a base de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos pueden caracterizarse por la huella de carbono, y también es ventajosa su falta de impurezas, cuando se comparan con combustibles derivados de petróleo o biodiésel derivado de triglicéridos. Los combustibles a base de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos pueden combinarse con otros combustibles o aditivos para combustibles para producir composiciones de combustible alternativas que tienen las propiedades deseadas.

Los huéspedes y métodos de producción dados a conocer en el presente documento pueden usarse para producir ácidos grasos libres y/o diversos derivados de ácidos grasos. Los huéspedes y métodos de producción dados a conocer en el presente documento pueden usarse para producir un título o rendimiento superior y/o mejorado de ácidos grasos libres y/o derivados de ácidos grasos, incluyendo, por ejemplo, ésteres grasos. El porcentaje de ácidos grasos libres en el producto producido por el huésped de producción puede ser de al menos aproximadamente el 1%, por ejemplo, al menos aproximadamente el 2%, el 3%, el 4%, el 5%, el 6%, el 7%, el 8%, el 9%, el 10%, el 15%, el 20% o el 25%. El porcentaje de derivados de ácidos grasos en el producto producido por el huésped de producción puede ser de al menos aproximadamente el 50%, por ejemplo, al menos aproximadamente el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85% o el 90%. La razón de derivado de ácido graso con respecto a ácidos grasos libres en el producto producido por el huésped de producción puede ser de aproximadamente 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 5:1, 2:1 ó 1:1.

El derivado de ácido graso producido por el huésped de producción puede ser un derivado de etilo de ácido graso. Un derivado de etilo de ácido graso a modo de ejemplo es un éster etílico graso. El éster etílico graso puede ser un dodecanoato de etilo, tridecanoato de etilo, tetradecanoato de etilo, pentadecanoato de etilo, *cis*-9-hexadecenoato de etilo, hexadecanoato de etilo, heptadecanoato de etilo, *cis*-11-octadecenoato de etilo o éster de octadecanoato de etilo. El producto de derivado de ácido graso que puede producirse por el huésped de producción es una combinación de una variedad de derivados de ácidos grasos. Por ejemplo, el producto de derivado de ácido graso comprende una mezcla de cualquier combinación de un dodecanoato de etilo, tridecanoato de etilo, tetradecanoato de etilo, pentadecanoato de etilo, *cis*-9-hexadecenoato de etilo, hexadecanoato de etilo, heptadecanoato de etilo, *cis*-11-octadecenoato de etilo y éster de octadecanoato de etilo. El derivado de ácido graso producido puede ser un derivado de metilo graso. Un derivado de metilo graso a modo de ejemplo es un éster metílico graso. El éster metílico graso producido por el huésped de producción puede ser un dodecanoato de metilo, tridecanoato de metilo, tetradecanoato de metilo, pentadecanoato de metilo, *cis*-9-hexadecenoato de metilo, hexadecanoato de metilo, heptadecanoato de metilo, *cis*-11-octadecenoato de metilo u octadecanoato de metilo. El producto de derivado de ácido graso producido por el huésped de producción puede ser una combinación de una variedad de productos de derivado de ácido graso. Por ejemplo, el derivado de ácido graso es una mezcla de uno o más de dodecanoato de metilo, tridecanoato de metilo, tetradecanoato de metilo, pentadecanoato de metilo, *cis*-9-hexadecenoato de metilo, hexadecanoato de metilo, heptadecanoato de metilo, *cis*-11-octadecenoato de metilo y octadecanoato de metilo. El derivado de ácido graso puede ser una mezcla de uno o más ésteres metílicos grasos y uno o más ésteres etílicos grasos. El producto puede ser una mezcla de uno o más ácidos grasos libres y/o uno o más derivados de ácidos grasos. El producto puede ser una mezcla de uno o más ácidos grasos libres y/o uno o más ésteres metílicos grasos y/o uno o más ésteres etílicos grasos.

Los huéspedes y métodos de producción dados a conocer en el presente documento pueden usarse para producir diferentes proporciones de ácidos grasos libres y derivados de ácidos grasos. La proporción de ácidos grasos libres en el producto puede modificarse según los métodos, composiciones, vectores y células descritos en el presente documento de manera que la proporción puede ser superior o inferior frente a los derivados de ácidos grasos que se producen. La proporción de derivados de ácidos grasos en el producto también puede modificarse según las divulgaciones en el presente documento, de manera que la proporción es superior o inferior frente a otros productos, por ejemplo, los ácidos grasos libres, que se producen. El rendimiento proporcional de derivado de ácido graso con determinadas longitudes de cadena de carbono puede aumentarse o disminuirse.

El término "rendimiento proporcional", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un producto deseado en relación con otros productos que están dentro de la misma mezcla producida por un huésped recombinante de la presente invención. Por ejemplo, el rendimiento proporcional de un producto deseado puede mejorarse de manera que sea más predominante con respecto a los otros componentes en la mezcla de producto para reducir la carga de purificación. En otro ejemplo, el rendimiento proporcional de un producto no deseado (es

decir, un componente que será necesario eliminar del producto deseado) puede reducirse de manera que sea menos predominante con respecto al componente deseado en la mezcla de producto para lograr el mismo fin.

#### *Huella de carbono*

5 Los derivados de ácidos grasos producidos biológicamente pueden proporcionar una nueva fuente de combustibles, tales como alcoholes, diésel y gasolina. Los biocombustibles preparados según los métodos y las composiciones descritos en el presente documento no se han producido hasta ahora a partir de fuentes renovables y son composiciones de materia nuevas. Estos combustibles nuevos pueden distinguirse de los combustibles derivados de carbono petroquímico basándose en la huella de carbono isotópico doble. Adicionalmente, la fuente específica de carbono de biofuentes (por ejemplo, glucosa frente a glicerol) puede determinarse mediante la huella de carbono isotópico doble (véase la patente estadounidense n.º 7.169.588, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad, en particular, de la columna 4, línea 31 a la columna 6, línea 8).

10 Los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos y los biocombustibles, productos químicos y mezclas asociados pueden distinguirse de sus homólogos derivados de manera petroquímica basándose en  $^{14}\text{C}$  ( $f_M$ ) y la huella de carbono isotópico doble.

15 Los ácidos grasos y/o derivados de los mismos tal como se describen en el presente documento tienen utilidad en la producción de biocombustibles y productos químicos. Los productos proporcionados por la presente invención pueden distinguirse basándose en la huella de carbono isotópico doble de los materiales derivados únicamente de fuentes petroquímicas. La capacidad para distinguir estos productos es beneficiosa en el seguimiento 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 compuestos sólo por materiales “antiguos”. Por tanto, los presentes materiales pueden seguirse o “rastrearse” en el comercio o identificarse en el comercio como biocombustible basándose en su perfil único. Además, pueden identificarse otros materiales competidores como derivados de manera biológica o derivados de una fuente petroquímica

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



30 en la que

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

$\text{R} =$  para cada  $n$ , independientemente ausente, un H, o un grupo alifático inferior;

$n =$  un número entero de desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 34, preferiblemente un número entero de desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 24;

35  $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4 =$  seleccionados independientemente de un H o alquilo inferior.

Normalmente, cuando  $\text{R}$  es un grupo alifático inferior,  $\text{R}$  representa un resto alqueno inferior o alquilo inferior ramificado, no ramificado o cíclico. Los grupos  $\text{R}$  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 una  $\delta^{13}\text{C}$  de desde aproximadamente -10,9 hasta aproximadamente -15,4, y el derivado de ácido graso representa al menos aproximadamente el 85% de material de biofuentes en la composición. En algunos ejemplos, el derivado de ácido graso en la composición de biocombustible se caracteriza por tener una fracción de carbono moderno ( $f_M^{14}\text{C}$ ) de al menos aproximadamente 1,003, 1,010, o 1,5.

#### *Impurezas*

45 Los ácidos grasos y/o derivados de los mismos producidos según las divulgaciones en el presente documento son útiles como componentes o materias primas para preparar biocombustibles así como otros productos químicos industriales. Estos productos se preparan directamente a partir de sustratos adecuados y no del procesamiento químico de triglicéridos. Por consiguiente, los combustibles y otros productos químicos industriales que comprenden los ácidos grasos y/o derivados dados a conocer a menudo contienen menos impurezas que las que se asocian normalmente, por ejemplo, con productos derivados de triglicéridos tales como combustibles derivados de grasas y aceites vegetales.

50 Los biocombustibles crudos preparados según las divulgaciones en el presente documento (antes de mezclar los ácidos grasos y/o derivados con otros combustibles tales como combustibles a base de petróleo) contienen menos catalizadores de transesterificación que el diésel a base de petróleo u otro biodiésel producido a través de una o

más etapas de transesterificación. El biocombustible puede contener menos de aproximadamente el 2,0% en peso, por ejemplo, menos de aproximadamente el 1,5, el 1,0, el 0,5, el 0,3, el 0,1, el 0,05 o el 0% en peso de un catalizador de transesterificación o una impureza que resulta de un catalizador de transesterificación. Los ejemplos de catalizadores de transesterificación incluyen, sin limitación, catalizadores de hidróxido, tales como NaOH, KOH y LiOH; y catalizadores de ácido, tales como catalizadores de ácido mineral y catalizadores de ácido de Lewis. Los ejemplos no limitativos de catalizadores e impurezas que resultan de los catalizadores de transesterificación incluyen estaño, plomo, mercurio, cadmio, zinc, titanio, zirconio, hafnio, boro, aluminio, fósforo, arsénico, antimonio, bismuto, calcio, magnesio, estroncio, uranio, potasio, sodio y litio.

Los biocombustibles preparados según las divulgaciones en el presente documento (antes de mezclar los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos con uno o más de otros combustibles) tienden a tener un punto de gelificación bajo, especialmente cuando el producto de ácido graso y/o derivado de ácido graso comprende un éster etílico C<sub>16:1</sub> o un éster etílico C<sub>18:1</sub>, en comparación con los puntos de gelificación de otros tipos de biocombustibles.

De manera similar, los biocombustibles crudos preparados según las divulgaciones en el presente documento contienen menos glicerol (o glicerina) que los biocombustibles compuestos por triglicéridos. Los biocombustibles pueden contener menos de aproximadamente el 2,0% en peso, por ejemplo, menos de aproximadamente el 1,5, el 1,0, el 0,5, el 0,3, el 0,1, el 0,05 o el 0% en peso de glicerol.

Los biocombustibles crudos en el presente documento también contienen menos alcohol(es) libre(s) (por ejemplo, alcoholes que se usan para crear el éster) que los biodiésel preparados a partir de triglicéridos. Esto se debe en parte a la eficacia de utilización de los alcoholes por los huéspedes de producción de la presente divulgación. Por ejemplo, los biocombustibles pueden contener menos de aproximadamente el 2,0, el 1,5, el 1,0, el 0,5, el 0,3, el 0,1, el 0,05 o el 0% en peso de alcohol libre.

Los biocombustibles en el presente documento pueden caracterizarse adicionalmente por su baja concentración de azufre en comparación con el diésel derivado de petróleo. Por ejemplo, el biocombustible puede tener menos de aproximadamente el 2,0% en peso, por ejemplo, menos de aproximadamente el 1,5, el 1,0, el 0,5, el 0,3, el 0,1, el 0,05 o el 0% en peso de azufre.

#### *Aditivos y composiciones de combustible*

Se usan aditivos para combustibles para potenciar el rendimiento de un combustible o motor. Por ejemplo, pueden usarse aditivos para combustibles para alterar los puntos de congelación/gelificación, los puntos de turbidez, la lubricidad, la viscosidad, la estabilidad oxidativa, la calidad de ignición, los niveles de octanos y/o los puntos de inflamación. En los Estados Unidos, todos los aditivos para combustibles deben registrarse en la Environmental Protection Agency. Los nombres de aditivos para combustibles y las empresas que venden los aditivos para combustibles están disponibles públicamente poniéndose en contacto con la EPA o consultando la página web de la agencia. Un experto habitual en la técnica apreciará que los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento pueden mezclarse con uno o más aditivos para combustibles para conferir una calidad deseada.

Los ácidos grasos y/o derivados de los mismos descritos en el presente documento pueden formularse o procesarse para dar aditivos para combustibles adecuados, que potencian el rendimiento de combustibles o motores. Por ejemplo, los ácidos grasos y/o derivados descritos en el presente documento pueden formularse para dar mejoradores de la lubricidad, que confieren propiedades deseables tales como protección frente al desgaste a piezas del motor. Por consiguiente, se proporcionan composiciones de aditivo que comprenden los ácidos grasos y/o derivados de los mismos producidos según las divulgaciones en el presente documento. En otro ejemplo, los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento pueden formularse para dar inhibidores de corrosión.

Los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento pueden mezclarse con otros combustibles tales como uno o más biodiésel derivados de triglicéridos, diversos alcoholes tales como etanol y butanol, y productos derivados de petróleo tales como gasolina o diésel. En determinadas circunstancias, se produce un ácido graso y/o derivado de ácido graso con un punto de gelificación bajo, tal como un éster etílico C<sub>16:1</sub> o un éster etílico C<sub>18:1</sub>. Este producto de punto gelificación bajo puede mezclarse con uno o más biodiésel preparados a partir de triglicéridos para reducir el punto de gelificación del combustible resultante cuando se compara con un combustible que sólo contiene el uno o más biodiésel preparados a partir de triglicéridos. De manera similar, puede mezclarse un derivado de ácido graso, tal como un éster etílico C<sub>16:1</sub> o un éster etílico C<sub>18:1</sub>, con un diésel derivado de petróleo para producir una mezcla que contiene al menos aproximadamente, y con frecuencia más de aproximadamente, el 5% en peso de biodiésel. En algunos ejemplos, la mezcla de combustible incluye al menos aproximadamente el 10%, el 15%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50% y el 60% en peso del derivado de ácido graso.

La composición de combustible puede comprender además un combustible sintético. Puede usarse de manera adecuada cualquier combustible sintético obtenido a partir de carbón, gas natural o biomasa. En unas realizaciones adicionales, el combustible sintético comprende un combustible basado en Fischer-Tropsch, un combustible basado

en Bergius, un combustible basado en Mobil, un combustible basado en Karrick, o una combinación de los mismos. Todavía en realizaciones adicionales, el combustible sintético comprende un combustible a base de carbón a líquidos (combustible a base de CTL), un combustible a base de gas a líquidos (combustible a base de GTL), un combustible a base de biomasa a líquidos (combustible a base de BTL), un combustible a base de carbón y biomasa a líquidos (combustible a base de CBTL) o una combinación de los mismos. El combustible sintético puede comprender un combustible basado en Fischer-Tropsch.

La cantidad de combustible sintético en la composición de combustible dada a conocer en el presente documento puede ser de desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 90%, desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 80%, desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 70%, desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 60%, o desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 50%.

Puede prepararse una composición de biocombustible que incluye al menos aproximadamente el 5%, el 10%, 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 reduce el punto de turbidez que puede reducir el punto de turbidez hasta menos de aproximadamente 5°C o menos de aproximadamente 0°C; un tensioactivo; una microemulsión; al menos aproximadamente el 5%, el 10%, el 15%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90% o el 95% de combustible diésel a partir de triglicéridos; gasolina derivada de petróleo; o combustible diésel a partir de petróleo.

La composición de combustible que comprende ácidos grasos y/o derivados de los mismos tales como ésteres grasos producidos según los métodos, vectores, células y composiciones en el presente documento puede comprender además uno o más aditivos para combustibles diésel. Aditivos adecuados son de manera deseable aquéllos que proporcionan un rendimiento mejorado pero también compatibilidad con los componentes en la composición de combustible y los dispositivos que normalmente están asociados con los motores diésel. Los ejemplos de otros aditivos para combustibles adecuados incluyen mejoradores de ignición o mejoradores del número de cetano, detergentes, dispersantes, agentes antidesgaste, modificadores del índice de viscosidad, modificadores de fricción, mejoradores de la lubricidad, estabilizadores, antioxidantes, inhibidores de corrosión, biocidas, desactivadores de metales y cantidades minoritarias de otros aditivos opcionales, incluyendo, sin limitación, agentes antiespumantes y fijaciones por sellado.

A menudo pueden añadirse mejoradores de ignición o mejoradores del número de cetano para mejorar el rendimiento del motor diésel. Los mejoradores del número de cetano a modo de ejemplo incluyen nitrato de 2'-etilhexilo y otros nitratos de alquilo. Los mejoradores del número de cetano pueden añadirse a una composición de combustible en una cantidad que es de aproximadamente el 0,01% en peso a aproximadamente el 1,0% en peso, por ejemplo de aproximadamente el 0,05% en peso a aproximadamente el 0,5% en peso, basado en el peso total de la composición de combustible.

Pueden incluirse diversos detergentes y/o dispersantes en la composición de combustible que comprende los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos producidos según las presentes divulgaciones para asociar y dispersar o eliminar depósitos perjudiciales de piezas de motor diésel. Los detergentes adecuados normalmente comprenden una cabeza polar que comprende una sal metálica de un compuesto orgánico ácido y una cola hidrófoba larga. Los detergentes a modo de ejemplo incluyen sales de carbonato boradas, sales de sulfonato boradas, que preferiblemente están en exceso. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.<sup>os</sup> 4.744.920, 4.965.003. Los dispersantes a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, dispersantes carboxílicos, dispersantes de succinimida, dispersantes de amina y dispersantes de Mannich. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.<sup>os</sup> 3.172.892, 3.438.757, 3.980.569 y 6.165.235. Los dispersantes pueden estar presentes en la composición de combustible en una cantidad de aproximadamente el 0,01% en peso a aproximadamente el 0,1% en peso, por ejemplo del 0,03 a aproximadamente el 0,05% en peso, basado en el peso total de la composición de combustible.

Pueden añadirse agentes antidesgaste, incluyendo por ejemplo, sales metálicas de ditiofosfato de dihidrocarbilo, a la composición de combustible para proporcionar beneficios tanto de antidesgaste como de antioxidación. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.<sup>o</sup> 5.898.023.

En realizaciones particulares, la cantidad de mejorador de la lubricidad en la composición de combustible puede oscilar entre aproximadamente 1 ppm y aproximadamente 50.000 ppm, por ejemplo, de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 20.000 ppm, o de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 10.000 ppm. Los ejemplos no limitativos de mejoradores de la lubricidad incluyen ésteres y ácidos grasos, que pueden ser iguales o no a los producidos según los métodos descritos en el presente documento.

La cantidad de estabilizadores, que mejoran la estabilidad en almacenamiento de la composición de combustible, puede oscilar entre aproximadamente el 0,001% en peso y aproximadamente el 2% en peso, por ejemplo, de aproximadamente el 0,01% en peso a aproximadamente el 1% en peso, basado en el peso total de la composición de combustible. Un estabilizador a modo de ejemplo es una amina primaria de alquilo terciario.

5 Los antioxidantes impiden la formación de deposiciones de goma sobre los componentes del sistema de combustible debido a la oxidación de los combustibles en almacenamiento y/o inhiben la formación de compuestos de peróxido en las composiciones de combustible. La cantidad de antioxidantes puede oscilar entre aproximadamente el 0,001% en peso y aproximadamente el 5% en peso, por ejemplo, entre aproximadamente el 0,01% en peso y aproximadamente el 1% en peso, basado en el peso total de la composición de combustible.

10 Los inhibidores de corrosión protegen a los metales ferrosos en los sistemas de manipulación de combustible, tales como tuberías y tanques de almacenamiento, de la corrosión. También se conoce que determinados inhibidores de corrosión confieren lubricidad adicional, y como tales son particularmente adecuados cuando se desea lubricidad adicional. El inhibidor de corrosión puede estar presente en la composición de combustible en una cantidad de aproximadamente el 0,001% en peso a aproximadamente el 5% en peso, por ejemplo, desde aproximadamente el 0,01% en peso hasta aproximadamente el 1% en peso, basado en el peso total de la composición de combustible.

15 Se usan biocidas para combatir el crecimiento microbiano en la composición de combustible, que pueden estar presente en la composición de combustible a una concentración de aproximadamente el 0,001% en peso a aproximadamente el 5% en peso, por ejemplo, desde aproximadamente el 0,01% en peso hasta aproximadamente el 1% en peso, basado en el peso total de la composición de combustible.

Los desactivadores de metales suprimen los efectos catalíticos que algunos metales, particularmente el cobre, tienen sobre la oxidación del combustible, que pueden estar presentes en la composición de combustible en una cantidad de aproximadamente el 0,001% en peso a aproximadamente el 5% en peso, por ejemplo, del 0,01% en peso a aproximadamente el 1% en peso, basado en el peso total de la composición de combustible.

20 Además, pueden añadirse en cantidades minoritarias mejoradores de la viscosidad, que normalmente son materiales poliméricos de pesos moleculares promedio en número de desde aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 250.000, y modificadores de la fricción, que normalmente son compuestos de órgano-molibdeno que contienen azufre. También pueden añadirse inhibidores de espuma, que normalmente incluyen polímeros de metacrilato de alquilo o polímeros de dimetil-silicio, a la composición de combustible en una cantidad de menos de  
25 aproximadamente 10 ppm. Además, pueden añadirse fijaciones por sellado para garantizar el sellado de elastómero apropiado e impedir que pueda incluirse fallo de sellado prematuro en la composición de combustible.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan únicamente para fines ilustrativos. No deben interpretarse como limitativos del alcance ni el contenido de la invención en modo alguno.

### 30 Ejemplos

#### Ejemplo 1

Este ejemplo describe la construcción de un microorganismo modificado por ingeniería genética en el que está atenuada la expresión de una enzima de degradación de ácidos grasos.

35 Se deletó el gen *fadE* de *E. coli* MG1655 (una cepa de *E. coli* K) usando el sistema Lambda Red (también conocido como la integración dirigida por Red) descrito por Datsenko *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645 (2000), con las siguientes modificaciones:

Se usaron los siguientes dos cebadores para crear la delección de *fadE*:

Del-*fadE*-F

5'-AAAAACAGCAACAATGTGAGCTTTGTTGTAATTATATTGTAAACATATTGA  
TTCCGGGGATCCGTCGACC (SEQ ID NO:1); y

40 Del-*fadE*-R

5'-AAACGGAGCCTTTCGGCTCCGTTATTCATTTACGCGGCTTCAACTTTCCTGT  
AGGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID NO:2)

45 Se usaron los cebadores Del-*fadE*-F y Del-*fadE*-R para amplificar el casete de resistencia a kanamicina (Km<sup>R</sup>) a partir del plásmido pKD13 (descrito por Datsenko *et al.*, citado anteriormente) por PCR. Entonces se usó el producto de PCR para transformar células de *E. coli* MG1655 electrocompetentes que contenían pKD46 (descrito en Datsenko *et al.*, citado anteriormente) que se habían inducido previamente con arabinosa durante 3-4 horas. Tras un crecimiento durante 3 horas en un caldo superóptimo con medio de represión de catabolitos (SOC) a 37°C, se sembraron las células en placas de agar Luria que contenían 50 µg/ml de kanamicina. Se identificaron las colonias resistentes y se aislaron tras una incubación durante la noche a 37°C. Se confirmó la alteración del *fadE* mediante amplificación por PCR usando los cebadores *fadE*-L2 y *fadE*-R1, que se diseñaron para flanquear el gen *fadE* de *E.*

*coli*.

Los cebadores de confirmación de la delección de *fadE* fueron:

*fadE*-L2 5'-CGGGCAGGTGCTATGACCAGGAC (SEQ ID NO: 3); y

*fadE*-R1 5'-CGCGGCGTTGACCGGCAGCCTGG (SEQ ID NO: 4)

- 5 Tras confirmarse la delección de *fadE*, se usó una colonia individual para retirar el marcador Km<sup>R</sup> usando el plásmido pCP20 tal como se describe por Datsenko *et al.*, citado anteriormente. La cepa de *E. coli* MG1655 con el gen *fadE* delecionado y el marcador Km<sup>R</sup> retirado se denominó *E. coli* MG1655  $\Delta$ *fadE*, o *E. coli* MG1655 D1.

### Ejemplo 2

- 10 Este ejemplo describe la construcción de un microorganismo modificado por ingeniería genética en el que están atenuadas la expresión de una enzima de degradación de ácidos grasos y de un receptor de proteína de membrana externa.

- 15 Se delecionó el gen *fhuA* (también conocido como el gen *tonA*) de *E. coli* MG1655, que codifica para un transportador de membrana externa de ferricromo (n.º de registro de GenBank NP\_414692), de la cepa *E. coli* MG1655 D1 del ejemplo 1, usando el sistema Lambda Red según Datsenko *et al.*, citado anteriormente, pero con las siguientes modificaciones:

Los cebadores usados para crear la delección:

Del-*fhuA*-F

5'-ATCATTCTCGTTTACGTTATCATTCACTTTACATCAGAGATATACCAATGA

TTCCGGGGATCCGTCGACC (SEQ ID NO:5); y

Del-*fhuA*-R

5'-GCACGGAAATCCGTGCCCCAAAAGAGAAATTAGAAACGGAAGGTTGCGG

- 20 TTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID NO:6)

- 25 Se usaron los cebadores Del-*fhuA*-F y Del-*fhuA*-R para amplificar el casete de resistencia a kanamicina (Km<sup>R</sup>) a partir del plásmido pKD13 por PCR. Se usó el producto de PCR obtenido para transformar células de *E. coli* MG1655 D1 electrocompetentes que contenían pKD46 (véase el ejemplo 1). Se habían inducido estas células previamente con arabinosa durante aproximadamente 3-4 h. Tras un crecimiento durante 3 h en medio SOC a 37°C, se sembraron las células en placas de agar Luria que contenían 50 µg/ml de kanamicina. Se identificaron las colonias resistentes y se aislaron tras una incubación durante la noche a 37°C. Se confirmó la alteración del gen *fhuA* en algunas de las colonias mediante amplificación por PCR usando cebadores que flanquean el gen *FhuA* de *E. coli*.

Se realizó la confirmación de la delección usando los siguientes cebadores:

- 30 *fhuA*-verF 5'-CAACAGCAACCTGCTCAGCAA (SEQ ID NO: 7); y

*fhuA*-verR 5'-AAGCTGGAGCAGCAAAGCGTT (SEQ ID NO: 8)

Tras confirmarse la delección de *fhuA*, se usó una colonia individual para retirar el marcador Km<sup>R</sup> usando el plásmido pCP20 tal como se describe por Datsenko *et al.*, citado anteriormente. La cepa resultante MG1655 de *E. coli* que tiene delecciones de los genes *fadE* y *fhuA* se denominó *E. coli* MG1655  $\Delta$ *fadE* $\Delta$ *fhuA* o *E. coli* MG1655 DV2.

- 35 Ejemplo 3

Este ejemplo describe la construcción de un microorganismo modificado por ingeniería genética en el que están atenuadas la expresión de una acil-CoA deshidrogenasa, de un receptor de proteína de membrana externa, de una piruvato formiato liasa y una lactato deshidrogenasa.

- 40 Se delecionó el gen *pflb* de *E. coli* MG1655, que codifica para una piruvato formiato liasa (n.º de registro de GenBank AAC73989) de *E. coli* MG1655 DV2 (véase el ejemplo 2) usando el sistema Lambda Red según Datsenko *et al.*, citado anteriormente, pero con las siguientes modificaciones:

Los cebadores usados para crear la cepa con delección fueron:

Del-*pflB*-F: 5'-GCCGCAGCCTGATGGACAAAGCGTTCATTATGGTGCTGCCGGTCCG

CGATGATTCGGGGATCCGTCGACC (SEQ ID NO:9)

Del-*pflB*-R: 5'-ATCTTCAACGGTAACTTCTTTACCGCCATGCGTGTCCCAGGTGT

CTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG (SEQ ID NO:10)

5 Se usaron los cebadores Del-*pflB*-F y Del-*pflB*-R para amplificar el casete de resistencia a kanamicina (Km<sup>R</sup>) a partir del plásmido pKD13 por PCR. Entonces se usó el producto de PCR para transformar células de *E. coli* MG1655 DV2 electrocompetentes (véase el ejemplo 2).

10 En paralelo, también se delecionó el gen *ldhA* de *E. coli* MG1655, que codifica para una lactato deshidrogenasa, específicamente una D-lactato deshidrogenasa fermentativa unida a NAD (véase, por ejemplo, Mat-Jan *et al.*, J. Bacteriol. 171(1):342-8 (1989); Bunch *et al.*, Microbiol. 143(1):187-95 (1997) (n.º de registro de GenBank AAC74462) de *E. coli* MG1655 DV2 (véase el ejemplo 2) usando el sistema Lambda Red según Datsenko *et al.*, citado anteriormente, pero con las siguientes modificaciones.

Se usaron dos cebadores para crear la delección:

Del-*ldhA*-F: 5'-CTCCCCTGGAATGCAGGGGAGCGGCAAGATTAACCAGTTCGTTCCG

GGCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3' (SEQ ID NO:11)

Del-*ldhA*-R: 5'-TATTTTATAGTAGCTTAAATGTGATTCAACATCACTGGAGAAAGTC

TTATGCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC-3' (SEQ ID NO:12)

15 Se usaron los cebadores Del-*ldhA*-F y Del-*ldhA*-R para amplificar el casete de resistencia a cloranfenicol acetiltransferasa (Cm<sup>R</sup>) a partir del plásmido pKD3 (véase, Datsenko *et al.*, citado anteriormente) por PCR. También se usó el producto de PCR para transformar células de *E. coli* MG1655 DV2 electrocompetentes (véase el ejemplo 2).

20 Se habían inducido las células de *E. coli* MG1655 DV2 (véase el ejemplo 2) previamente con arabinosa durante aproximadamente 3-4 h. Tras un crecimiento durante 3 h en medio SOC a 37°C, se sembraron las células en placas de agar Luria que contenían 50 µg/ml de kanamicina y 30 µg/ml de cloranfenicol. Se identificaron las colonias que fueron resistentes tanto a kanamicina como a cloranfenicol y se aislaron tras una incubación durante la noche a 37°C. Se confirmó la alteración del gen *pflB* usando cebadores que flanqueaban el gen *E. coli pflB*, y se verificó la alteración del gen *ldhA* usando cebadores que flanqueaban el gen *ldhA* de *E. coli*.

Se realizó la confirmación de la delección de *pflB* usando los siguientes cebadores:

25 *pflB*-verF: 5'-GGACTAAACGTCCTACAAAC (SEQ ID NO: 14)

*PflB*-verR: 5'-TTCATCTGTTTGAGATCGAG (SEQ ID NO: 15)

Se realizó la confirmación de la delección del gen *ldhA* usando los siguientes cebadores:

*ldhA*-verF: 5'-CCCGAGCGGTAGCCAGATGCCCGCCAGCG (SEQ ID NO: 16)

*ldhA*-verR: 5'-GCTGCGGGTTAGCGCACATCATACGGGTC (SEQ ID NO: 17)

30 Tras confirmarse las delecciones, se usó una colonia individual para retirar los marcadores Km<sup>R</sup> y Cm<sup>R</sup> según el método descrito por Datsenko *et al.*, citado anteriormente. La cepa resultante MG1655 de *E. coli* que tenía delecciones de los genes *fadE*, *fhuA*, *pflB* y *ldhA* se denominó *E. coli* MG1655  $\Delta$ *fadE* $\Delta$ *fhuA* $\Delta$ *pflB* $\Delta$ *LdhA* o *E. coli* MG1655 DV4.

#### Ejemplo 4

35 Este ejemplo describe la construcción de un microorganismo modificado por ingeniería genética en el que están atenuadas la expresión de una enzima de degradación de ácidos grasos tal como una acil-CoA sintasa, de un receptor de proteína de membrana externa y de una acil-CoA deshidrogenasa.

Se delecionó el gen *fadD* de *E. coli* MG1655 de la cepa *E. coli* MG1655 DV2 (véase el ejemplo 2), usando el sistema Lambda Red descrito por Datsenko *et al.*, citado anteriormente, pero con las siguientes modificaciones:

40 Los cebadores usados para crear la delección de *fadD* fueron:

*fadD*1:

5'-TAACCGGCGTCTGACGACTGACTTAACGCTCAGGCTTTATTGTCCACTTTG  
TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3' (SEQ ID NO:19); y

fad2:

5'-ATTTGGGGTTGCGATGACGACGAACACGCATTTTAGAGGTGAAGAATTGC  
ATATGAATATCCTCCTTTAGTTCC-3' (SEQ ID NO:20)

5 Se usaron los cebadores fad1 y fad2 para amplificar el casete de resistencia a cloranfenicol acetiltransferasa (Cm<sup>R</sup>) a partir del plásmido pKD3 (descrito por Datsenko *et al.*, citado anteriormente) por PCR. Se usó el producto de PCR para transformar *E. coli* MG1655 DV2 electrocompetente (véase el ejemplo 2). Se sembraron las células transformadas en placas de agar Luria que contenían 30 µg/ml de cloranfenicol y se hicieron crecer durante la noche a 37°C. Se aislaron colonias individuales, se transfirieron a placas de agar Luria recientes, y se hicieron crecer a 42°C. Entonces se cultivaron estas colonias en zonas sobre placas de agar Luria que contenían 30 µg/ml de cloranfenicol y 100 µg/ml de carbenicilina, y se hicieron crecer a 37°C durante la noche. Se evaluaron las colonias que fueron resistentes a cloranfenicol y sensibles a carbenicilina adicionalmente por PCR para garantizar que el producto de PCR se insertaba en el sitio correcto. Específicamente, se confirmó la alteración del gen *fadD* mediante amplificación por PCR usando los cebadores fadF y fadR, que se diseñaron para flanquear el gen *fadD*.

fadF: 5'-CGTCCGTGGTAATCATTGG-3' (SEQ ID NO: 21); y

15 fadR: 5'-TCGCAACCTTTTCGTTGG-3' (SEQ ID NO: 31)

Tras confirmarse la delección de *fadD*, se retiró el marcador Cm<sup>R</sup> usando un plásmido auxiliar de FLP tal como se describe por Datsenko *et al.*, citado anteriormente. La cepa resultante MG1655 de *E. coli* se denominó *E. coli* MG1655  $\Delta$ *fadE* $\Delta$ *fhuA* $\Delta$ *fadD* o *E. coli* MG1655 DV2  $\Delta$ *fadD*. La cepa DV2  $\Delta$ *fadD* no pudo crecer en placas de agar M9 + oleato (que suministran oleato como fuente de carbono). Tampoco pudo crecer en medios líquidos de M9 + oleato.

## 20 Ejemplo 5

Este ejemplo describe la construcción de un plásmido de expresión bacteriano, pDS33.ES9, (figura 3) en el que la expresión de un gen de éster sintasa de *M. hydrocarbonoclasticus* DSM 8798 (n.º de registro de GenBank ABO21021) está bajo el control del promotor del operón de la proteína ribosómica *spc* de *E. coli* *Pspc* (SEQ ID NO: 13, figura 4).

25 Se amplificó el promotor *Pspc*, tal como se muestra en la figura 2, a partir de ADN cromosómico de *E. coli* MG1655 con los siguientes cebadores:

*PspclFF* 5' - AAAGGATGTCGCAAACGCTGTTTCAGTACACTCTCTCAATAC - 3' (SEQ ID NO: 32); y

*PspclFR* 5' - GAGCTCGGATCCATGGTTTAGTGCTCCGCTAATG - 3' (SEQ ID NO: 33)

30 Se realizaron todas las reacciones de PCR descritas en este ejemplo con polimerasa Phusion™ (NEB, Ipswich, MA). Se usó el fragmento de PCR del promotor *Pspc* para sustituir las regiones promotoras tanto *lacI<sub>q</sub>* como *Trc* del plásmido OP80 clonando el producto de PCR en OP80 restringido con BseRI/NcoI usando el kit de clonación InFusion™ (Clontech, Palo Alto, CA). El plásmido resultante, denominado pDS22, todavía presentaba una secuencia *lacZ* en el sentido de 3' de sitio de clonación múltiple. A continuación, se retiró la secuencia *lacZ* mediante amplificación por PCR del plásmido pDS22 usando los siguientes cebadores:

35 pCLlacDF 5' - GAATCCACCCGCTGACGAGCTTAG - 3' (SEQ ID NO: 34); y

pCLEcoR 5' - CGAATCCCATATGGTACCAG - 3' (SEQ ID NO: 35)

Se digirió el producto de PCR mediante EcoRI y se autiligó para formar pDS23. El plásmido pDS23 no contiene el ADN de *lacI<sub>q</sub>*, *lacZ* o *Trc*.

40 Se sintetizó una éster sintasa a partir de *M. hydrocarbonoclasticus* DSM 8798 (n.º de registro de GenBank ABO21021), denominada ES9 en el presente documento, mediante DNA2.0 (Menlo Park, CA). Se subclonó este gen de éster sintasa ES9 sintetizado en pColaDuet-1 para formar el plásmido pHZ1.97-ES9. Se retiró el sitio BspHI interno en el gen de éster sintasa ES9 mediante mutagénesis dirigida al sitio usando el kit múltiple QuikChange® (Stratagene, Carlsbad, CA) y el siguiente cebador mutagénico:

ES9BspF 5' - CCCAGATCAGTTTTATGATTGCCTCGCTGG - 3' (SEQ ID NO: 36)

45 Este cebador introdujo una mutación silenciosa en el gen de éster sintasa ES9. Entonces se usó el plásmido resultante, denominado pDS32, como molde para amplificar el gen de éster sintasa ES9 con los siguientes

cebadores:

ES9BspHF 5' - ATCATGAAACGTCTCGGAAC - 3' (SEQ ID NO: 37); y

ES9XhoR 5' - CCTCGAGTTACTTGCGGGTTCGGGCGCG - 3' (SEQ ID NO: 38)

- 5 Se sometió el producto de PCR resultante a digestiones de restricción con BspHI y XhoI y se ligó en el plásmido pDS23 digerido con NcoI y XhoI para formar pDS33.ES9 (SEQ ID NO: 22). La secuencia de pDS33.ES9 se muestra en la figura 3 con los residuos que representan el promotor *P<sub>spc</sub>* en cursiva y los residuos del gen de éster sintasa ES9 en negrita.

#### Ejemplo 6

- 10 Este ejemplo describe la construcción de un plásmido de expresión bacteriano, pDS57 (SEQ ID NO: 23) en el que la expresión de un gen de éster sintasa está bajo el control del promotor *P<sub>trc</sub>*.

Se amplificó el gen de éster sintasa ES9 a partir del plásmido pDS33.ES9 (SEQ ID NO: 22, ejemplo 5) usando los cebadores ES9BspHF (SEQ ID NO: 37) y ES9XhoR (SEQ ID NO: 38).

- 15 Se digirió el producto de PCR con BspHI y XhoI y se ligó en OP80 restringido con NcoI/XhoI para formar el plásmido pDS57 (SEQ ID NO: 23), en el que el gen de éster sintasa ES9 está bajo el control del promotor *Trc*. La secuencia de pDS57 se muestra en la figura 4 con el promotor *Trc* en cursiva y el gen de éster sintasa ES9 en negrita.

#### Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra que la expresión de éster sintasa sola, sin coexpresión de una acil-CoA sintasa o una tioesterasa, puede usarse para producir ésteres grasos *in vivo*.

- 20 Se hicieron crecer cultivos de siembra de *E. coli* MG1655 DV2  $\Delta$ *fadD* del ejemplo 4, que portaban, cada uno, uno de los siguientes plásmidos:

(1) un plásmido PCL que no contenía ningún inserto (control negativo);

(2) un plásmido que contenía *tesA* de tioesterasa de *E. coli*;

(3) un plásmido que contenía un polinucleótido que codifica para la éster sintasa SK2 de *Alcanivorax borkumensis* *atfA1* (n.º de registro de GenBank YP\_694462);

- 25 (4) un plásmido que contenía un polinucleótido que codifica para la éster sintasa SK2 de *Alcanivorax borkumensis* *atfA2* (n.º de registro de GenBank YP\_693524);

(5) un plásmido que contenía un polinucleótido que codifica para la éster sintasa ES8 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798 (n.º de registro de GenBank ABO21020); y

- 30 (6) un plásmido que contenía un polinucleótido que codifica para la éster sintasa ES9 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798 (n.º de registro de GenBank ABO21021)

en placas de 24 pocillos en caldo LB complementado con 100 µg/ml de espectinomicina. Se construyeron los plásmidos de éster sintasa tal como se describe en el ejemplo 5 para generar los plásmidos pDS41.S (que contenía el gen *atfA1*), pDS31atfA2 (que contenía el gen *atfA2*), pDS31.ES8 (que contenía el gen que codifica para ES8) y pDS33.ES9 (que contenía el gen que codifica para ES9).

- 35 Tras 4 h de crecimiento, se diluyeron los cultivos 1:25 en Che-9 2N-BT (glucosa al 2%, medio limitado en nitrógeno, Bis-Tris 0,2 M, pH 7,0, Triton al 0,1%) que contenía espectinomicina y se hicieron crecer durante la noche. Se diluyeron los cultivos en 4N-BT (glucosa al 4%, medio limitado en nitrógeno, Bis-Tris 0,2 M, pH 7,0, Triton al 0,1%) hasta una DO600 final (densidad óptica a 600 nm) de aproximadamente 0,2. Tras 6 h de crecimiento, se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM, junto con o bien agua o bien etanol (al 2% (v/v)). A las 22 h tras la inducción, se acidificó 1 ml de cultivo con HCl 200 µM, y se extrajo con 500 µl de acetato de etilo. Entonces se trataron los ácidos y ésteres grasos con el agente de derivatización TMAH y se cuantificaron mediante CG/FID. La cantidad de ácido graso libre (FFA) y éter etílico de acilo graso (FAEE) producida en cada cultivo se muestra en la figura 5.

- 45 Tal como se muestra en la figura 5, ES9 generó casi 200 mg/l de FAEE en presencia de etanol, pero sólo una pequeña cantidad (<20%) de FFA. En comparación con la éster sintasa ES9, las otras éster sintasas, incluyendo ES8, *atfA1* y *atfA2*, produjeron cantidades sustancialmente menores de FAEE en presencia de etanol, acompañadas por una mayor proporción de FFA. El *tesA* de *E. coli* en cultivo produjo mayores títulos globales de FFA y FAEE en presencia de etanol, pero la cantidad de FFA fue significativamente mayor que la cantidad de FAEE generada.

Los resultados indican que la expresión de éster sintasa en *E. coli* MG1655 DV2  $\Delta$ *fadD* conduce a la producción de

ésteres en presencia de etanol. En particular, la expresión de la éster sintasa ES9 dio como resultado la mayor producción de ésteres en presencia de etanol en comparación con la de las otras éster sintasas. Además, este ejemplo indicó que la expresión de 'TesA sola en *E. coli* MG1655 DV2  $\Delta$ *fadD* dio como resultado la producción de un bajo nivel de ésteres y un alto nivel de ácidos grasos libres en presencia de etanol.

#### 5 Ejemplo 8

Este ejemplo demuestra que la expresión de una éster sintasa sola, sin coexpresión de una acil-CoA sintasa o una tioesterasa, puede usarse para producir ésteres *in vivo* en presencia de etanol.

Se hicieron crecer cultivos de siembra de *E. coli* MG1655 DV2  $\Delta$ *fadD* del ejemplo 4, que portaban, cada uno, uno de los siguientes plásmidos:

- 10 (1) un plásmido que contenía un 'tesA de *E. coli*;
- (2) un plásmido que contenía un polinucleótido que codifica para la éster sintasa SK2 de *Alcanivorax borkumensis* atfA1 (n.º de registro de GenBank YP\_694462);
- (3) un plásmido que contenía un polinucleótido que codifica para la éster sintasa SK2 de *Alcanivorax borkumensis* atfA2 (n.º de registro de GenBank YP\_693524);
- 15 (4) un plásmido que contenía un polinucleótido que codifica para la éster sintasa ES8 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798 (n.º de registro de GenBank ABO21020); y
- (5) un plásmido que contenía un polinucleótido que codifica para la éster sintasa ES9 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798 (n.º de registro de GenBank ABO21021)

20 en cultivos en frascos de agitación y se indujeron con IPTG 1 mM y etanol al 2% (v/v). A las 24 h tras la inducción, se extrajeron alícuotas de cada cultivo y se analizaron usando CG-FID para determinar el contenido de ácidos y ésteres grasos. Las cantidades de ácido graso libre (FFA) y éter etílico de acilo graso (FAEE) producidas en cada cultivo se muestran en la figura 6.

25 Tal como se muestra en la figura 6, la éster sintasa ES9 generó un alto nivel de FAEE en presencia de etanol, acompañado por un bajo nivel de FFA. En comparación con ES9, se produjeron cantidades perceptiblemente más pequeñas de FAEE por las éster sintasas atfA1, atfA2 y la éster sintasa ES8. De manera acorde a los resultados del ejemplo 7 y la figura 5, anteriormente, la expresión de 'tesA de *E. coli* solo produjo altos títulos globales de FFA y FAEE, pero con una proporción significativamente mayor de FFA.

30 Los resultados demuestran que la expresión de éster sintasa ES9 en *E. coli* MG1655 DV2  $\Delta$ *fadD* da como resultado la producción de altos niveles de ésteres y bajos niveles de ácidos grasos libres en presencia de etanol. Además, este ejemplo demuestra que la expresión de 'TesA en *E. coli* MG1655 DV2  $\Delta$ *fadD* dio como resultado la producción de un bajo nivel de ésteres y un alto nivel de ácidos grasos libres en presencia de etanol.

#### Ejemplo 9

Este ejemplo demuestra que la expresión de una éster sintasa sola, sin coexpresión de una acil-CoA sintasa o una tioesterasa, puede usarse para producir ésteres *in vivo* en presencia de metanol.

35 Se hicieron crecer cultivos de siembra de *E. coli* MG1655 DV2  $\Delta$ *fadD* del ejemplo 4, que portaban, cada uno, uno de los siguientes plásmidos:

- (1) un plásmido que contenía un polinucleótido que codifica para la éster sintasa SK2 de *Alcanivorax borkumensis* atfA1 (n.º de registro de GenBank YP\_694462);
- 40 (2) un plásmido que contenía un polinucleótido que codifica para la éster sintasa SK2 de *Alcanivorax borkumensis* atfA2 (n.º de registro de GenBank YP\_693524);
- (3) un plásmido que contenía un polinucleótido de la éster sintasa ES8 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798 (n.º de registro de GenBank ABO21020); y
- (4) un plásmido que contenía un polinucleótido de la éster sintasa ES9 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798 (n.º de registro de GenBank ABO21021)

45 en cultivos en frascos de agitación y se indujeron con IPTG 1 mM y metanol al 2% (v/v). A las 24 h tras la inducción, se extrajeron alícuotas de cada cultivo y se analizaron mediante CG-FID para determinar el contenido de ácidos y ésteres grasos. Las cantidades de ácido graso libre (FFA) y éster metílico de acilo graso (FAME) producidas en cada cultivo se muestran en la figura 7.

La cantidad de título o producto global observada para FFA y FAME se redujo en presencia de metanol en

comparación con la cantidad de título global observada en presencia de etanol (véase la figura 6). En este caso, la cantidad de FFA producida fue inferior al límite de detección, por tanto es posible que se produjera FFA en presencia de metanol, aunque a bajas concentraciones. También se observaron menores niveles de títulos globales, en comparación con los obtenidos en presencia de etanol, en cultivos que expresan las éster sintasas atfA1, atfA2 y ES8.

Los resultados demuestran que la expresión de éster sintasa ES9 en *E. coli* MG1655 DV2  $\Delta$ fadD dio como resultado la producción de ésteres en presencia de metanol.

#### Ejemplo 10

Este ejemplo demuestra que la expresión de una éster sintasa sola, sin coexpresión de una acil-CoA sintasa o una tioesterasa, puede usarse para producir ésteres *in vivo* en presencia de etanol o metanol.

Se hizo crecer *E. coli* MG1655 DV2  $\Delta$ fadD que portaba un plásmido que contenía un polinucleótido que codifica para la éster sintasa ES9 de *M. hydrocarbonoclasticus* DSM 8798 (n.º de registro de GenBank ABO21020), en cultivos en frascos de agitación y se indujo con IPTG 1 mM y o bien (1) etanol al 2% (v/v) o bien (2) metanol al 2% (v/v). Se extrajeron alícuotas de cada cultivo a las 18, 24, 48 y 68 horas tras la inducción, y se analizaron mediante CG-FID para determinar el contenido de ácidos y ésteres grasos. Las cantidades de éster metílico de acilo graso (FAME) o éter etílico de acilo graso (FAEE) producidas en cada cultivo se muestran en la figura 8, así como la cantidad total de FAME o FAEE más ácido graso libre (FFA).

Tal como se muestra en la figura 8, se produjeron niveles significativamente mayores de ésteres en presencia de etanol (FAEE) en comparación con los niveles de ésteres producidos en presencia de metanol (FAME) en la totalidad del transcurso temporal tras la inducción. Se produjeron bajos niveles de ácidos grasos libres tanto en presencia de etanol como en presencia de metanol.

Los resultados demuestran que la expresión de éster sintasa ES9 en *E. coli* MG1655 DV2  $\Delta$ fadD dio como resultado altos niveles de producción de ésteres y bajos niveles de producción de ácidos grasos libres en presencia de metanol y etanol. Además, este ejemplo demuestra que la producción de ésteres en *E. coli* MG1655 DV2  $\Delta$ fadD que expresa éster sintasa ES9 fue significativamente mayor en presencia de etanol que en presencia de metanol.

#### Ejemplo 11

Este ejemplo describe la construcción de una biblioteca de mutantes de éster sintasa, en la que cada miembro contiene una sustitución de aminoácido para glicina en la posición 395 de ES9.

Cuando se sometió la secuencia de la éster sintasa ES9 de *M. hydrocarbonoclasticus* DSM 8798 (n.º de registro de GenBank ABO21021,1) a una búsqueda en BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), se identificaron varios homólogos bacterianos de éster sintasa. La alineación de secuencias de estas éster sintasas microbianas reveló un patrón general de un aminoácido ácido en la posición 395 de ácido glutámico o ácido aspártico, a pesar del hecho de que la secuencia notificada de éster sintasa ES9 contenía una glicina en el aminoácido 395.

Se mutó el residuo de glicina en la posición 395 de ES9 a cada uno de los 20 residuos de aminoácido convencionales para evaluar el efecto de la sustitución de aminoácido en esta posición. Se crearon los mutantes usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio múltiple QuikChange® de Stratagene (Stratagene, La Jolla, CA). Se usó el cebador G395Xf, tal como se muestra en la tabla 7, junto con un cebador específico de vector para generar una combinación de fragmentos de éster sintasa en 3' que codificaban para los 20 residuos de aminoácido posibles en la posición 395. Se usó un cebador inverso complementario a la parte en 5' de G395Xf, designada G395Xr, junto con un cebador específico de vector para generar los fragmentos de éster sintasa en 5'. Entonces se ensambló cada uno de los fragmentos en 3' con los fragmentos en 5' mediante extensión por solapamiento para reconstituir una combinación aleatorizada de secuencias génicas que codifican para una secuencia con 20 residuos de aminoácido diferentes en la posición 395.

TABLA 7

Cebador	Secuencia de cebador 5' – 3'
G395Xf	CCATTTCCAACGTGCCCGGCCCGGAANNKACGCTGTATTATGAAGG (SEQ ID NO: 47), en la que N es cualquier base y K es G o T
G395Xr	TTCCGGGCCGGGCACGTTGGAAATGG (SEQ ID NO: 52)

Se sometió entonces la combinación aleatorizada de secuencias mutantes de éster sintasa a electroporación en células de *E. coli* MG1655 DV4/1/2Km<sup>R</sup>Cm<sup>R</sup>/pKD46 electrocompetentes, que se prepararon según la descripción a continuación.

Se obtuvo un primer gen que contenía el promotor y el marco de lectura abierto para la resistencia a cloranfenicol (SEQ ID NO: 157) a partir del plásmido pKD3 (véase, Datsenko *et al.*, citado anteriormente). Por separado, se obtuvo una parte de un segundo gen que contenía el promotor y las primeras 531 bases del gen de resistencia a

kanamicina (SEQ ID NO: 158) a partir del plásmido pKD13 (véase, Datsenko *et al.*, citado anteriormente). Se construyó un casete de resistencia uniendo en primer lugar el primer gen con el segundo gen, estando el primer gen en el sentido de 5' del segundo gen. Se añadió una secuencia homóloga de 50 pares de bases en el extremo 3' de la secuencia del gen *lacZ* (SEQ ID NO: 159) en el sentido de 3' del gen de resistencia a cloranfenicol, y se añadió una secuencia de gen *lacI* (SEQ ID NO: 160) en el sentido de 5' del gen de resistencia parcial a kanamicina. Entonces se usó este casete de resistencia para transformar una cepa de *E. coli* MG1655 DV4, que se había transformado previamente con pKD46 tal como se describe a continuación.

Se transformó un plásmido pKD46 (véase, Datsenko *et al.*, citado anteriormente) en *E. coli* MG1655 DV4 (véase el ejemplo 3). Se hizo crecer esta cepa DV4/pKD46 sobre un medio sólido que contenía 100 µg/ml de cabenicilina durante la noche a 32°C. Entonces se usó una colonia individual para inocular un cultivo durante la noche de LB que contenía 100 µg/ml de cabenicilina. Tras 16 h de crecimiento a 32°C, se diluyó el cultivo de DV4/pKD46 1 a 500 en un medio LB que contenía 100 µg/ml de cabenicilina, arabinosa y MgCl<sub>2</sub> para inducir la expresión de los genes de recombinasa a partir de pKD46. Se monitorizó el crecimiento midiendo la DO600, y cuando alcanzó aproximadamente 0,6, se hizo que las células fueran electrocompetentes y se transformaron con el casete de resistencia.

Se permitió que se recuperasen las células transformadas durante 3 h en medios SOC no selectivos antes de sembrarlas en placa sobre medios selectivos para cloranfenicol sólidos, que contenían 34 µg/ml de cloranfenicol, X-gal e IPTG. Se confirmaron las inserciones correctas usando PCR de colonias, selección de azul/blanco y secuenciación de ADN. Esta cepa se denominó *E. coli* MG1655 DV4/1/2Km<sup>R</sup>Cm<sup>R</sup>/pKD46. Entonces se sometió a tratamiento con arabinosa durante 3-4 h antes de que se transformaran las secuencias mutantes de éster sintasa

Tras la transformación, se permitió que se recuperasen los cultivos y se sembraron en placa sobre medio agar LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina y se permitieron crecer durante la noche a 32°C. Se secuenciaron 96 clones de esta placa para verificar los tipos de mutaciones pretendidas en la posición 395 de ES9. Entonces se evaluó la capacidad para producir ácido graso/ésteres grasos de cada uno.

Se hizo crecer un cultivo de siembra de cada clon en placas de 96 pocillos en caldo LB complementado con 50 µg/ml de kanamicina a 32°C. Tras un crecimiento durante 6 h, se diluyeron los cultivos 1 a 10 en 2N-BT (glucosa al 2%, medio limitado en nitrógeno, Bis-Tris 0,2 M, pH 7,0, Triton al 0,1%) más 50 µg/ml de kanamicina y se hicieron crecer durante la noche a 32°C. Tras el crecimiento durante la noche, se diluyeron los cultivos de nuevo 1 a 10 en 4N-BT (glucosa al 4%, medio limitado en nitrógeno, Bis-Tris 0,2 mM, pH 7,0, Triton al 0,1%) y se hicieron crecer a 32°C durante 6 h. Entonces se añadieron IPTG y etanol a cada cultivo para lograr una concentración final de 1 mM y el 2% (v/v), respectivamente. 22 h tras la inducción, se acidificaron los cultivos usando 40 µl de HCl 1 M y se extrajeron con 400 µl de lactato de n-butilo. Se midieron las cantidades de especies grasas (incluyendo, por ejemplo, ácidos grasos y ésteres grasos) en los extractantes usando CG-FID.

Tal como puede observarse en la figura 9, que representa las puntuaciones z de los títulos de producción de las cepas mutantes y silvestres, y en la que se fijó la mediana del título de la cepa de producción que expresa ES9 silvestre en 0, las muestras en las que se reemplazó el residuo de glicina en la posición 395 de ES9 por o bien una arginina o bien un residuo de lisina residuo dieron como resultado los aumentos más significativos en la producción de especies grasas. Por ejemplo, la puntuación z para la cepa mutante G395R fue superior a 10, y la puntuación z para la cepa mutante G395K fue de aproximadamente 9. Además, se calcularon los valores de p para evaluar la significación estadística en cuanto a las mejoras del título. La mejora de la productividad de la cepa mutante G395R tuvo un valor de p de 1,74E-19, y la mejora de la productividad de la cepa mutante G395K tuvo un valor de p de 5,42E-05, y esas mejoras fueron estadísticamente significativas.

#### Ejemplo 12

Este ejemplo demuestra que la expresión de un mutante de éster sintasa de la éster sintasa ES9 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, en el que se reemplazó glicina en el residuo de aminoácido 395 de la secuencia notificada por otros varios residuos de aminoácido, puede usarse para producir ésteres *in vivo* en presencia de un sustrato de alcohol adecuado.

Se usaron los siguientes cebadores para retirar fragmentos mutantes y silvestres de éster sintasa de sus transformantes de *E. coli* MG1655 DV4/1/2Km<sup>R</sup>Cm<sup>R</sup>/pKD46 del ejemplo 11:

ES9BspHF 5' - ATCATGAAACGTCTCGGAAC - 3' (SEQ ID NO: 37); y

ES9XhoR 5' - CCTCGAGTTACTTGCGGGTTCGGGCGCG - 3' (SEQ ID NO: 38)

Los fragmentos de éster sintasa que se obtuvieron a partir de los transformantes de *E. coli* MG1655 DV4/1/2Km<sup>R</sup>Cm<sup>R</sup>/pKD46 usando estos cebadores fueron ES9 silvestre, y los mutantes G395R, G395S, G395K, G395S y G395D. Entonces se clonaron estos fragmentos en el sentido de 3' del promotor inducible por IPTG en un vector pCL1920 usando los sitios de restricción NcoI y HindIII.

Se transformaron los plásmidos resultantes en *E. coli* MG1655 DV2  $\Delta$ *fadD* electrocompetentes (véase el ejemplo 4) y se sembraron en placas de LB que contenían 100 mg/l de espectinomicina, se incubaron durante la noche a 37°C, y se purificaron.

5 Se hicieron crecer cepas DV2  $\Delta$ *fadD* purificadas que expresaban ES9, y los mutantes G395R, G395S, G395K, G395S y G395D en frascos de agitación de 15 ml y se indujeron con IPTG 1 mM y metanol al 2% (v/v). Tras la inducción, se tomaron muestras de cada frasco con agitación a las 15,5 h, 40 h y 65 h, y se determinaron los niveles de producción de ácidos grasos libres y FAME en estos puntos de tiempo usando CG-FID. Los resultados se muestran en la figura 10A.

10 También se hizo un seguimiento del crecimiento celular durante la fermentación tomando pequeñas muestras del caldo de fermentación y midiendo la DO600. El resultado se muestra en la figura 10B.

Tal como se muestra en la figura 10A, las cepas que expresan ES9, que tienen un residuo de glicina en la posición 395, así como las cepas que expresan los mutantes G395R, G395K, G395D y G395E de ES9, produjeron todas FAME y ácidos grasos libres sustanciales en presencia de metanol. En cambio, la cepa que expresa el mutante G395S produjo poca cantidad, en caso de producir alguna, de FAME y/o ácidos grasos libres.

15 En presencia de metanol, la cepa de producción que expresa la éster sintasa mutante G395R produjo aproximadamente 1.800 g/l de FAME/FFA, mientras que la cepa de producción que expresa la éster sintasa mutante G395K produjo aproximadamente 1.400 g/l de FAME/FFA. En comparación con la cantidad de FAME/FFA producida por la cepa de producción que comprende la éster sintasa ES9 silvestre, estos dos mutantes parecieron tener una capacidad sustancialmente mejorada para producir ácidos grasos y derivados de los mismos. La sustitución del residuo de glicina en la posición 395 de ES9 por residuos de aminoácido ácidos no dotó a la cepa de producción de una capacidad mejorada para producir ácidos grasos y/o derivados. Ni lo hizo la sustitución del residuo de glicina en la posición 395 de ES9 por un residuo de cisteína.

20 Los resultados demuestran que la mutación de glicina a un residuo de aminoácido básico tal como un residuo de lisina o arginina en la posición de aminoácido 395 en la secuencia notificada de éster sintasa ES9 proporciona una variante mejorada de éster sintasa que puede utilizarse para lograr una producción mejorada de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos.

Ejemplo 13

30 Este ejemplo describe homólogos de éster sintasa con actividad y/o especificidad alteradas hacia acil-ACP con respecto a acil-CoA o beta-hidroxi-acil-ACP. Se identificaron cuatro homólogos de éster sintasa basándose en análisis bioinformáticos y se describen en la siguiente tabla. Se evaluaron estos homólogos de éster sintasa para determinar su actividad:

TABLA 8:

Nombres dados	Fuente del organismo	Número de registro	SEQ ID
ES1	<i>Marinobacter algicola</i> DG893	ZP_01893763	SEQ ID NO: 39
ES2	<i>Limnobacter</i> sp. MED105	ZP_01915979	SEQ ID NO: 41
ES3	Metagenoma marino	EDJ50241	SEQ ID NO: 43
ES4	Muestra de ballena muerta n.º 3	2001496676*	SEQ ID NO: 45

\* número de identificación IMG

En la tabla a continuación se enumeran el porcentaje de identidad y el porcentaje de similitud de estos homólogos con la secuencia notificada de éster sintasa ES9:

35 TABLA 9:

	Éster sintasa ES9	
	% de identidad	% de similitud
ES1	85	91
ES2	51	68
ES3	39	56
ES4	36	56

Se realizó la optimización de codones en *E. coli* de las secuencias de nucleótidos de los cuatro homólogos de éster sintasa anteriores (SEQ ID NO: 40, 42, 44, 46) y se sintetizaron usando DNA2.0 (DNAstar, Menlo Park, CA) y luego se clonaron en el sentido de 3' del promotor inducible por IPTG *P<sub>trc</sub>* en un vector pCL1920 usando los sitios NcoI y HindIII.

40 Se transformaron los plásmidos resultantes en *E. coli* MG1655 DV2  $\Delta$ *fadD* para la evaluación en frascos de agitación. En la figura 11, se indican los títulos de producción de FAME resultantes, cuando se alimentaron las células con metanol. En la figura 12, se indican se indican los títulos de producción de FAEE resultantes, cuando se

alimentaron las células con etanol.

#### Ejemplo 14

Este ejemplo describe un proceso de fermentación para producir una composición de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos usando los microorganismos modificados por ingeniería genética descritos en el presente documento.

- 5 Se usó un proceso de fermentación y recuperación para producir biodiésel de calidad de grado comercial mediante fermentación de hidratos de carbono.

10 Se desarrolló un proceso de fermentación para producir una mezcla de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) y ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) para su uso como biodiésel usando los microorganismos modificados por ingeniería genética descritos en los ejemplos 1-12. Se lleva a cabo la fermentación de cualquier manera conocida por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, se lleva a cabo la fermentación en un fermentador a escala de laboratorio de 2 a 10 l. Estos protocolos a modo de ejemplo pueden ampliarse a escala como cualquier otra fermentación de *E. coli*, usando métodos conocidos por un experto habitual en la técnica.

15 En una realización, se llevó a cabo una serie de fermentación en un fermentador de 2 l. Se hicieron crecer células de *E. coli* de una disolución madre congelada en un medio definido que consistía en 4,54 g/l de  $K_2HPO_4$  trihidratado, 4 g/l de  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,15 g/l de  $MgSO_4$  heptahidratado, 20 g/l de glucosa, tampón Bis-tris 200 mM (pH 7,2), 1,25 ml/l de disolución de oligoelementos y 1,25 ml/l de disolución de vitaminas. La disolución de oligoelementos se componía de 27 g/l de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 2 g/l de  $ZnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 2 g/l de  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ , 2 g/l de  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 1,9 g/l de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0,5 g/l de  $H_3BO_3$  y 100 ml/l de HCl concentrado. La disolución de vitaminas se componía de 0,42 g/l de riboflavina, 5,4 g/l de ácido pantoténico, 6 g/l de niacina, 1,4 g/l de piridoxina, 0,06 g/l de biotina y 0,04 g/l de ácido fólico.

20 Se hicieron crecer cincuenta (50) ml de un cultivo descrito en el presente documento durante la noche y se usó posteriormente para inocular 1 l de un medio que contenía 0,5 g/l de  $(NH_4)_2SO_4$ , 2,0 g/l de  $KH_2PO_4$ , 0,15 g/l de  $MgSO_4$  heptahidratado, 0,034 g/l de citrato férrico, 2,5 g/l de casaminoácidos Bacto, 10 g/l de glucosa, 1,25 ml/l de disolución de oligoelementos 2, y 1,25 ml/l de disolución de vitaminas. La disolución de oligoelementos 2 contenía 2 g/l de  $ZnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 2 g/l de  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ , 2 g/l de  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 1,9 g/l de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0,5 g/l de  $H_3BO_3$  y 100 ml/l de HCl concentrado. La disolución de vitaminas era la misma que se describió para el medio de cultivo de inóculo.

25 El fermentador estaba equipado con controles de temperatura, pH, agitación, aireación y oxígeno disuelto. Las condiciones de fermentación preferidas incluyen una temperatura de 32°C, un pH de 6,8 y un nivel de oxígeno disuelto (DO) de aproximadamente el 30% de saturación. Se mantuvo el pH mediante adiciones de  $NH_4OH$ , que también actuó como fuente de nitrógeno para el crecimiento celular. Cuando casi se consumió la glucosa inicial, se suministró al fermentador una alimentación que consistía en 600 g/l de glucosa, 3,9 g/l de  $MgSO_4$  heptahidratado, 1,6 g/l de  $KH_2PO_4$ , 2,5 g/l de casaminoácidos, 0,05 g/l de citrato férrico, 20 ml/l de la disolución de oligoelementos 2 y 2 ml/l de disolución de vitaminas. Se estableció la tasa de alimentación para permitir una tasa de crecimiento celular de 0,3  $h^{-1}$ , para hasta un máximo de 10 g de glucosa/l/h, punto en el que se fijó. Se mantuvo esta tasa durante el resto de la serie de fermentación siempre que no se acumulase glucosa en el fermentador. Evitando la acumulación de glucosa, fue posible reducir o eliminar la formación de subproductos tales como acetato, formiato y etanol, que se producen si no comúnmente por *E. coli*. En las fases tempranas de crecimiento, se indujo la producción de FAEE mediante la adición de IPTG 1 mM y 10 ml/l de etanol puro. Se continuó la fermentación durante un periodo de 3 días.

30 Se añadió etanol varias veces durante la serie para reponer lo que se consumiera por las células para la producción de ésteres etílicos grasos, pero principalmente lo que se perdía por evaporación en el gas residual. Las adiciones ayudaron a mantener la concentración de etanol en el caldo de fermentación a un nivel de entre 10 y 20 ml/l, con el fin de promover una producción eficaz sin inhibir el crecimiento celular. Se hizo un seguimiento del avance de la serie de fermentación mediante mediciones de la DO600, el consumo de glucosa y la producción de ésteres.

35 También se amplió a escala este protocolo de fermentación hasta un fermentador de 700 l. Los métodos analíticos utilizados tras las series de fermentación se describen en los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo 15

40 Este ejemplo describe los procedimientos analíticos usados para detectar el consumo de glucosa, y las producciones de ácidos grasos libres y/o ésteres de ácidos grasos. Se analizó el consumo de glucosa en la totalidad de la fermentación mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). Se realizó el análisis mediante HPLC según métodos comúnmente usados en la técnica para medir azúcares y ácidos orgánicos, que implican normalmente los siguientes equipos y condiciones: Agilent HPLC Serie 1200 (Agilent Technology, Santa Clara, CA) con detector de índice de refracción; columna Aminex HPX-87H, 300 mm x 7,8 mm (catálogo: 125-0140); temperatura de columna: 50°C; intervalo de pH: 1-3; fase móvil:  $H_2SO_4$  0,005 M (acuoso); velocidad de flujo: 0,6 ml/min; volumen de inyección: 5  $\mu$ l; tiempo de ejecución: 25 min.

Se analizó la producción de éster metílico o etílico de ácidos grasos mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID). Se extrajeron muestras del caldo de fermentación con acetato de etilo en una razón en volumen de 1:1. Tras agitación vigorosa en vórtex, se centrifugaron las muestras y se analizaron las fases orgánicas respectivas mediante CG. Las condiciones de análisis fueron las siguientes:

5 Instrumento: Trace GC Ultra, Thermo Electron Corp. (Marietta, OH) con detector de ionización de llama (detector FID);

Columna: DB-1 (el 1% de difenilsiloxano; el 99% de dimetilsiloxano) Col UFM 1/0,1/5/0,1 DET de Thermo Electron Corp. (n.º de pieza UFM00001010401; S/N 520070046), con pH de fase de 5, FT de 0,1 µm, longitud de 5 m y un diámetro interno de 0,1 mm;

10 Condiciones de entrada: 300°C, fraccionamiento 1/300 con un flujo de fraccionamiento de 150 ml/min, tiempo de ejecución total: 2 min;

Gas portador/velocidad de flujo: Helio/0,5 ml/min;

Temperatura de bloque: 260°C;

15 Temperatura de horno: 0,3 min mantener a 140°C; aumentar en rampa a 100°C/min hasta 300°C; mantener durante 0,05 min, tiempo de ejecución total: 4 min.

Temperatura de detector: 300°C;

Volumen de inyección: 1 µl.

20 Se hizo un seguimiento de la producción de éster metílico o etílico graso mediante cromatografía de gases conectada con un detector de espectrometría de masas (CG-EM). Se extrajeron muestras de los caldos de fermentación con acetato de etilo o acetato de butilo en una razón en volumen de 1:1. Tras agitación vigorosa en vórtex, se centrifugaron las muestras y se analizaron las fases orgánicas respectivas mediante CG-EM en un aparato Agilent 6850 (Agilent Technology, Santa Clara, CA) equipado con un MSD 5975B VL. Se extrajeron los iones mediante monitorización de iones individuales. Las condiciones de análisis fueron las siguientes:

25 Temperatura de horno: 3,00 min mantener a 100°C, aumentar en rampa a 20°C/min hasta 320°C y mantener durante 5 min, con un tiempo de ejecución total de 19 min;

Columna capilar: DB-5 MS UI, capilar de 30,0 m x 250 µm x 0,250 µm x 0,25 µm nominal;

Gas portador/velocidad de flujo/presión: Helio/1,2 ml/min/12,56 psi;

Condición de entrada: 320°C sin fraccionamiento;

Velocidad de flujo total: 16,2 ml/min;

30 Ejemplo 16

Este ejemplo demuestra que pueden producirse ésteres etílicos de ácidos grasos mediante la fermentación de una cepa de *E. coli* que expresa una éster sintasa, en ausencia de una tioesterasa y/o una acil-CoA sintasa.

35 Se transformaron *E. coli* MG1655 DV2 y DV2  $\Delta$ fadD, tal como se describe en los ejemplos 2 y 4, respectivamente, con el plásmido pDS57 (SEQ ID NO: 23), tal como se describe en el ejemplo 5. Se hicieron crecer las cepas resultantes DV2 pDS57 y DV2  $\Delta$ fadD pDS57 en fermentadores de 2 y 5 l según el protocolo de fermentación del ejemplo 14. Los resultados representativos del análisis de FAEE, FFA, y el rendimiento total de FAEE para cada cepa se muestran en la tabla 10. Se expresa el rendimiento como los gramos de producto obtenidos por 100 gramos de fuente de carbono usada.

TABLA 10

Parámetro	DV2 pDS57	DV2 $\Delta$ fadD pDS57
Concentración de FAEE (g/l)	5,9	7,3
Concentración de FFA (g/l)	0,3	0,5
Rendimiento de FAEE con respecto a glucosa (%)	5,6	6,1

40 Los resultados indican que pueden producirse altos niveles de ésteres etílicos de ácidos grasos y bajos niveles de ácidos grasos libres mediante la fermentación de cepas de *E. coli* DV2 y DV2  $\Delta$ fadD que expresan éster sintasa ES9.

Ejemplo 17

Este ejemplo demuestra que pueden producirse ésteres de ácidos grasos mediante la alimentación de ácidos grasos y alcoholes a una cepa microbiana que contiene una éster sintasa nativa (es decir, no recombinante). Se usó una cepa de *Funibacter jadensis* como ejemplo de una cepa microbiana que contiene una éster sintasa de este tipo. Se cultivó en un medio de agua de mar.

- 5 Se preparó un medio de agua de mar y se esterilizó en autoclave: 23,6 g/l de NaCl, 0,64 g/l de KCl, 4,53 g/l de MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 5,94 g/l de MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O. Se ajustó el pH a 7,2 con NaHCO<sub>3</sub>.

- 10 Se obtuvo la cepa *Funibacter jadensis* T9 (DSM 12178) de la DSMZ (<http://www.dsmz.de>). Se hizo crecer la cepa en 25 ml del medio de agua de mar, complementado con 100 µl de palmitato de sodio (al 1% en H<sub>2</sub>O) y uno de los cuatro alcoholes enumerados en la tabla 11. Tras 18 h de crecimiento a 30°C, se extrajeron los caldos de cultivo con 20 ml de acetato de etilo. Luego, se analizaron con CG/EM las fases de acetato de etilo respectivas de los extractantes de acetato de etilo. Se enumeraron los tipos de ésteres que se produjeron en la tabla 11. La figura 13 representan los espectros de CG/EM de palmitato de etilo y palmitato de isopropilo producidos por la cepa *F. jadensis* T9 alimentada con etanol e isopropanol, respectivamente, en los paneles central e inferior.

TABLA 11

Alcoholes	Ésteres producidos
Etanol (250 µl)	Palmitato de etilo
Isopropanol (250 µl)	Palmitato de isopropilo
Butanol (250 µl)	Palmitato de butilo
Hexadecanol (250 µl, al 100% p/v en DMSO)	hexadecanoato de hexadecanoilo
Control (250 µl de H <sub>2</sub> O)	palmitato

#### 15 Ejemplo 18

- Este ejemplo demuestra la producción de derivados de ácidos grasos en una célula huésped de *E. coli* silvestre en presencia de un nivel no atenuado de *fadE* endógeno. El gen *fadE* codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, que cataliza la etapa inicial en la degradación de acil-CoA grasos. Por tanto, *fadE* se considera a menudo necesario cuando se producen derivados de ácidos grasos usando acil-CoA como sustratos. Sin embargo, las células de producción de derivado de ácidos grasos de la presente invención pueden usar acil-ACP como sustratos. Por tanto, la presencia de una acil-CoA deshidrogenasa no provocará necesariamente la degradación de los sustratos. Este ejemplo demuestra que, en efecto, la expresión endógena de *fadE* puede dejarse intacta sin afectar a la producción de derivados de ácidos grasos.

- 25 Se transformó el plásmido pDS57 (SEQ ID NO: 23, véase el ejemplo 6), que coloca ES9 bajo el control transcripcional del promotor *trc*, en una cepa de *E. coli* MG1655 electrocompetente. Se transformó el mismo plásmido en la cepa de *E. coli* MG1655 D1 (o *E. coli* MG1655Δ*fadE*, véase el ejemplo 1) para servir como comparación. Se hicieron crecer las cepas en frascos de agitación y se evaluaron usando el protocolo de fermentación en frascos de agitación convencional, tal como el descrito en el ejemplo 7, citado anteriormente. Cuando se indujeron cepas con IPTG 1 mM, también se complementaron con etanol, hasta un volumen final del 2% (v/v). Se tomaron cuatro puntos de tiempo y se analizaron las cepas para determinar su crecimiento, y para determinar la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos. Los resultados se representan en las figuras 11 y 12. Ambas cepas tuvieron perfiles de crecimiento (figura 11) y perfiles de producción de ésteres etílicos de ácidos grasos (figura 12) casi idénticos. La cepa MG1655 pDS57 pudo producir aproximadamente 2 g/l de FAEE, demostrando que ES9 puede producir éster directamente en una cepa silvestre sin un *fadE* atenuado.

- 35 También se determinó que la acumulación de ácidos grasos libres fue inferior a 20 mg/l en total para cada cepa.

#### Ejemplo 19

- Este ejemplo proporciona un método a modo de ejemplo para la expresión de un polipéptido de éster sintasa en una *Saccharomyces cerevisiae*. Las tioesterasas y/o acil-CoA sintasas endógenas u otras enzimas de degradación de ácidos grasos, si están presentes, pueden atenuarse o deleccionarse funcionalmente usando los métodos apropiados tal como se describe en el presente documento.

- 45 El vector pRS425 de tipo plásmido episomal de levadura (YE<sub>p</sub>) (Christianson *et al.*, Gene 110:119-122 (1992)) contiene secuencias del plásmido endógeno de 2 micrómetros de *Saccharomyces cerevisiae*, un marcador seleccionable LEU2 y secuencias basadas en el esqueleto de un fagémido multifuncional, pBluescript II SK(+). Se clona el promotor fuerte de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) constitutivo de *Saccharomyces cerevisiae*, entre los sitios SacII y SpeI de pRS425 usando el método descrito por Jia *et al.*, Physiol. Genomics 3:83-92 (2000) para producir pGPD-425 (SEQ ID NO: 50). Se introduce un sitio NotI en el sitio BamHI de pGPD-425, proporcionando un sitio NotI flanqueado por sitios BamHI, y este plásmido se denomina pY75 (SEQ ID NO: 48).

Se trata en primer lugar un gen de éster sintasa de interés, tal como, por ejemplo, uno que codifica para un polipéptido seleccionado de SEQ ID NO: 18, 24, 25 y 26, o una variante de los mismos, de manera que pueden

ligarse los fragmentos de ADN en el sitio NotI único de pY75 (SEQ ID NO: 48). Antes de su uso para la clonación, se linealiza el vector pY75 con NotI, se rellena con ADN polimerasa de T4 y se desfosforila con fosfatasa alcalina de gamba (New England Biolabs, Ipswich, MA). Entonces se aísla el ADN de plásmido usando técnicas convencionales. Se realizan digestos de restricción con EcoRI para identificar clones plasmídicos en los que el codón de iniciación está en la proximidad del extremo 3' del promotor GPD de pY75 (orientación sentido del gen de éster sintasa). El plásmido se denomina pY75\_ES.

Se usa un vector pY75 vacío como control. Se transforman ADN de plásmido de pY75\_ES y ADN de plásmido de vector pY75 vacío en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando métodos convencionales tales como los descritos en Gietz *et al.*, Met. Enzymol. 350:87-96 (2002). Se seleccionan colonias de levaduras recombinantes en medios DOBA complementados con CSM-leu (Qbiogene, Carlsbad, CA). Se alimentan los cultivos con sustratos de alcohol adecuados. Se aíslan los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos resultantes de la célula huésped usando los métodos en el presente documento. Se determina la cantidad de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos producidos usando técnicas conocidas tales como, por ejemplo, CG/EM.

#### Ejemplo 20

Este ejemplo proporciona un método a modo de ejemplo para la expresión de una éster sintasa en una *Yarrowia lipolytica*.

Se construye un vector pFBAIN-MOD-1 según los métodos de la publicación PCT n.º WO2008/147935, cuyas divulgaciones se incorporan como referencia al presente documento. Se presenta una representación pictórica de las características de este vector en el presente documento como la figura 18.

Se liga una éster sintasa de interés en el pFBAIN-MOD-1 predigerido con NcoI y NotI (SEQ ID NO: 51). La reacción de ligamiento contiene 10 µl de tampón de ligamiento 2 x, 1 µl de ADN ligasa de T4 (Promega, Madison, WI), 3 µl (~ 300 ng) de un fragmento de polinucleótido de éster sintasa y 1 µl de pFBAIN-MOD-1 (~ 150 ng). Entonces se incubaba la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 h y se usa para transformar células de *E. coli* Top10 competentes (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se recuperan los ADN de plásmido de los transformantes usando un kit Qiagen Miniprep (Valencia, CA). Se identifican los clones correctos mediante mapeo de restricción y los constructos finales se designan como pFBAIN\_ES.

Se transforman un clon de pFBAIN\_ES y un plásmido de control pFBAIN-MOD-1 en una cepa de *Yarrowia lipolytica*, por ejemplo, Y\_FOA<sup>R</sup>. Se prepara Y\_FOA<sup>R</sup> obteniendo células de *Yarrowia lipolytica* ATCC n.º 20362 y sembrándolas en una placa de agar YPD (que contiene 10 g/l de extracto de levadura (DIFCO Labs, Detroit, MI), 20 g/l de peptona Bacto (DIFCO) y 20 g/l de glucosa). Posteriormente se cultivan las células en líneas sobre una placa con medio mínimo (MM) (que contiene 75 mg/l de cada uno de uracilo y uridina, 6,7 g/l de YNB (base nitrogenada de levadura) con sulfato de amonio, sin aminoácidos y 20 g/l de glucosa) que contiene 250 mg/l de 5-FOA (Zymo Research, Orange, CA). Pueden incubarse las placas a 28°C, y se cultivan las colonias resultantes en zonas por separado sobre placas con MM que contienen 200 mg/ml de 5-FOA y placas con MM que carecen de uracilo y uridina. Por tanto se obtiene auxotrofia de Ura3 y la cepa resultante es la cepa Y\_FOA<sup>R</sup>.

Se siembran las células procedentes de la transformación sobre placas con MM que carecen de uracilo y (base nitrogenada de levadura al 0,17% (DIFCO Labs) sin sulfato de amonio o aminoácidos, glucosa al 2%, prolina al 0,1%, pH 6,1, 20 g/l de agar) y se mantienen a 30°C durante 2 d. Entonces se usan algunos transformantes para inocular cultivos de 25 ml individuales en medio MM (YNB al 0,17% (DIFCO) sin sulfato de amonio o aminoácidos, glucosa al 2%, prolina al 0,1%, (pH 6,1). Se permite que crezca cada cultivo durante 2 d a 30°C, luego se cambia a 25 ml de HGM (medio con alto contenido en glucosa que contiene 80 g/l de glucosa, 2,58 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,36 g/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) y se permite que crezca durante 5 d a 30°C. Se alimentan los cultivos con sustratos de alcohol adecuados.

Entonces se extraen las especies grasas totales y puede determinarse y/o medirse la producción de ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos usando los métodos descritos en el presente documento.

#### Ejemplo 21

Este ejemplo describe la expresión de una éster sintasa en una célula huésped cianobacteriana.

Se preparan vectores adecuados para producir ácidos grasos y/o derivados de los mismos en células huésped cianobacterianas incluyendo, por ejemplo, células de *Synechococcus sp.* PCC7002, *Synechococcus elongatus* PCC7942 o *Synechocystis sp.* PCC6803. Entonces se clona en esos vectores una éster sintasa de interés, por ejemplo, una atfA1 (de *A. borkumensis* SK2, n.º de registro de GenBank YP\_694462), AtfA2 (de *A. borkumensis* SK2, n.º de registro de GenBank YP\_693524), ES9 (de *M. hydrocarbonoclasticus* DSM 8789, n.º de registro de GenBank ABO21021), ES8 (de *M. hydrocarbonoclasticus* DSM 8789, n.º de registro de GenBank ABO21020), y variantes de las mismas, opcionalmente integradas en el cromosoma bajo el control de un promotor adecuado (por ejemplo, PTrc).

Se construye un vector para lograr la recombinación homóloga en *Synechococcus sp.* PCC7002 pAQ1 [n.º de registro de GenBank NC\_0050525] usando regiones homólogas de 500 pb correspondientes a las posiciones 3301-

- 3800 y 3801-4300. Un marcador seleccionable, tal como un casete de resistencia a espectinomicina que contiene el gen de aminoglicósido 3'-adeniltransferasa, *aad*, un promotor y un terminador se deriva del plásmido PCL1920 (según Lerner *et al.*, Nucleic Acids Res. 18:4631 (1990)). Se inserta ese marcador seleccionable en las regiones homólogas. Se prepara un plásmido, tal como pACYC177, según Chang, *et al.* J. Bacteriol. 134: 1141-1156 (1978).
- 5 Se añaden el promotor y el sitio de unión al ribosoma de la aminoglicósido fosfotransferasa, *aph*, seguido por sitios de clonación únicos apropiados que son, por ejemplo, secuencias de reconocimiento de *NdeI* y *EcoRI*. Se sintetiza este casete de integración completa y se clona en un vector pUC19 (New England Biolabs, Ipswich, MA). El plásmido resultante, pLS9-7002, permite la clonación y expresión de un gen foráneo y el suministro y la integración estable *in vivo* en *Synechococcus* sp. PCC7002 pAQ1.
- 10 Se crea un plásmido u operón sintético que contiene un gen de éster sintasa (por ejemplo, uno que codifica para ES9), y se clona en los sitios *NdeI* y *EcoRI* de pLS9-7002 en el sentido de 3' del promotor *aph* y el sitio de unión al ribosoma. Se transforma el plásmido resultante en *Synechococcus* sp. PCC7002 usando un método descrito por Stevens *et al.*, PNAS 77:6052-56 (1980).
- 15 En algunas realizaciones, se construye otro vector para recombinación homóloga en el genoma de *Synechococcus elongatus* PCC7942 (n.º de registro de GenBank CP\_000100) usando regiones homólogas de 800 pb correspondientes a las posiciones 2577844-2578659 y 2578660-2579467. Esta ubicación cromosómica se conoce como sitio neutro uno (NS1) (Mackey *et al.*, Met. Mol. Biol. 362:115-129 (2007)). Se deriva un marcador seleccionable, tal como, por ejemplo, un casete de resistencia a espectinomicina y se introduce tal como se describió anteriormente. Se sintetiza este casete de integración y se clona en pUC19 (New England Biolabs). El
- 20 plásmido resultante, pLS9-7942-NS1, permite la clonación y expresión de un gen foráneo y el suministro y la integración estable *in vivo* en el genoma de *Synechococcus elongatus* PCC7942.
- Se crea un plásmido u operón sintético que comprende un gen de éster sintasa de interés, tal como se describió anteriormente, que entonces se clona en el sitio *NdeI* o *EcoRI* de pLS9-7942-NS1. Se transforma el plásmido resultante en *S. elongatus* PCC7942 según un método descrito por Mackey *et al.*, citado anteriormente.
- 25 En algunas realizaciones, se construye aún otro vector para recombinación homóloga en el genoma de *Synechocystis* sp. PCC6803 (registro de GenBank BA\_000022) usando regiones homólogas de 1300 a 1700 pb correspondientes a las posiciones 2299015-2300690, y 2300691-2302056, respectivamente. Esta ubicación cromosómica se conoce como sitio neutro RS1/2 (Shao *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 68:5026-33 (2002)). Se prepara un plásmido, tal como pACYC177, según Chang, *et al.* J. Bacteriol. 134: 1141-1156 (1978). Como marcador
- 30 seleccionable, se deriva un casete de resistencia a kanamicina (que contiene aminoglicósido fosfotransferasa, *aph*, promotor, gen y terminador) del plásmido pACYC177, y se añade entre las regiones homólogas. Adicionalmente, se añaden sitios de clonación únicos apropiados, por ejemplo, sitios de reconocimiento *NdeI* y *XbaI*. Se sintetiza este casete de integración y se clona en pUC19 (New England Biolabs). El plásmido resultante, pLS9-6803-RS, permite
- 35 la clonación y expresión de un gen foráneo y el suministro y la integración estable en el genoma de *Synechocystis* sp. PCC6803.
- Se crea un plásmido u operón sintético que contiene un gen de éster sintasa tal como se describió anteriormente, que se clona luego en el sitio *NdeI* o *XbaI* de pLS9-6803-RS. Se transforma el plásmido resultante en *Synechocystis* sp. PCC6803 según un método descrito por Zang *et al.* J. Microbiol., 45:241-45 (2007).

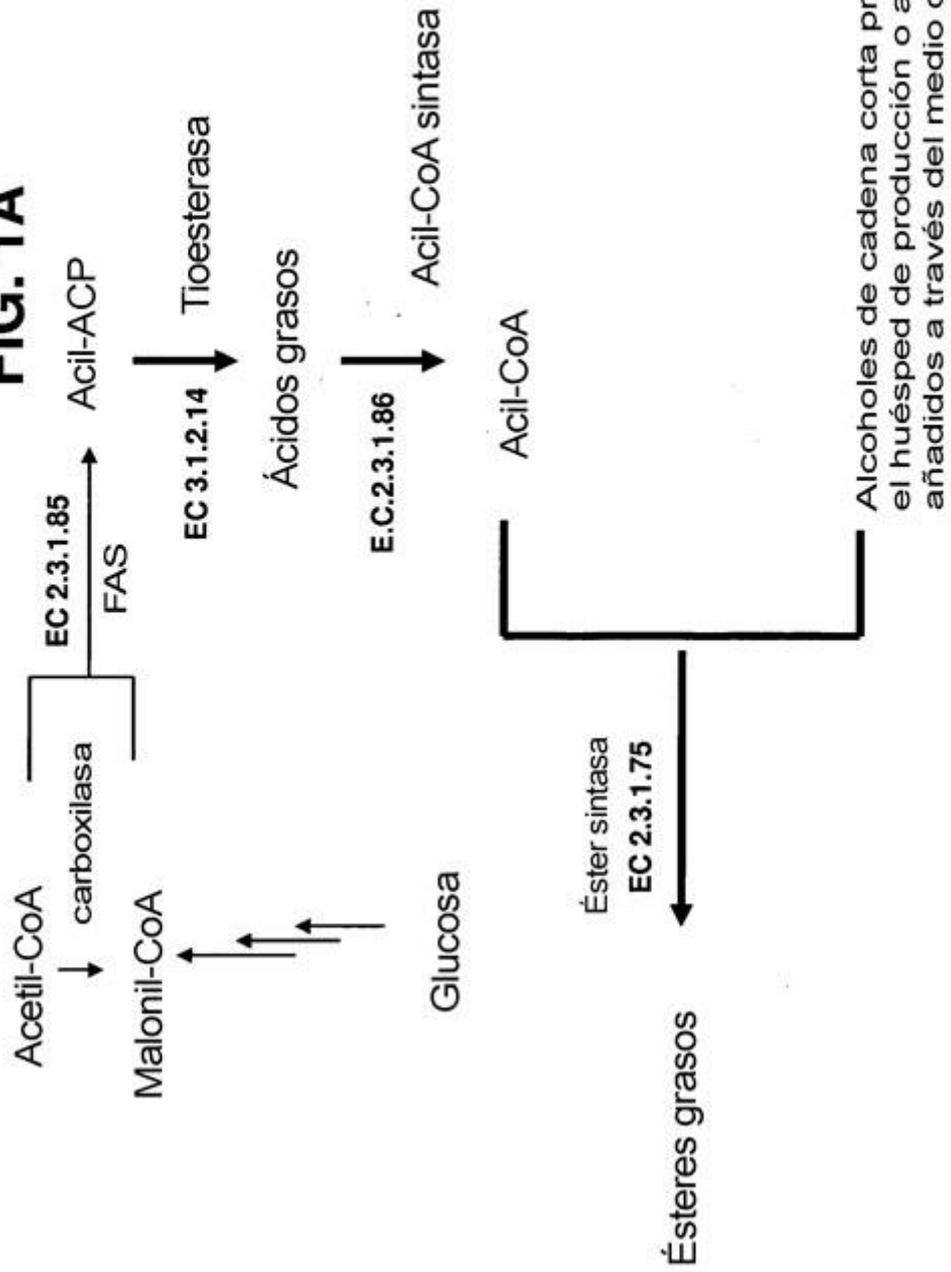
#### OTRAS REALIZACIONES

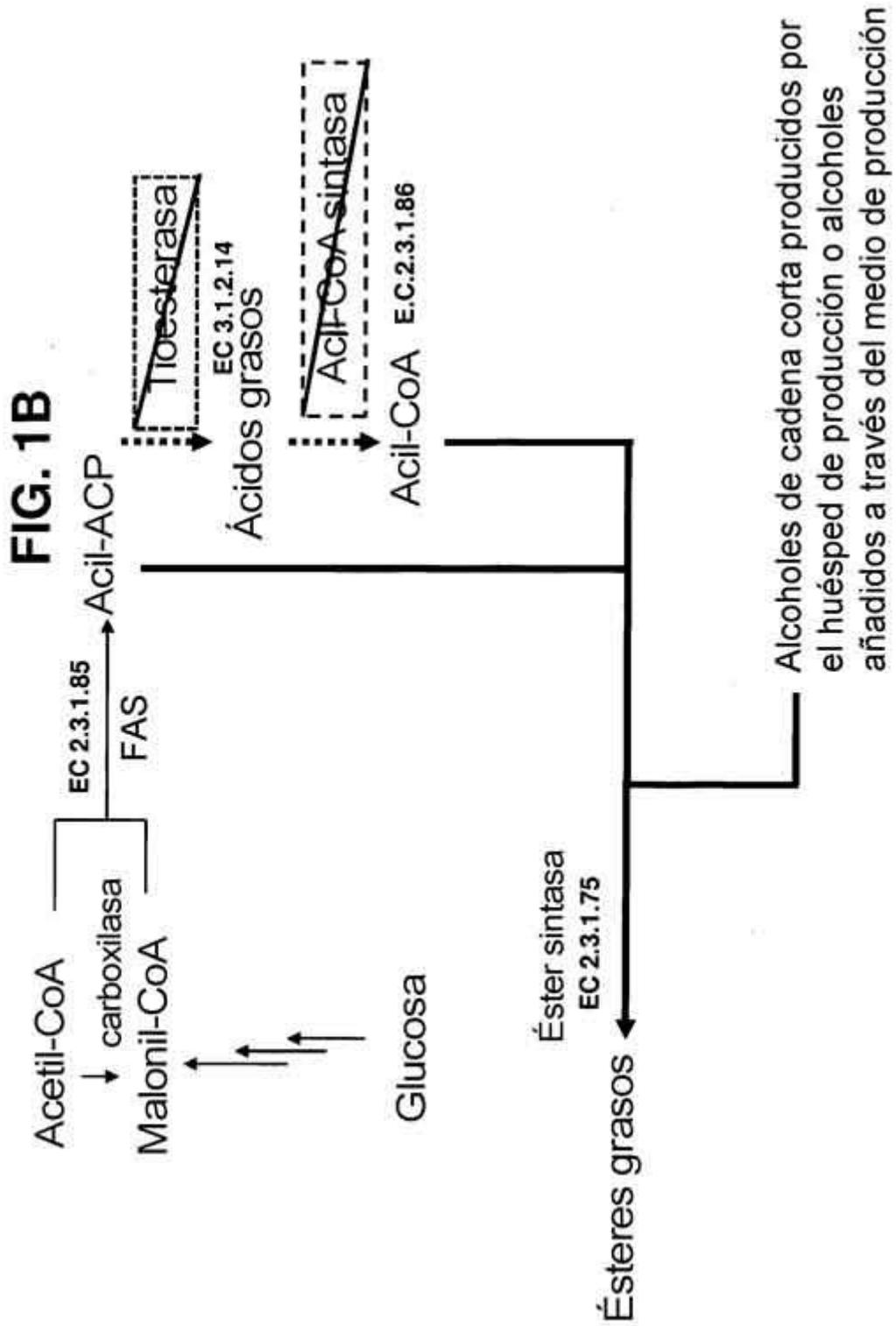
- 40 Ha de entenderse que aunque se ha descrito la invención junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que está definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Método de producción de un éster graso, comprendiendo el método cultivar una célula huésped bacteriana en presencia de una fuente de carbono, en el que la célula huésped bacteriana se modifica por ingeniería genética para sobreexpresar un gen heterólogo que codifica para una éster sintasa mejorada, y aislar el éster graso, en el que el gen codifica para un polipéptido que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y que tiene una sustitución en el residuo de glicina 395.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el gen codifica para el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 que tiene dicha sustitución en el residuo de glicina 395.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el residuo de glicina 395 se reemplaza por un residuo de aminoácido básico.
4. Método según la reivindicación 3, en el que el residuo de aminoácido básico es un residuo de lisina o un residuo de arginina.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la célula huésped es una célula de *Escherichia* o una célula cianobacteriana.

**FIG. 1A**





**FIG. 2**

Promotor del operón de proteína ribosómica *spc* de *E. coli Pspc*

SEQ ID NO: 13

5'-gctgtttCAGTACACTCTCTCAATACGAATAAACGGCTCAGAAATGAGCCGT  
TTATTTTTTCTACCCATATCCTTGAAGCGGTGTTATAATGCCGCGCCCTCGATAT  
GGGATTTTTAACGACCTGATTTTCGGGTCTCAGTAGTAGTTGACATTAGCGGAG  
CACTAAA-3'

**FIG. 3**

**Plásmido pDS33.ES9**

SEQ ID NO: 22

5'-CACTATACCAATTGAGATGGGCTAGTCAATGATAAATTACTAGTCCTTTTCCTTTGA  
GTTGTGGGTATCTGTAAATTCTGCTAGACCTTTGCTGGAAAACCTGTAAATCTGCTA  
GACCCTCTGTAAATTCCGCTAGACCTTTGTGIGTTTTTTTGTGTTTATATTCAAGTGGTT  
ATAATTTATAGAATAAAGAAAGAATAAAAAAAGATAAAAAGAATAGATCCCAGCCC  
TGTGTATAACTCACTACTTTAGTCAGTTCGCGAGTATTACAAAAGGATGTCGCAAAC  
GCTGTTTCAGTACACTCTCTCAATACGAATAAACGGCTCAGAAATGAGCCGTTATTTTTTC  
TACCCATATCCTTGAAGCGGTGTTATAATGCCGCGCCCTCGATATGGGGATTTTTAACGAC  
CTGATTTTCGGGTCTCAGTAGTAGTTGACATTAGCGGAGCACTAAACCATGAAACGTCT  
CGGAACCCTGGACGCCTCCTGGCTGGCGGTTGAATCTGAAGACACCCCGATGC  
ATGTGGGTACGCTTCAGATTTTCTCACTGCCGGAAGGCGCACCCAGAAACCTTC  
CTGCGTGACATGGTCACTCGAATGAAAGAGGGCCGGCGATGTGGCACCACCCTG  
GGGATACAAACTGGCCTGGTCTGGTTTCCTCGGGCGCGTGATCGCCCGGCCT  
GGAAAGTCGATAAGGATATCGATCTGGATTATCACGTCCGGCACTCAGCCCTG  
CCTCGCCCCGGCGGGGAGCGCGAACTGGGTATTCTGGTATCCCAGCTGCACTC  
TAACCCCTGGATTTTTCCCGCCCTCTTTGGGAATGCCACGTTATTGAAGGCCT  
GGAGAATAACCGTTTTGCCCTTACACCAAATGCACCACTCGATGATTGACGG  
CATCAGCGGCGTGCGACTGATGCAGAGGGTGCTCACCACCGATCCCGAACGCT  
GCAATATGCCACCGCCCTGGACGGTACGCCACACCAACGCCGTGGTGCAAAA  
ACCGACAAAGAGGCCAGCGTGCCCGCAGCGGTTTCCAGGCAATGGACGCCCT  
GAAGCTCCAGGCAGACATGGCCCCCAGGCTGTGGCAGGCCGGCAATCGCCTG  
GTGCATTCGGTTCGACACCCGGAAGACGGACTGACCGCGCCCTTCACTGGACC  
GGTTTCGGTGCTCAATCACCGGGTTACCGCGCAGCGACGTTTTGCCACCAGC  
ATTATCAACTGGACCGGCTGAAAAACCTGGCCATGCTTCCGGCGGTTCCCTG  
AACGACATCGTGCTTTACCTGTGTGGCACCGCATTGCGGCGCTTCTGGCTGA  
GCAGAACAATCTGCCAGACACCCCGCTGACGGCTGGTATACCGGTGAATATCC  
GGCCGGCAGACGACGAGGGTACGGGCACCCAGATCAGTTTTATGATTGCCTCG  
CTGGCCACCGACGAAGCTGATCCGTTGAACCGCCTGCAACAGATCAAAACCTC  
GACCCGACGGGCCAAGGAGCACCTGCAGAAACTTCAAAAAGTGCCCTGACCC  
AGTACACCATGCTGCTGATGTCACCCTACATTCTGCAATTGATGTCAGGTCTCG  
GGGGGAGGATGCGACCAGTCTTCAACGTGACCATTCCAACGTGCCCGGCCCG  
GAAGGCACGCTGTATTATGAAGGAGCCGGCTTGAGGCCATGTATCCGGTATC  
GCTAATCGCTCACGGCGGCCCTGAACATCACCTGCCTGAGCTATGCCGGAT  
CGCTGAATTTCCGTTTTACCGGCTGTCCGGATACGCTGCCGAGCATGCAGAAA  
CTGGCGGTTTATACCGGTGAAGCTCTGGATGAGCTGgAATCGCTGATTCTGCCA  
CCCAAGAAGCGCGCCCGAACCCGCAAGTAACTCGAGATCTGCAGCTGGTACCATA  
TGGGgattcACCCGCTGACGAGCTTAGTAAAGCCCTCGCTAGATTTTAATGCGGATGTT  
GCGATTACTTCGCCAACTATTGCGATAACAAGAAAAAGCCAGCCTTTCATGATATAT  
CTCCCAATTTGTGTAGGGCTTATTATGCACGCTTAAAAATAATAAAAAGCAGACTTGA  
CCTGATAGTTTTGGCTGTGAGCAATATGTGCTTAGTGCATCTAACGCTTGAGTTAAG  
CCGCGCCCGCAAGCGGCGTCCGCTTGAACGAATTGTTAGACATTATTTGCCGACTAC

**FIG. 3 Cont.**

CTTGGTGATCTCGCCTTTCACGTAGTGGACAAATTCTTCCAAGTATCTGCGCGCGA  
 GGCCAAGCGATCTTCTTCTTGTCCAAGATAAGCCTGTCTAGCTTCAAGTATGACGGG  
 CTGATACTGGGCCGGCAGGCGCTCCATTGCCAGTCGGCAGCGACATCCTTCGGCGC  
 GATTTGCGCGTTACTGCGCTGTACCAAATGCGGGACAACGTAAGCACTACATTTCC  
 CTCATCGCCAGCCCAGTCGGGGCGGCGAGTTCATAGCGTTAAGGTTTCATTTAGCGC  
 CTCAAATAGATCCCTGTTACAGGAACCGGATCAAAGAGTTCCCTCCGCCGCTGGACCTAC  
 CAAGGCAACGCTATGTTCTCTTGGCTTTTGTGTCAGCAAGATAGCCAGATCAATGTCGAT  
 CGTGGCTGGCTCGAAGATACCTGCAAGAATGTCATTGCGCTGCCATTCTCCAAATTG  
 CAGTTCGCGCTTAGCTGGATAACGCCACGGAATGATGTCGTCGTGCACAACAATGGT  
 GACTTCTACAGCGCGGAGAATCTCGCTCTCTCCAGGGGAAGCCGAAGTTTCCAAAA  
 GGTGCTTGATCAAAGCTCGCCGCGTTGTTTCATCAAGCCTTACGGTACCGTAACCA  
 GCAAATCAATATCACTGTGTGGCTTACAGGCCGCCATCCACTGCGGAGCCGTACAAAT  
 GTACGGCCAGCAACGTCGGTTCGAGATGGCGCTCGATGACGCCAACTACCTCTGAT  
 AGTTGAGTCGATACTTCGGCGATCACCGCTTCCCTCATGATGTTTAACTTTGTTTTAG  
 GCGACTGCCCTGCTGCGTAAACATCGTTGCTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCA  
 CGGCGTAAACGCGCTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACCCCAAAAAAA  
 CAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTC  
 AAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGTAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGCTTACGAACC  
 GAACAGGCTTATGTCCACTGGGTTCCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTCACC  
 CGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCCCTGGCTGGCGAACGAG  
 CGCAAGGTTTCCGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCCTTGTGTTCTTCTACG  
 GCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCG  
 TCGCGGCGCTTGGCCGGTGGTGTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTT  
 CTGGAAGGCGAGCATCGTTTTGTTCCGCCAGCTTCTGTATGGAACGGGCATGCGGATC  
 AGTGAGGGTTTGCAACTGCGGGTCAAGGATCTGGATTTTCGATCACGGCACGATCATC  
 GTGCGGGAGGGCAAGGGCTCCAAGGATCGGGCCCTTGATGTTACCCGAGAGCTTGGC  
 ACCCAGCCTGCGCGAGCAGGGGAATTAATTCACGGGTTTTGCTGCCCGCAAACG  
 GGCTGTTCTGGTGTGCTAGTTTGTATCAGAATCGCAGATCCGGCTTCAGCCGTTTT  
 GCCGGCTGAAAGCGCTATTTCTTCCAGAATTGCCATGATTTTTTCCCCACGGGAGGC  
 GTCACTGGCTCCCGTGTGTCGGCAGCTTTGATTCGATAAGCAGCATCGCCTGTTTCA  
 GGCTGTCTATGTGTGACTGTTGAGCTGTAACAAGTTGTCTCAGGTGTTCAATTTTCATG  
 TTCTAGTTGCTTTGTTTTACTGGTTTTACCTGTTCTATTAGGTGTTACATGCTGTTTAT  
 CTGTTACATTTGTCGATCTGTTTCATGGTGAACAGCTTTGAATGCACCAAAAACTCGTA  
 AAAGCTCTGATGTATCTATCTTTTTTACACCGTTTTTCATCTGTGCATATGGACAGTTT  
 TCCCTTTGATATGTAACGGTGAACAGTTGTTCTACTTTTTGTTTTGTTAGTCTTGATGCTT  
 CACTGATAGATAACAAGAGCCATAAGAACCCTCAGATCCTTCCGTATTTAGCCAGTATG  
 TTCTCTAGTGTGGTTCGTTGTTTTTGGCTGAGCCATGAGAACGAACCAATTGAGATCAT  
 ACTTACTTTGCATGTCACTCAAAAATTTTGCCTCAAAACTGGTGAGCTGAATTTTTGC  
 AGTTAAAGCATCGTGTAGTGTTTTTCTTAGTCCGTTATGTAGGTAGGAATCTGATGTA  
 ATGGTTGTTGGTATTTTTGTCACCATTCATTTTTATCTGGTTGTTCTCAAGTTCCGTTAC  
 GAGATCCATTTGTCTATCTAGTTCAACTTGGAAAATCAACGTATCAGTCGGGGCGGCC  
 TCGCTTATCAACCACCAATTTTCATATTGCTGTAAGTGTTTAAATCTTTACTTATTGGT  
 TTCAAAACCCATTGGTTAAGCCTTTTAAACTCATGGTAGTTATTTTCAAGCATTAACA

**FIG. 3 Cont.**

TGAACTTAAATTCATCAAGGCTAATCTCTATATTTGCCTTGTGAGTTTTCTTTTGTGTT  
AGTTCTTTTAATAACCACTCATAAATCCTCATAGAGTATTTGTTTTCAAAGACTTAA  
CATGTTCCAGATTATTTTTATGAATTTTTTAACTGGAAAAGATAAGGCAATATCTC  
TTCATAAAAACTAATTCFAATTTTTTCGCTTGAGAACTTGGCATAGTTTGTCCACTGG  
AAAATCTCAAAGCCTTTAACCAAAGGATTCCTGATTTCCACAGTTCTCGTCATCAGC  
TCTCTGGTTGCTTTAGCTAATACACCATAAGCATTTCCCTACTGATGTTTCATCATCT  
GAGCGTATTGGTTATAAGTGAACGATACCGTCCGTTCTTTCCTTGTAGGGTTTTCAAT  
CGTGGGGTTGAGTAGTGCCACACAGCATAAAATTAGCTTGGTTTCATGCTCCGTTAA  
GTCATAGCGACTAATCGCTAGTTCATTTGCTTTGAAAACAATAATTCAGACATACA  
TCTCAATTGGTCTAGGTGATTTTAAT-3'

**FIG. 4**  
**Plásmido pDS57**

SEQ ID NO: 23

5'-CACTATACCAATTGAGATGGGCTAGTCAATGATAATTACTAGTCCTTTTCCTTTGA  
GTTGTGGGTATCTGTAAATTCGTAGACCTTTGCTGGAAAACITGTAAATTCGTGCTA  
GACCCTCTGTAAATCCGCTAGACCTTTGTGTGTTTTTTTTGTTTATATTCAAGTGGTT  
ATAATTTATAGAATAAAGAAAAGAATAAAAAAAGATAAAAAAGAATAGATCCCAGCCC  
TGTGTATAACTCACTACTTTAGTCAGTTCGCGAGTATTACAAAAGGATGTCGCAAAC  
GCTGTTTGCTCCTCTACAAAACAGACCTTAAAACCCTAAAGGC<sup>gfc</sup>GGCATCCGCTTA  
CAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATC  
ACCGAAACGCGCGAGGCAGCAGATCAATTCGCGCGCGAAGGCCGAAGCGGCATGCA  
TTTACGTTGACACCATCGAATGGTGCAAACCTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCC  
CGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTC  
GCAGAGTATGCCGGTGTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAGC  
CACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTA  
CATCCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGATTGGCG  
TTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATTGTCGCGGCGATTAAAT  
CTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGC  
GTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGIGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCT  
GATCATTAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCAC  
TAATGTTCCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATT  
TTCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTTCGCATITGGGTCAC  
CAGCAAATCGCGCTGTTAGCGGGCCCATTAAGTTCGTCTCGGCGGTCTGCGTCTG  
GCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGA  
AGGCGACTGGAGTGCCATGTCCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGG  
GCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGC  
GCGCCATTACCGAGTCCGGCTGCGCGTTGGTTCGGATATCTCGGTAGTGGGATACG  
ACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTAACCACCATCAAACAGGATT  
TTCGCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGG  
CGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAGAAAAGAAAACCACCCTG  
GCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTG  
GCACGACAGGTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTaA  
GTTAGCGCGAATTGATCTGGTTTACAGCTTATCATCGACTGCACGGTGCACCAATG  
CTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGGTCGTAATCA  
CTGCATAAATTCGTGTTCGCTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTGCGCCG  
ACATCATAACGGTCTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCCG  
GCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGC  
CGCTGAGAAAAAGCGAAGCGGCACCTGCTCTTAACAATTTATCAGACAATCTGTGTG  
GGCACTCGACCGGAATTATCGATTAACCTTTATTATTAATAAATAAAGAGGTATATAT  
TAATGTATCGATTAATAAAGGAGGAATAAACCATGAAACGTCCTCGGAACCCTGGAC  
GCCCTCTGGCTGGCGGTTGAATCTGAAGACACCCCGATGCATGTGGGTACGCTTCAG  
ATTTCTCACTGCCGGAAGGCGCACCCAGAAACCTTCTGCGTGACATGGTCACTCGA  
ATGAAAGAGGCCGGCGATGTGGCACCACCCTGGGGATACAAACTGGCCTGGTCTGG

**FIG. 4 Cont.**

TTTCTCGGGCGCGTGATCGCCCCGGCCTGGAAAGTCGATAAGGATATCGATCTGGA  
 TTATCACGTCCGGCACTCAGCCCTGCCTCGCCCCGGCGGGAGCGCGAACTGGGTAT  
 TCTGGTATCCCGACTGCACTCTAACCCCTGGATTTTTCCCGCCCTCTTTGGGAATGC  
 CACGTTATTGAAGGCCTGGAGAATAACCGTTTTGCCCCTTACACCAAAATGCACCAC  
 TCGATGATTGACGGCATCAGCGGCGTGCGACTGATGCAGAGGGTGCTACCACCGA  
 TCCCGAACGCTGCAATATGCCACCGCCCTGGACGGTACGCCACACCAACGCCGTG  
 GTGCAAAAACCGACAAAAGAGGCCAGCGTGCCCGCAGCGGTTTTCCAGGCAATGGAC  
 GCCCTGAAGCTCCAGGCAGACATGGCCCCCAGGCTGTGGCAGGCCGGCAATCGCCT  
 GGTGCATTCGGTTCGACACCCGGAAGACGGACTGACCGCGCCCTTCACTGGACCGG  
 TTTCCGGTGCTCAATCACCGGGTTACCGCGCAGCGACGTTTTGCCACCCAGCATTATC  
 AACGGACCGGCTGAAAAACCTGGCCCATGCTTCCGGCGGTTCCCTTGAACGACATCG  
 TGCTTTACCTGTGTGGCACC GCATTGCGGGCGCTTCTGGCTGAGCAGAACAATCTGC  
 CAGACACCCCGCTGACGGCTGGTATACCGGTGAATATCCGGCCGGCAGACGACGAG  
 GGTACGGGCACCCAGATCAGTTTATGATGCGCTCGCTGGCCACCGACGAAGCTGAT  
 CCGTTGAACCGCCTGCAACAGATCAAACCTCGACCCGACGGGCCAAGGAGCACCT  
 GCAGAAACTTCCAAAAAGTGCCCTGACCCAGTACACCATGCTGCTGATGTCACCCTA  
 CATTCTGCAATTGATGTCAGGTCTCGGGGGGAGGATGCGACCAGTCTTCAACGTGAC  
 CATTTC AACGTGCCCGGCCCGGAAGGCACGCTGTATTATGAAGGAGCCCGGCTTG  
 AGGCCAIGTATCCGGTATCGCTAATCGCTCACGGCGGCGCCCTGAACATCACCTGCC  
 TGAGCTATGCCGGATCGCTGAATTTCCGGTTTTACCGGCTGTCGGGATACGCTGCCGA  
 GCATGCAGAACTGGCGGTTTTATACCGGTGAAGCTCTGGATGAGCTGGAATCGCTG  
 ATTTGCCACCCAAGAAGCGCGCCCGAACCCGCAAGTAACTCGAGATCTGCAGCTG  
 GTACCATATGGGAATTCGAAGCTTGGGCCCGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGA  
 TCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATTGAGTTTAAACGGTCTCCAG  
 CTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAATAACAGAA  
 CGCAGAAGCGGTCTGATAAAACAGAAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCC  
 ACCTGACCCCATGCCGAACTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGG  
 GGTCTCCCCATGCCGAGAGTAGGGAAGTGCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCA  
 GTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCCGGTGAACGCTCTCCTgacGC  
 CTGATGCGGTATTTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCA  
 CTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAA  
 CACCCGCTGACGAGCTTAGTAAAGCCCTCGCTAGATTTTAATGCGGATGTTGCGGATT  
 ACTTCGCCAACTATTGCGATAACAAGAAAAAGCCAGCCTTTTCATGATAATCTCCCA  
 ATTTGTGTAGGGCTTATTATGCACGCTTAAAAATAATAAAAGCAGACTTGACCTGAT  
 AGTTTTGGCTGTGAGCAATTATGTGCTTAGTGATCTAACGCTTGAGTTAAGCCGCGC  
 CGCGAAGCGGCGTCCGGCTTGAACGAATTGTTAGACATTATTTGCCGACTACCTTGGT  
 GATCTCGCCTTTCACGTAGTGGACAAATTCTTCCAACTGATCTGCGCGCGAGGCCAA  
 GCGATCTTCTTCTTGTC AAGATAAGCCTGTCTAGCTTCAAGTATGACGGGCTGATA  
 CTGGGGCCGGCAGGCGCTCCATTGCCAGTCCGCAGCGACATCCTTCGGCGCGATTTT  
 GCCGGTACTGCGCTGTACCAAATGCCGGGACAACGTAAGCACTACATTTCCGCTCATC  
 GCCAGCCCAGTCCGGCGGCGAGTTCCATAGCGTTAAGGTTTCATTTAGCGCCTCAA  
 TAGATCCTGTTCAAGAACCGGATCAAAGAGTTCCTCCGCCGCTGGACCTACCAAGGC  
 AACGCTATGTTCTCTTGTCTTTGTGTCAGCAAGATAGCCAGATCAATGTCGATCGTGCC

FIG. 4 Cont.

TGGCTCGAAGATACCTGCAAGAATGTCATTGCGCTGCCATTCTCCAAATTGCAGTTC  
 GCGCTTAGCTGGATAACGCCACGGAATGATGTCGTGTCACAAACAATGGTGACTTC  
 TACAGCGCGGAGAATCTCGCTCTCTCCAGGGGAAGCCGAAGTTTCCAAAAGGTTCGTT  
 GATCAAAGCTCGCCGCGTTGTTTCATCAAGCCTTACGGTCACCGTAACCAGCAAATC  
 AATATCACTGTGTGGCTTCAGGCCGCCATCCACTGCGGAGCCGTACAAATGTACGGC  
 CAGCAACGTCGGTTCGAGATGGCGCTCGATGACGCCAACTACCTCTGATAGTTGAGT  
 CGATACTTCGGCGATCACCGCTTCCCTCATGATGTTTAACTTTGTTTTAGGGCGACTG  
 CCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTAA  
 CGCGCTTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACCCCAAAAAACAGTCATA  
 ACAAGCCATGAAAAACGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTTCGGTCAAGGTTCT  
 GGACCAGTTGCGTGAGCGCATAACGCTACTTGCATTACAGCTTACGAACCGAACAGG  
 CTTATGTCCACTGGGTTTCGTGCCCTTCCACGGTGTGCGTCACCCGGCAAC  
 CTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGG  
 TTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGT  
 GCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCGGC  
 GCTTGCCGGTGGTGTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAG  
 GCGAGCATCGTTTGTTCGCCCAGCTTCTGTATGGAACGGGCATGCGGATCAGTGAGG  
 GTTTGCAACTGCGGGTCAAGGATCTGGATTTTCGATCACGGCACGATCATCGTGCGGG  
 AGGGCAAGGGCTCCAAGGATCGGGCCTTGATGTTACCCGAGAGCTTGGCACCCAGC  
 CTGCGCGAGCAGGGGAATTAATCCACGGGTTTTGCTGCCCGCAAACGGGCTGTTT  
 TGTTGTTGCTAGTTTGTATCAGAATCGCAGATCCGGCTTCAGCCGGTTTGCCTGCT  
 GAAAGCGCTATTTCTTCCAGAAATGCCATGATTTTTTCCACGGGAGGCGTCACTG  
 GCTCCCGTGTGTCGGCAGCTTTGATTCGATAAGCAGCATCGCCTGTTTCAGGCTGTC  
 TATGTGTGACTGTTGAGCTGTAACAAGTTGTCTCAGGTGTTCAATTTTCATGTTCTAGT  
 TGCTTTGTTTTACTGGTTTACCTGTTCTATTAGGTGTTACATGCTGTTCACTGTTAC  
 ATTTGTCGATCTGTTTCATGGTGAACAGCTTTGAATGCACCAAAAACTCGTAAAAGCTC  
 TGATGTATCTATCTTTTTTACACCGTTTTTCATCTGTGCATAAGGACAGTTTTCCCTTG  
 ATATGTAACGGTGAACAGTTGTTCTACTTTTTGTTTGTAGTCTTGATGCTTCACTGAT  
 AGATAACAAGAGCCATAAAGAACCTCAGATCCTTCCGTATTTAGCCAGTATGTTCTCTA  
 GTGTGGTTCGTTGTTTTGCGTGAGCCATGAGAACGAACCATTGAGATCATACTTAC  
 TTTGCATGTCACTCAAAAATTTGCTCAAACTGGTGAGCTGAATTTTTGCAGTTAA  
 AGCATCGTGTAGTGTTTTTCTTAGTCCGTTATGTAGGTAGGAATCTGATGTAATGGTT  
 GTTGGTATTTTGTACCATTCATTTTTATCTGGTGTGTTCAAGTTTCGGTTACGAGAT  
 CCATTTGTCTATCTAGTTCAACTTGGAATAACAAGTATCAGTCCGGGCGGCTCGCT  
 TATCAACCACCAATTTCAATTTGCTGTAAGTGTTTAAATCTTTACTTATTGGTTTTCAA  
 AACCCATTGGTTAAGCCTTTTAAACTCATGGTAGTTATTTTCAAGCATTAACATGAA  
 CTTAAATTCATCAAGGCTAATCTCTATATTTGCCTTGTGAGTTTTCTTTTGTGTTAGTT  
 CTTTTAATAACCACICATAAATCCTCATAGAGTATTTGTTTTCAAAGACTTAAACATG  
 TTCCAGATTATTTTTATGAATTTTTTAACTGGAAAAGATAAGGCAATATCTCTTCA  
 CTAATAACTAATTCTAATTTTTCGCTTGAGAACTTGGCATAGTTTGTCCACTGGAAA  
 AITICAAAGCCTTTAAACCAAGGATTCCTGATTTCCACAGTTCTCGTCAATCAGCTCTC  
 TGGTTGCTTTAGCTAATAACCCATAAGCATTTTCCCTACTGATGTTTCATCATCTGAGC  
 GTATTGGTTATAAGTGAACGATACCGTCCGTTCTTTCCCTGTAGGGTTTTCAATCGTG  
 GGGTTGAGTAGTGCCACACAGCATAAAAATAGCTTGGTTTCACTGCTCCGTTAAGTCA

**FIG. 4 Cont.**

TAGCGACTAATCGCTAGTTCATTTGCTTTGAAAACAAC TAATTCAGACATACATCTC  
AATTGGTCTAGGTGATTTTAAT-3'

FIG. 5 (Placas de micropocillos)

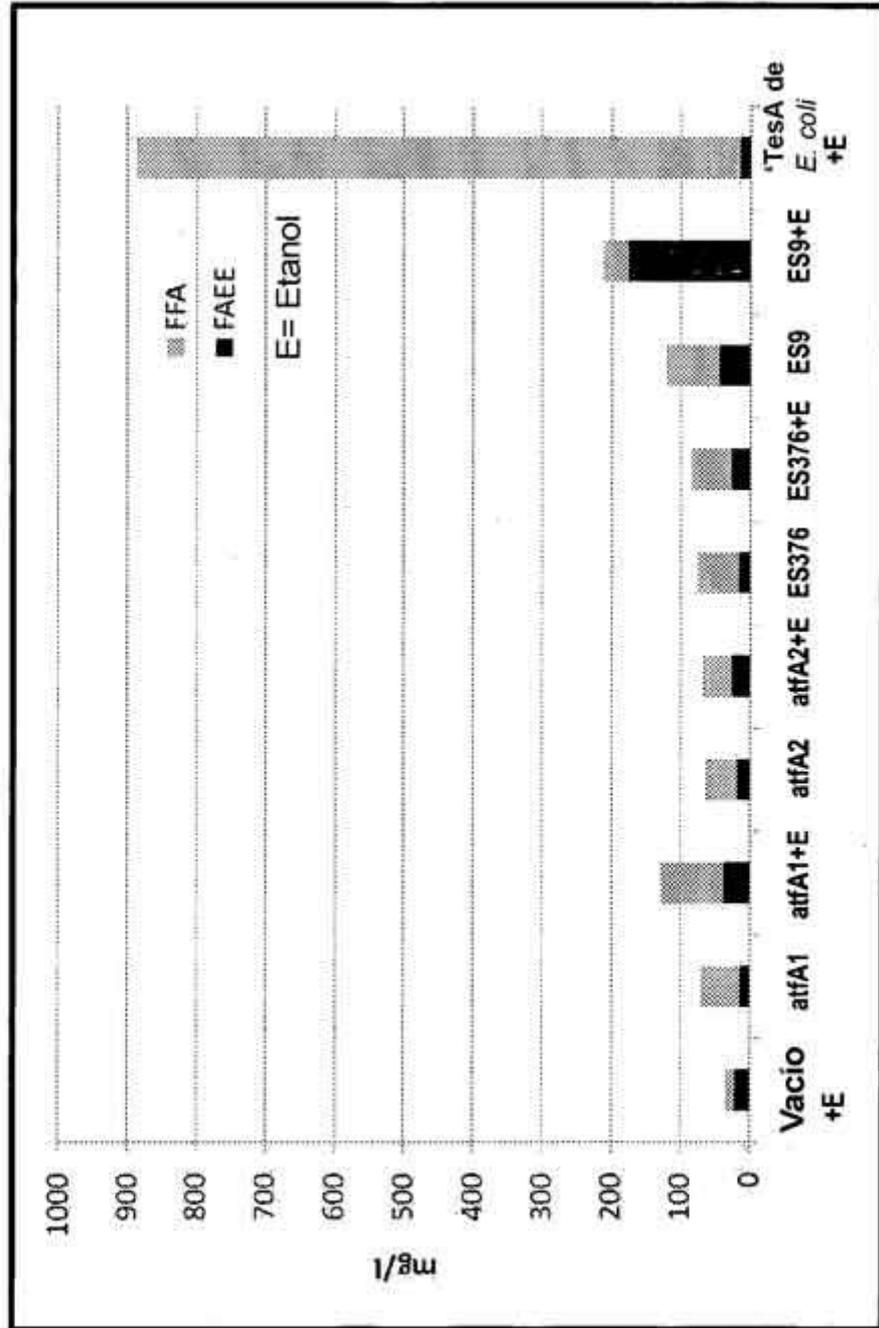


FIG. 6 (Frascos de agitación con etanol)

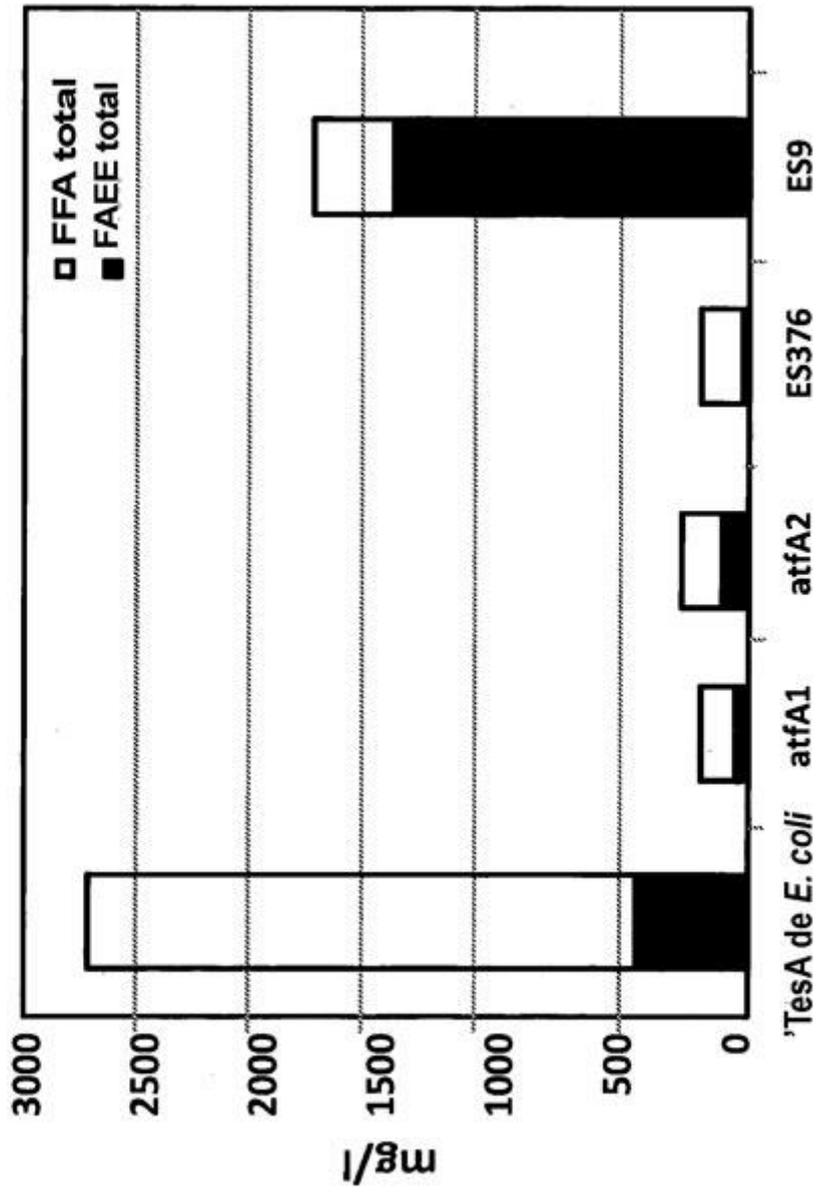


FIG. 7 (Frascos de agitación con metanol)

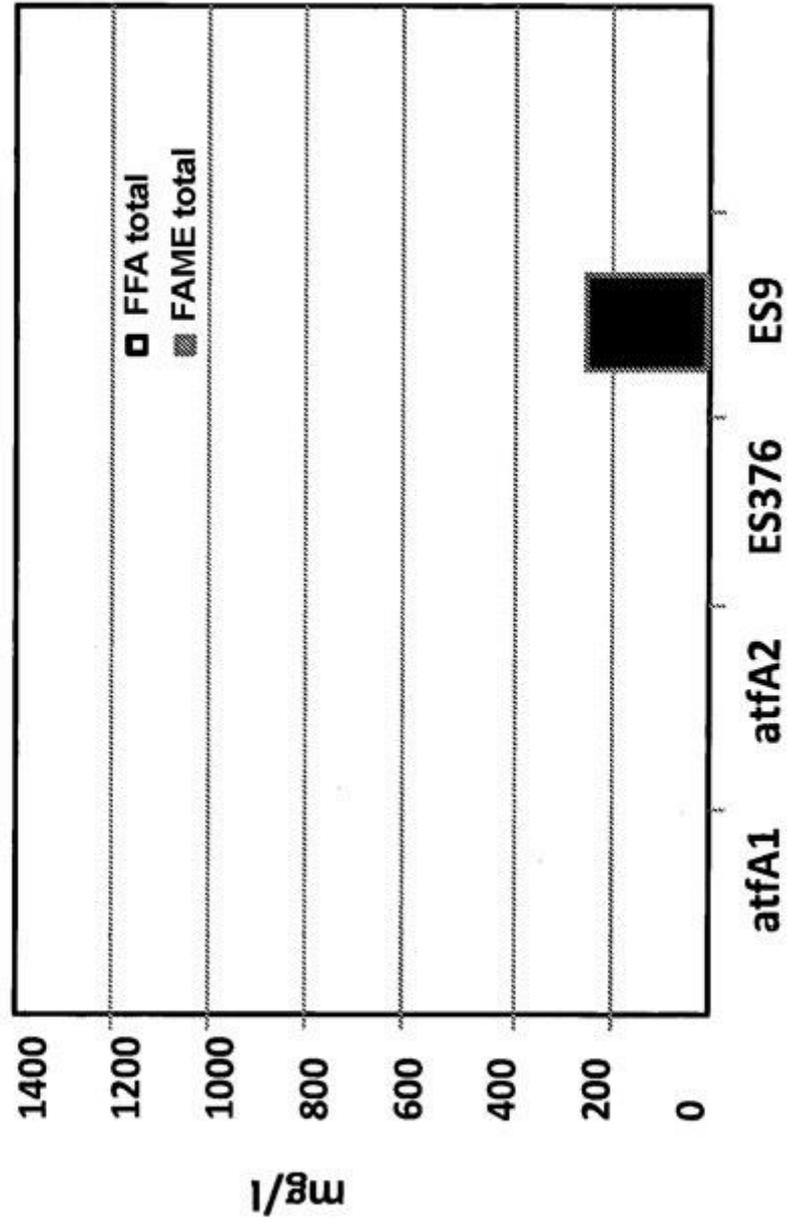


FIG. 8

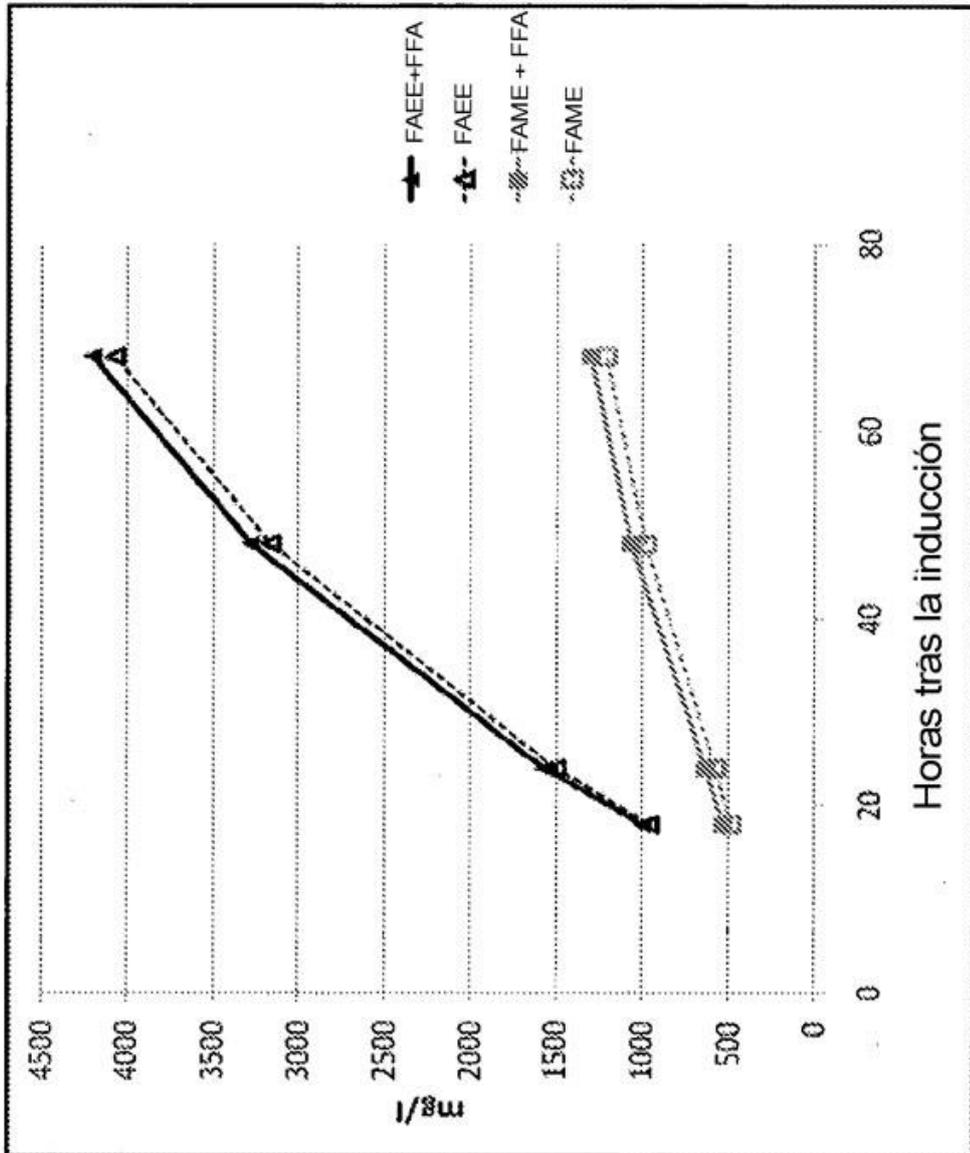
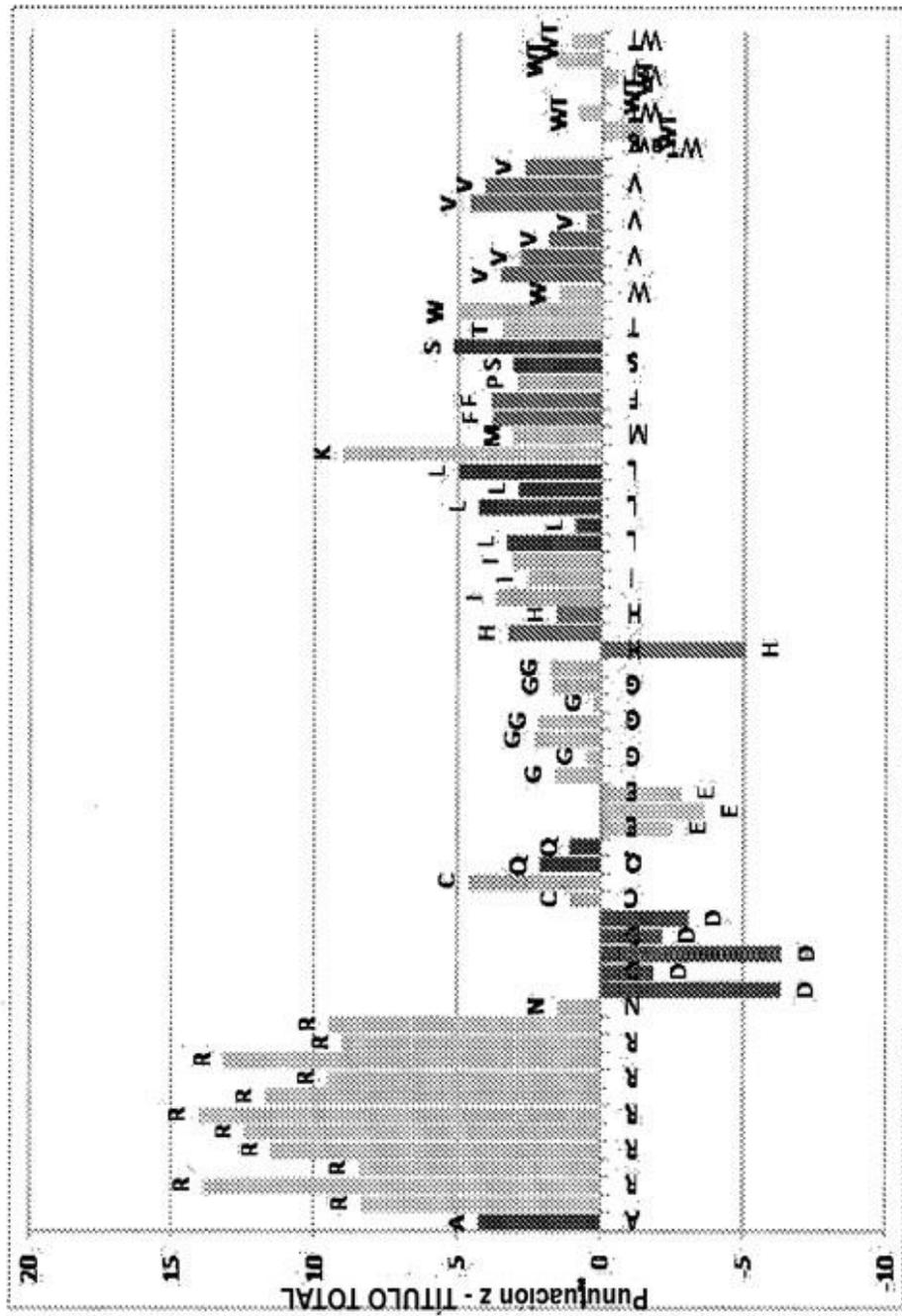


FIG. 9



**FIG. 10A**

Mutantes de éster sintasa - FAME/FFA

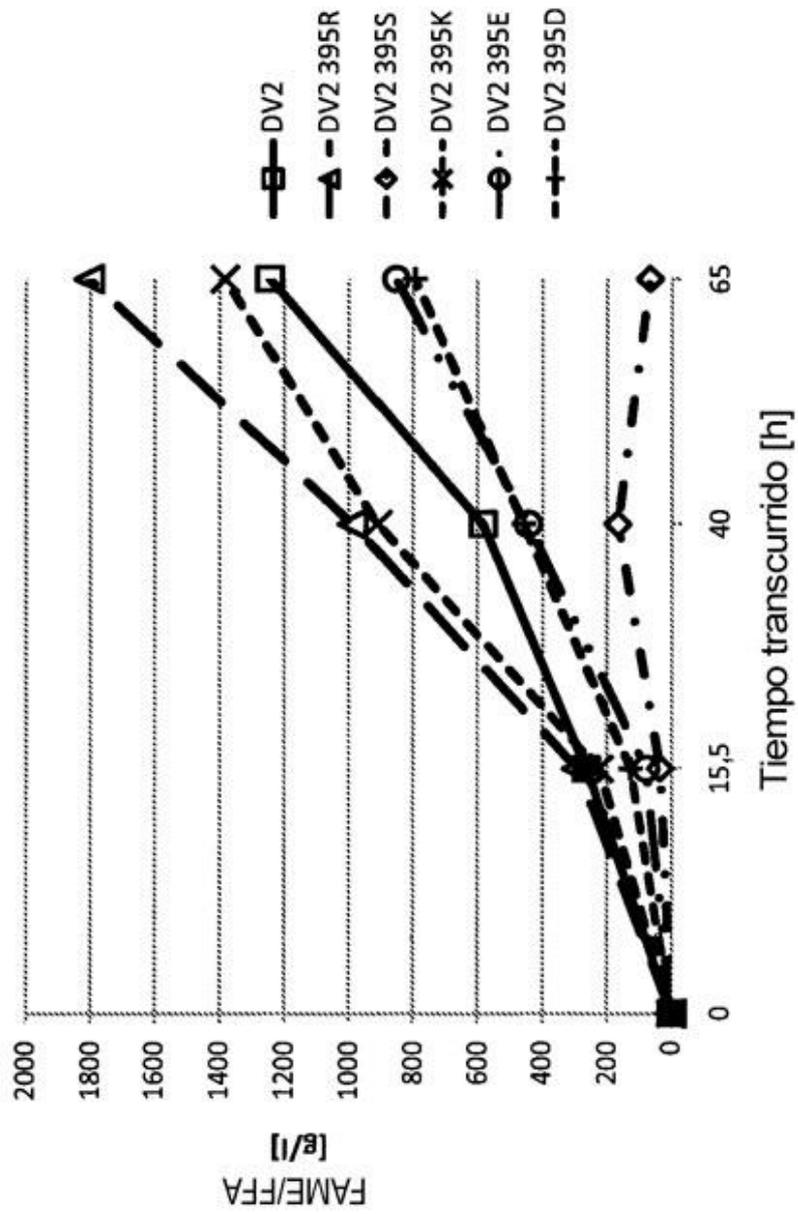


FIG. 10B

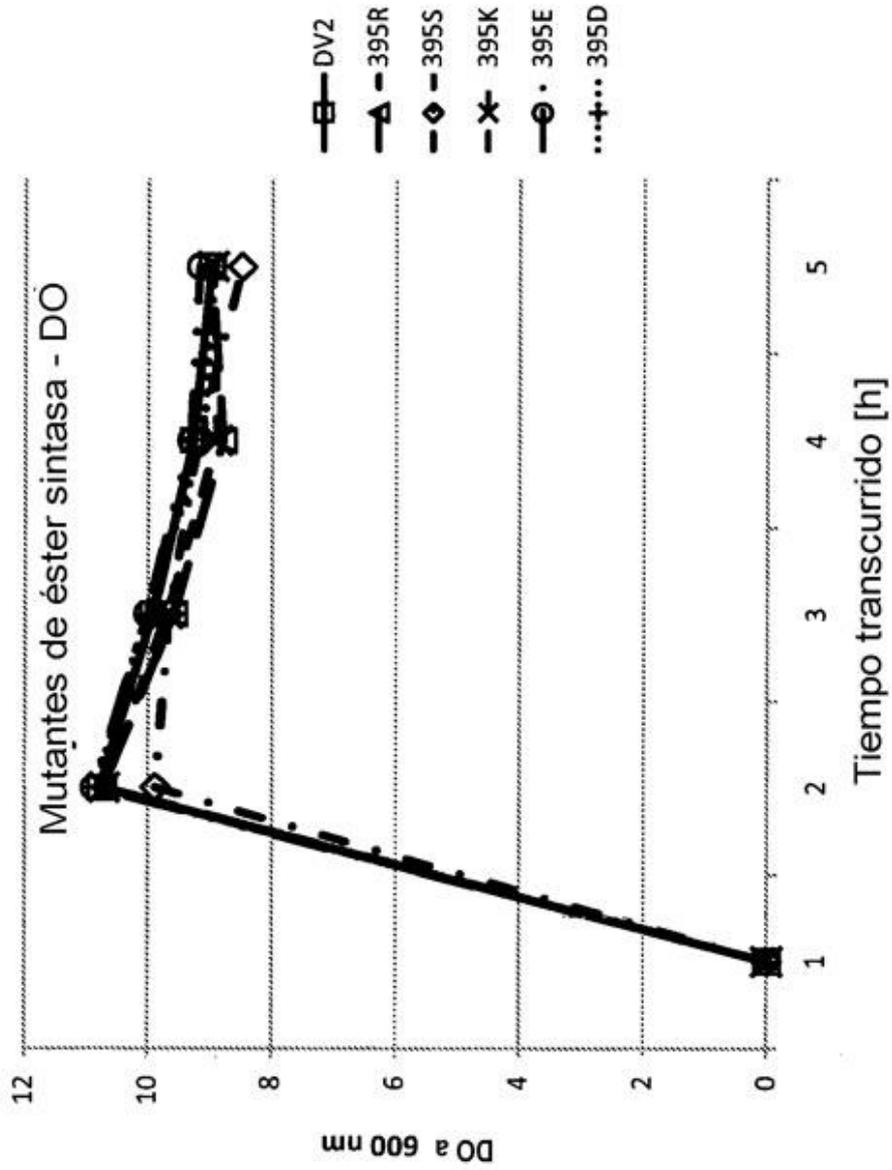


FIG. 11

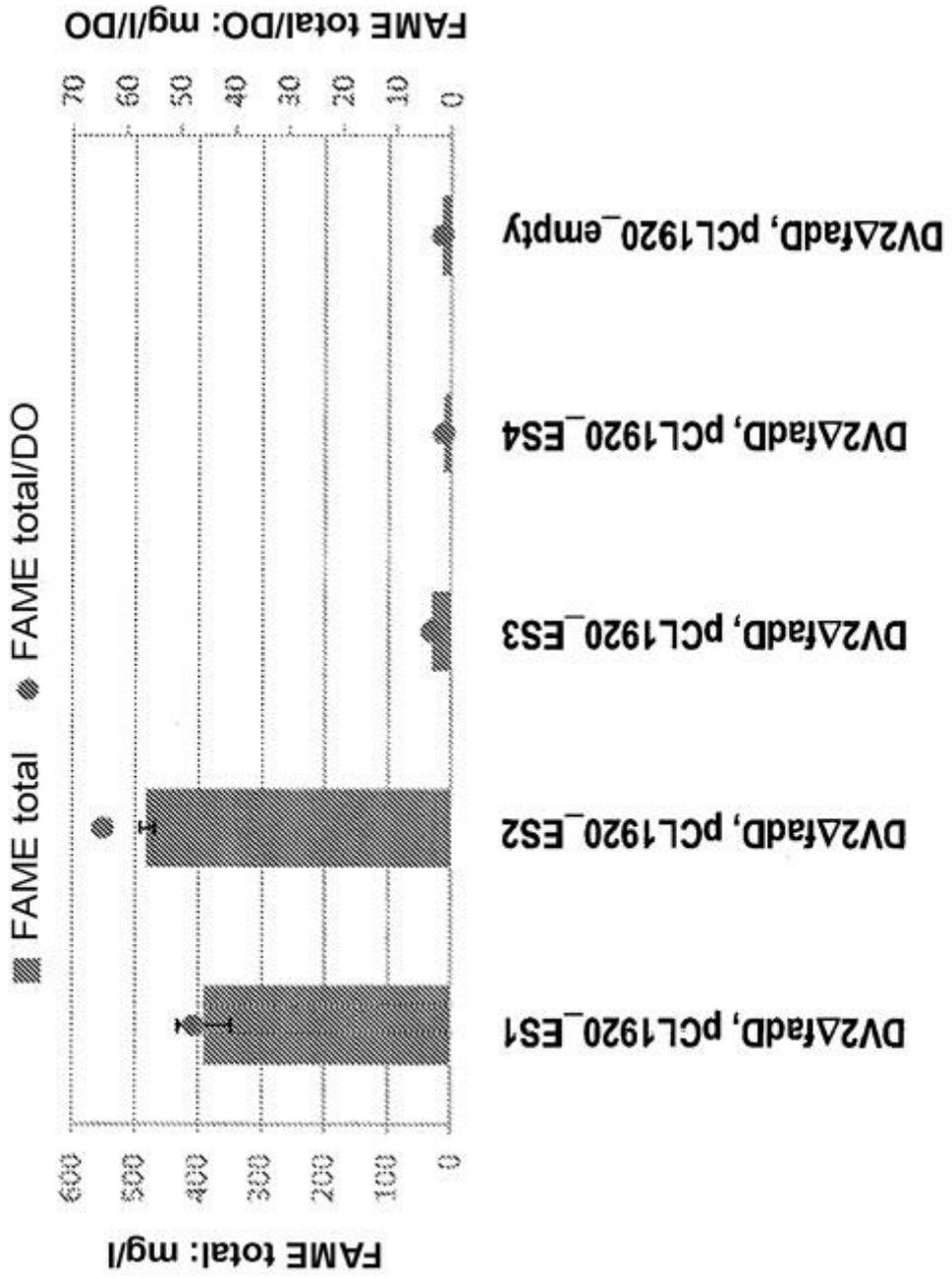


FIG. 12

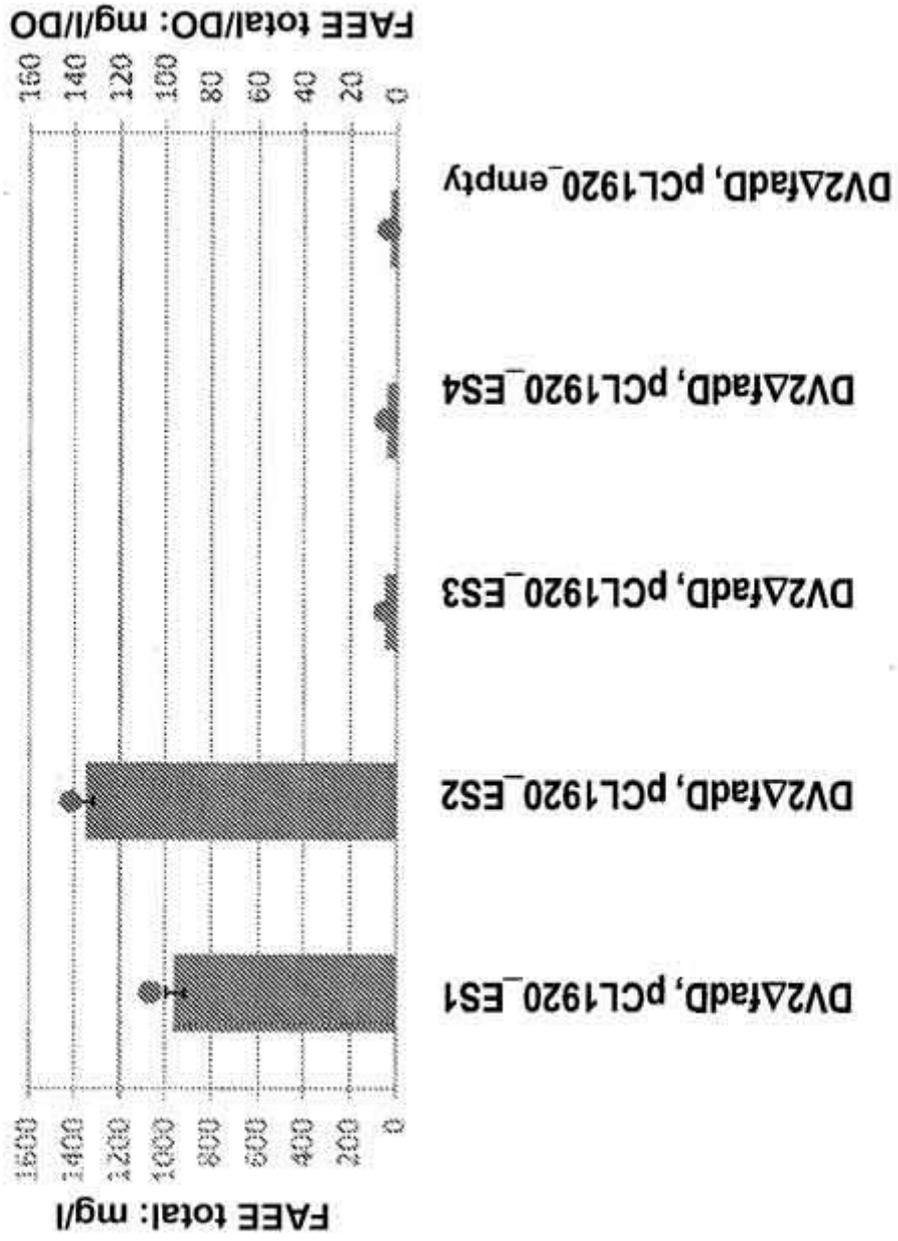


FIG. 13

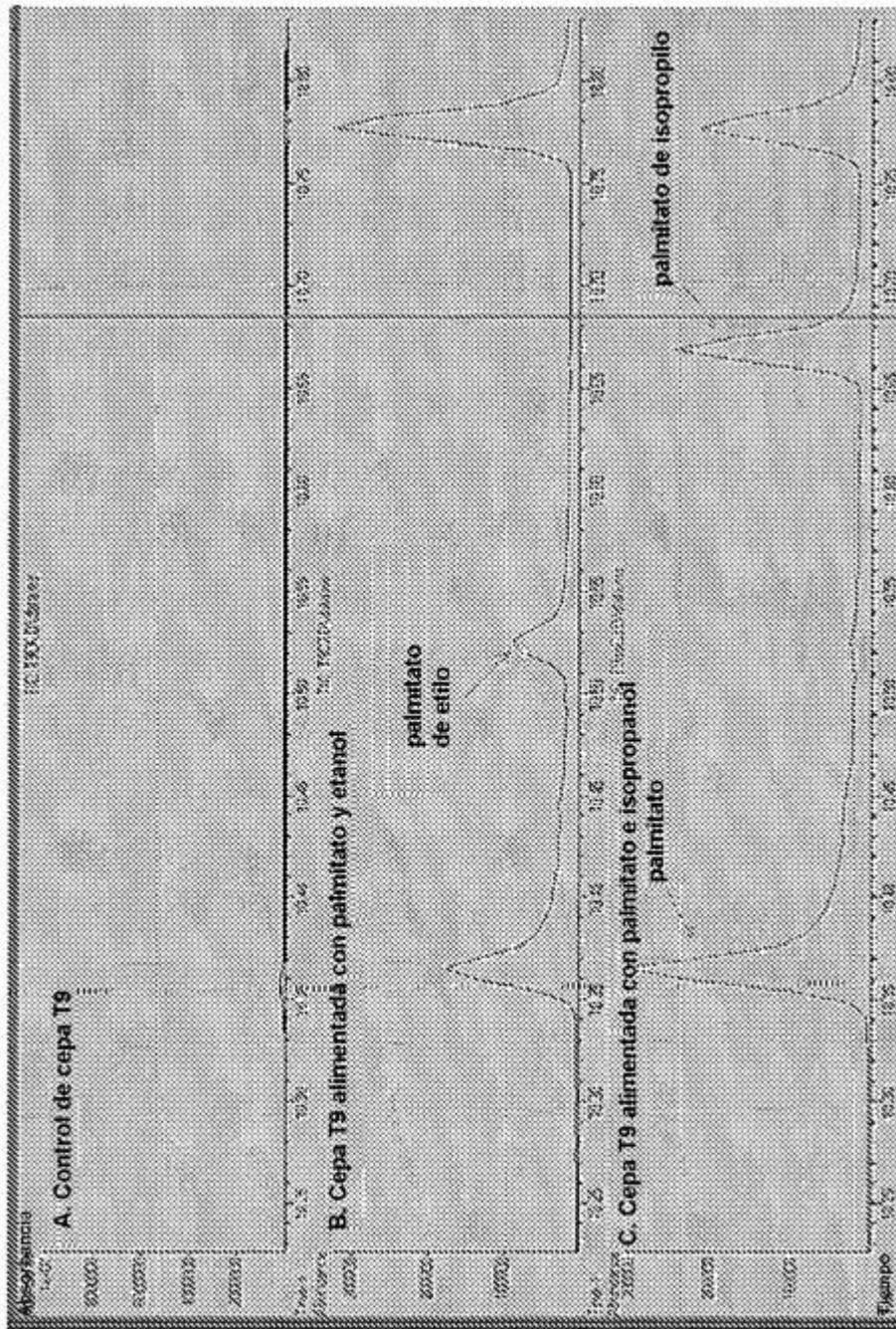
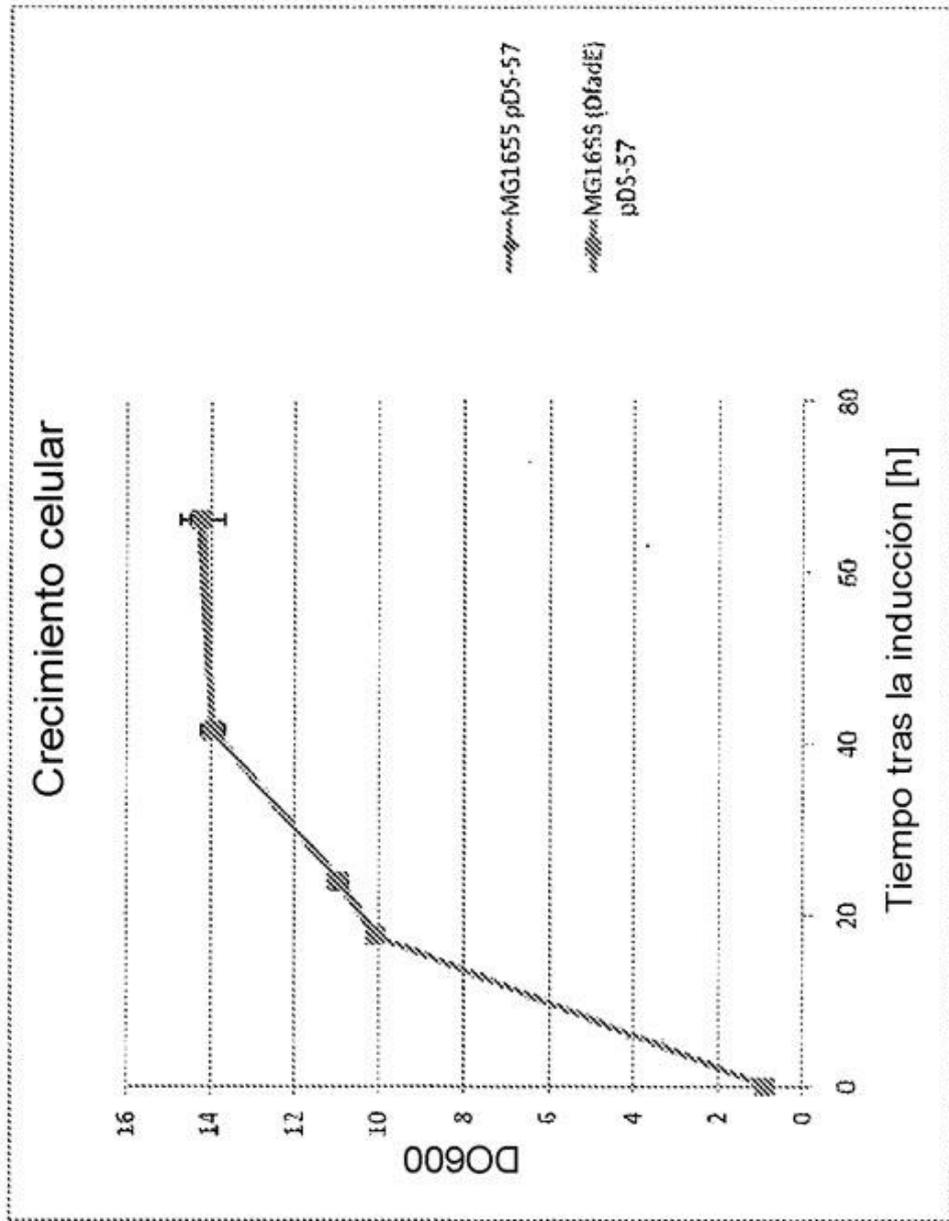
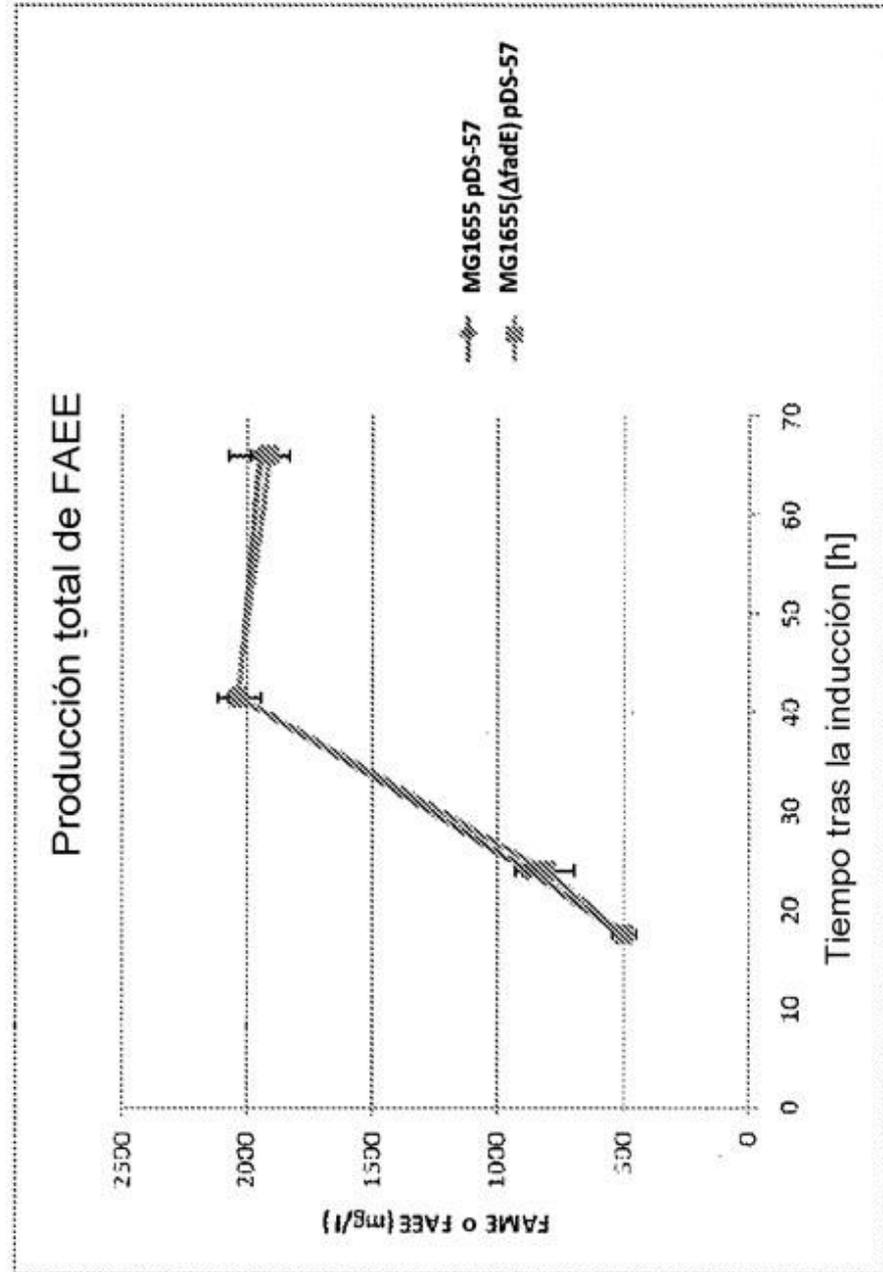


FIG. 14



**FIG. 15**



**FIG. 16**

**Secuencia de aminoácidos de ES9 (SEQ ID NO: 18)**

MKRLGTLTLDAS WLAVESEDTP MHVGTLLQIFS LPEGAPETFL RDMVTRMKEA GDVAPPWGYK  
 LAWSGFLGRV IAPAWKVDKD IDLDYHVRHS ALPRPGGERE LGILVSRSLHS NPLDFSRPLW  
 ECHVIEGLEN NRFALYTKMH HSMIDGISGV RLMQRVLITD PERCNMPPPW TVRPHQRRGA  
 KTDKEASVPA AVSQAMDALK LQADMAPRLW QAGNRLVHSV RHPEDGLTAP FTGPPVSVLNH  
 RVTAQRREFAT QHYQLDRLKN LAHASGGSLN DIVLYLCGTA LRRFLAEQNN LPDTPPLTAGI  
 PVNIRPADDE GTGTQISFMI ASLATDEADP LNRLQIQIKTS TRRAKEHLQK LPKSALTQYT  
 MLLMSPYILQ LMSGLGGRMR PVFNVTISNV PGPEGTLYYE GARLEAMYVP SLIAHGGALN  
 ITCLSYAGSL NFGFTGCRDT LPSMQKLAVY TGEALDELES LILPPKKRAR TRK

**Secuencia de nucleótidos de ES9 (SEQ ID NO: 27)**

1 atgaaacgctc tcggaaccct ggacgcctcc tggctggcgg ttgaatctga agacaccccc  
 61 atgcatgtgg gtacgcttca gattttctca ctgccggaag ggcgaccaga aaccttctctg  
 121 cgtgacatgg tcactcgaat gaaagagcc gccgatgtgg caccacctg gggatacaaa  
 181 ctggcctggt ctggttctct cgggcgctg atcgccccg cctggaaagt cgataaggat  
 241 atcgatctgg attatcacgt ccggcaactca gccctgcctc gccccggcgg ggagcgcgaa  
 301 ctgggtatc tggatcccc actgcactct aacccccctg attttcccc cctctttgg  
 361 gaatgccacg ttattgaagg cctggagaat aaccgttttg ccctttacac caaatgcac  
 421 cactcgatga ttgacggcat cagcggcgtg cgactgatgc agagggtgct caccaccgat  
 481 cccgaacgct gcaatatgcc accgccctgg acggtacgcc cacaccaacg ccgtggtgca  
 541 aaaaccgaca aagaggccag cgtgcccgca gcggtttccc aggccatgga cgccctgaag  
 601 ctccaggcag acatggcccc caggctgtgg caggccggca atcgccctggt gcattcgggt  
 661 cgacacccgg aagacggact gaccgcgcc ttcactggac cggtttcggt gctcaatcac  
 721 cgggttaccg cgcagcgacg ttttgccacc cagcattatc aactggaccg gctgaaaaac  
 781 ctggcccatg cttccggcgg ttccttgaac gacatcgtgc tttacctgtg tggcaccgca  
 841 ttgcccgcct tcttggtgta gcagaacaat ctgccagaca ccccctgac ggctggtata  
 901 cgggtgaata tccggccggc agacgacgag ggtacgggca cccagatcag tttcatgatt  
 961 gcctcgctgg ccaccgacga agctgatccg ttgaaccgcc tgcaacagat caaacctcg  
 1021 acccgacggg ccaaggagca cctgcagaaa cttccaaaaa gtgccctgac ccagtacacc  
 1081 atgctgctga tgtcaccta cattctgcaa ttgatgtcag gtctcggggg gaggatgcga  
 1141 ccagtcttca acgtgacat tccaacgtg cccggccgg aaggcacgct gtattatgaa  
 1201 ggagcccggc ttgaggccat gtatccggtg tcgctaactc ctcacggcgg cgccctgaac  
 1261 atcacctgcc tgagctatgc cggatcgtg aatttcggtt ttaccggctg tcgggatcag  
 1321 ctgccgagca tgcaaaaact ggcggtttat accggtgaag ctctggatga gctggaatcg  
 1381 ctgattctgc caccacaaga gcgcgccgca acccgcaagt aa

**Secuencia de aminoácidos de AtfA1 (SEQ ID NO: 25)**

MKALSPVDQL FLWLEKRQQP MHVGGQLQFS FPEGAGPKYV SELAQQMRDY CHPVAPFNQR  
 LTRRLGQYYW TRDKQFDIDH HFRHEALPKP GRIRELLSLV SAEHSNLLDR ERPMWEAHLI  
 EGIRGRQFAL YYKIHHSVMD GISAMRIASK TLSTDPSERE MAPAWAFNTK KRSRSLPSNP  
 VDMASSMARL TASISKQAAT VPGLAREVYK VTQKAKKDN YVSIFQAPDT ILNNTITGSR  
 RFAAQSFPLP RLKVIKAYN CTINTVVLMS CGHALREYLI SQHALPDEPL IAMVPMSLRQ  
 DDSTGGNQIG MILANLGTI CDPANRLRVI HDSVEEAKSR FSQMSPEEIL NFTALTMAPT  
 GLNLLTGLAP KWRAFNVVIS NIPGPKEPLY WNGAQLQGVY PVSIALDRIA LNITLTSYVD  
 QMEFGLIACR RTLPSMQRL DYLEQSIREL  
 EIGAGIK

**Secuencia de nucleótidos de AtfA1 (SEQ ID NO: 29)**

1 atgaaagcgc ttgacccagt ggatcaactg ttccctgtggc tggaaaaacg acagcaacc  
 61 atgcaactag gcggtttgca gctggtttcc ttcccgggaag gtgccggccc caagtatgtg  
 121 agtgagctgg cccagcaaat gcgggattac tgccaccag tggcgccatt caaccagcgc  
 181 ctgacccgctc gactcggcca gtattactgg actagagaca aacagttcga tatcgaccac

**FIG. 16 Cont.**

```

241 cacttccgcc acgaagcact ccccaaaccc ggtcgcattc gcgaactgct ttctttggtc
301 tccgccgaac attccaacct gctggaccgg gagcgcccca tgtgggaagc ccatttgatc
361 gaagggatcc gcggtcgcca gttcgctctc tattataaga tccaccattc ggtgatggat
421 ggcatatccg ccatgcgcat cgctccaaa acgctttcca ctgaccccag tgaacgtgaa
481 atggctccgg cttggcggtt caacacccaaa aaacgctccc gctcactgcc cagcaacccg
541 gttgacatgg cctccagcat ggcgcgccta accgcgagca taagcaaaaa agctgccaca
601 gtgccccggtc tcgcgcgga ggtttacaaa gtcacccaaa aagccaaaa agatgaaaa
661 tatgtgtcta tttttcaggc tcccgacacg attctgaata ataccatcac cggttcacgc
721 cgctttgocg cccagagctt tccattaccg cgcctgaaag ttatcgcaa ggctataac
781 tgcaccatta acaccggtgt gctctecatg tgtggccacg ctctgcgca atacttgatt
841 agccaacacg cgtgcccga tgagccactg attgccatgg tgcccatgag cctgcggcag
901 gacgacagca ctggcgga ccagatcggf atgatcttg ctaacctggg caccacatc
961 tgtgatccag ctaatcgct gcgcgtcatc cagattccg tegaggaagc caaatccgc
1021 ttctcgcaga tgagcccga agaaattctc aatttcaccg cctcaccat ggtccccc
1081 ggcttgaact tactgaccgg cctagcgcca aaatggcggg ccttcaacgt ggtgatttcc
1141 aacatacccg ggcgaaaaga gccgctgtac tggaaatggg cacagctgca aggagtgtat
1201 ccagatcca ttgccttga tcgcatcgc ctaaataca cctcaccag ttatgtagac
1261 cagatggaat ttgggttat cgctgcgc cgtactctgc cttccatgca gcgactactg
1321 gattacctgg aacagtcac ccgcgaattg gaaatcggtg caggaattaa atag
    
```

**Secuencia de aminoácidos de AtfA2 (SEQ ID NO: 26)**

```

MARKLSIMDS GWLMMETRET PMHVGGLALF AIPEGAPEDY VESIYRYLVD VDSICRPFNQ
KIQSHLPLYL DATWVEDKNF DIDYHVRHSA LFRPGRVREL LALVSRLLHAQ RLDFSRPLWE
SYLIEGLEGN RFALYTKMHH SMVDGVAGMH LMQSRLATCA EDRLPAPWSG EWDAEKKPRK
SRGAAAANAG MKGTMNLRG GGGQLVDLLR QPKDGNVKT IYRAPKTQLNR RVTGARFAA
QSWSLRIKA AGKQHGTVN DIFLAMCGGA LRRYLLSQA LSDQPLVAQV PVALRSADQA
GEGGNAITTV QVSLGTHIAQ PLNRLAAIQD SMKAVKSRI GDMQKSEIDVY TVLITNPLSL
GQVTGLSGRV SPMFNLVISN VPGPKETLHL NGAEMLATYP VSLVLHGYAL NITVVSYKNS
LEFGVIGCRD TLPHIQRFLV YLEESLVELE
P
    
```

**Secuencia de nucleótidos de AtfA2 (SEQ ID NO: 30)**

```

1 atggcccgtta aattgtctat tatggattcc ggctggttaa tgatggagac ccgggaaacc
61 cctatgcatg tgggggggtt ggcgttggtt gccattccag aagggtgctc tgaggattat
121 gtgaaaagta tctatcgata cctggtggat gtggatagca tetgcccgcc atttaaccaa
181 aagattcagt ctcatctgcc cctgtactta gatgctactt ggggtggaaga caaaaatttc
241 gatattgact accacgtacg gcattctgcc ttgcctcggc cgggacgggt gcgtgagctg
301 ttggcgtag tatcgcggtt gcacgcccag cgtttggatc ctacgcgcc gttgtgggag
361 agctatttga tcgaggggtt ggagggaaac cgtttcgtc tttataccaa gatgcatcac
421 tccatggtgg atggggtggc agggatgca ctaatgcagt ctgcctagc tacttgtgcy
481 gaagaccgtt taccgcccc ttggtctggc gagtgggatg cagagaagaa accgagaaag
541 agccgtggcg ctgcagcggc gaatgccggt atgaaaggaa caatgaataa cctgcgccga
601 ggtggtggtc agcttgtgga cctgctgcga cagcccaagg atggcaacgt aaagactatc
661 taccggcgcg cgaaaaccca gctaaaccgc cgggtgacgg gcgcgcgacg ctttgcctgc
721 cagtctggtt cgctgtcgcg gattaaagcc gggggcaaac agcatggcgg tacggtgaat
781 gatattttcc ttgccatgtg tggcgcgcg ctgcctcgtt atctgctcag tcaggatgcc
841 ttgtccgac agccggttgg agcccaggtg ccagtagcct tgcgtagtgc ggatcaggct
901 ggtgaggggt gcaatgccat tactacggtt caggtaaagc tgggtacgca tattgctcag
961 ccgctgaatc ggctggccgc aatccagat tccatgaaag cggtgaaatc tcggcttggf
1021 gatatgcaga agtccgagat cgatgtttat acggtgctga ccaatatgcc cctgtctttg
1081 gggcaggtca cgggctgtc cgggcgctga agccccatgt ttaacctagt gatttccaat
1141 gtgccccggc cgaaggaaac gcttcatctc aatggtgagg agatggtggc tacctatccg
    
```

**FIG. 16 Cont.**

1201 gtgtcattgg ttctgcatgg ttacgcccta aatatcactg tggtagagcta caagaatagc  
 1261 cttgagtttg gcgtgatcgg ttgccgtgac acgttgccctc atattcagcg ttttctggtt  
 1321 tatctcgaag aatcgctggt ggagctggag ccttga

**Secuencia de aminoácidos de ES8 (SEQ ID NO: 24)**

MTPLNPTDQL FLWLEKRQQP MHVGGQLQF S FPEGAPDDYV AQLADQLRQK TEVTAPFNQR  
 LSRLGQPVW VEDEHLDLEH HFRFEALPTP GRIRELLSFV SAEHSHLMDR ERPMWEVHLI  
 EGLKDRQFAL YTKVHHS LVD GVSAMRMATR MLSENPD EHG MPPIWDL PCL SRDRGESDGH  
 SLWRSVTHLL GLSDRQLGTI PTVAKELLKT INQARKDPAY DSIFHAPRCM LNQKITGSR R  
 FAAQSWCLKR IRAVCEAYGT TVNDVVTAMC AAALR TYLMN QDALPEKPLV AFV PVS LRRD  
 DSSGGNQVGV ILASLHTDVQ DAGERLLKIH HGMEEAKQRY RHMSPEEIVN Y TAL TLAPAA  
 FHLLTGLAPK WQTFNVVISN VPGPSRPLYW NGAKLEGMYP VSIDMDRLAL NMTLTSYNDQ  
 VEFGLIGCRR TLPSLQRM LD YLEQGLAELE  
 LNAGL

**Secuencia de nucleótidos de ES8 (SEQ ID NO: 28)**

1 atgacgcccc tgaatcccac tgaccagctc tttctctggc tggaaaaacg ccagcagccc  
 61 atgcatgtgg gcgccctcca gctgttttcc ttccccgaag gcgcgccgga cgactatgtc  
 121 ggcagctgg cagaccagct tggcagaag acggaggtga ccgccccctt taaccagcgc  
 181 ctgagctatc gcctgggcca gccggtatgg gtggaggatg agcacctgga ccttgagcat  
 241 catttccgct tcgaggecgt gccacacacc gggcgattc gggagctgct gtcgttcgta  
 301 tcggcggagc attcgcacct gatggaccgg gagcgcccca tgtgggaggt gcacctgatc  
 361 gagggcctga aagaccggca gtttgccgtc tacaccaagg ttcaccattc cctgggtggac  
 421 ggtgtctcgg ccattgcgat ggccaccggg atgtgagtg aaaaccggga cgaacacggc  
 481 atgcccgaat tetgggatet gccttgccct tcacgggata ggggtgagtc ggacggacac  
 541 tccctctggc gcagtgtcac ccatttgcgt gggcttccg accgccagct cggcaccatt  
 601 cccactgtgg caaaggagct actgaaaacc atcaatcagg cccggaagga tccggcctac  
 661 gactccattt tccatgcccc gcgctgcatg ctgaaccaga aaatcacggc tccccgtcga  
 721 ttgcgcgctc agtctcgggt cctgaaacgg attcgcgcgg tatgcgaggc ctacggcacc  
 781 acggtaaacg atgtcgtgac tgccatgtgc gcagcggctc tgcgtacct tctgatgat  
 841 caggatgctt tgcgggagaa accactgggt gcctttgtgc cgggtgcgct acgcccggac  
 901 gacagctcgg gcggcaacca ggtaggcgtc atcctggcga gccttcacac cgatgtgcag  
 961 gacgcccggc aacgactggt aaaaattcac cacggcatgg aagaggccaa gcagcgtac  
 1021 cggcatatga gcccgaggga aatcgtcaac tacacggccc tgaccctggc gccggccggc  
 1081 ttccacctgc tgaccgggct ggcgcccaag tggcagacct tcaatgtggt gatttccaat  
 1141 gtccccgggc catccaggcc cctgtaactg aacggggcga aactggaagg catgtatcgg  
 1201 gtgtctatcg atatggacag gctggccctg aacatgacac tgaccagcta taacgaccag  
 1261 gtggagttcg gcctgattgg ctgtcgcggg accctgcccga gcctgcaacg gatgctggac  
 1321 tacctggaac agggctctggc agagctggag ctcaacggcg gtctgtaa

**Secuencia de aminoácidos de ES1 (*Marinobacter algicola* DG893, ZP\_01893763 (SEQ ID NO: 39)**

MKRLGTL DASWLAVESEDTPMHVGNLQIFSLPEDAPETFLRDMLARKADADVAPPWCYKLA FSGFLGRL  
 VAPSWKVDKLDLDYHVRHSALPRPGSERELGILVSR LHSNPLDFSRPLWECHIIEGL  
 ENNRFALYTKMHSMIDGISGVRLMQRVLS EDPGEINMLPPWSVRPERTRGSKTDSEASI SAALSQAMEA  
 LRIQADMAPRLWNAMNRLIQSARHP EGLTAPFAGPVSALNHRVTGQRRFATQHYQLERIKQVAQASNGS  
 LNDIVLYLCGTALRRFLVEQDGLPDTPLTAGIPVNIRPSDDQGTGTQISFMI  
 ASLATDEADPLKRLKSIKHSRRAKQHLQKLP RKALTQYTMLLMSPYILQLMSGLGGRMRPVFNVTISNV  
 PGPGETLYYEGARLEAMY PVS LIAHGALNITCLSYAGSLNFGFTGCRDTLPSMQKLAVYTGEALDELES  
 LVSPPPNOTKTNARKAPRKKTAEKS

**Secuencia de aminoácidos de ES2 (*Limnobacter sp.* MED105, ZP\_01915979 (SEQ ID NO: 41)**

MARNIPLLDASWLYVESKEAPMHVGSMAIFTVPEGETSQQA IARIVQMLRNSLEFAPPFNYRLSSPRLLT  
 LMPKWIEADKIDLDYHFRHSALPAPGGERE LGTLISRLHSHPLDFRKLWEMHLIEGLYGNRFALYTKMH

**FIG. 16 Cont.**

HSLMDGVGGMRLMERIFGKSAKESMNLPAWVSVGTISRKKKNSEFQHFADQAREAWEAAKLSGQSLPAAG  
 RALMDLMREAVKPTDPALATPFSGPKSIVNKRVGARRLATQTYPLERVRAVAEAAKVSVDIFLAICSS  
 SIRRYLLERDALPSESLTAGLPVSVRPADDLDGGNAISFIIANLYTTEADPLTRLKEIRRSTQLAKANLQ  
 AMPKEAINNYTIMLMAPMMLQLVSGLGGLTRPIFNTVISNVPGPSRDLYFSGCRLEQFYPIISLIPHGOAL  
 NITVVSYSQGFNVAFITGDHDALPSMQRLSVYTGEALEEALGKWKASKPVVVKPVTEKRPVAAKPAVR  
 KPATAKVGAGKPVKAPED

**Secuencia de aminoácidos de ES3 (Metagenoma marino EDJ50241) (SEQ ID NO: 43)**

MARTPLNVQDATFLSVETADYPTHTIAGLQIFEMPEADPDFVGRIVERLVQAPVAPFWRRLVAPGFLGSTL  
 SADWIEAEEIDLDFHVRMALPRPGSLEQLEHLVERLHARPLDRSRPLWECYFVEGLGPNRFAYAKVHH  
 ALVDGMGGIWLALALAALQDPEAEPTAPWSVDLPSRPRAPAPSLDRLTGGARLVNDLSMQNLRQSLDWAG  
 RLAGAHARADLPFAAPHTPFNGRVDGYRREVTKSLPLTRVKAVAKATGTTINDVVLALTGAALRTWLDGQ  
 GALPERSLVASVPVSVRAADGAGNNLSALLADLGTDOVETPIERLQVRVRESTAR GKDMIARLSRGAEEAWA  
 LVMGLAGLAPALVNGGRTLPLPLANLVISNVPGPRGKRYAGAEIIGYYPVSIILTHGQGLNVTLVSRGESI  
 DFGLTGAQSLIRDLDKLGDALEAALADYEAAGVDDLAQRNAAFATAAVPAPVVDVEAGDGAARPGVTRVA

**Secuencia de aminoácidos de ES4 (Muestra de ballena muerta n.º 3, 2001496676\* (identificación IMG)) (SEQ ID NO: 45)**

MRLLTAVDQLFLLLLESRKQPMHVGGLEFVLELPOADSDFFVYQIVKQMQESDVPPSFPFNQVLEHLAFWKK  
 DKDFDVEHLLHHVALPSPGRVRELLMYVSREHGRLLDRAMPLWECHVVEGIEPETEGSPERFALYFKIHH  
 SLVDGIAAMRLVQKLSOSATEPVTLPVWSLMARHRNHVNAI LPAERSVKRIIKEQISTIKPVFTELLDN  
 LKNYSDEGYVGTDFDAPMSILNKRISASRRIAAQSYDIKRFNDIAERLNI SKNDVVLAVCSGALRRYLISM  
 DALPSKPLIAFVPM SLRTDKSVSGNQLSFVLANLGTDLNPLRRIELIHRSMNNGKRRFRMRNQAOVINY  
 SVIAYAWEGINLATGLFPKKQAFNLII SNVPGSEKPLYWNGARLQSLYPASIVFNGQAMNITLASYLDKI  
 EFGITACSKALPRVQDMLMLIEEELQLLETTSKELAFKGITVEDKAGNKGGDDKTKKLTTP

**Secuencias de polinucleótido con codones optimizados que codifican para ES1 (Marinobacter algicola DG893) (SEQ ID NO: 40)**

atgaaacgtctgggactctggatgcttcttggttggccgtggaaagcgaggacacgcccgatgcacgttggcaacct  
 gcagatcttcagcctgcccggaggacgcaaccgaaacgcttcctgcccgcagatgctggcccgcagatgaaagcagacgccc  
 acgtggcaccgccccttggtgttacaactggcgtttagcgggtttctgggcccgtctggtggcggccaagctggaaagtg  
 gataagaagctggatctggactatcatgctcccatagcgcattgcccgcctccgggcagcgaacgtgagctgggtat  
 tctggtgagccgctgcatagcaatccgctggactttcccgtccgctgtgggaatgccacattatcgagggttgg  
 aaaacaaccgtttcgcactgtataccaaaatgcaccacagcatgattgacggtatcagcgggtgctccgtctgatgcag  
 cgtgtgctgagcgaagatccgggtgagatcaatgatgctgcccgcgtggagcgttcgcccggagcgtaccgctggttc  
 caaaaccgatagcgaagcagcagatctctgcagcactgtcccagcaatggaggcgtgcccattcaagcagatagg  
 ctccgcgctgtggaatgcatgaaatcgtctgatccaaagcgcgctcatccagaagaaggtttgactgccccttc  
 gccggtccggtttctgcccgaaccaccgcttacgggtcagcgcgcttttgcaaccacaactatcagct  
 ggagcgcagatcaagcaggtggcgcaggcagcaatggctccctgaatgacatcgtcttgtatctgtgcggc  
 accgcattgctgctgctttctggttgaacaagcgggtttgccggataccccactgaccgcaggcatcccgg  
 tgaacattcgtccgagcagcagcaaggtaccgggacgcaaatcagctttatgattgcctccctggcgac  
 cgatgaggcggatccctctgaagcgtctgaagtcgatcaagcagcaccgctcgtgccaaacagcatctg  
 cagaagctgccgcgtaaggcgtgacgcaatacacgatgctgttgatgagcccgtacatccctgcaactga  
 tgagcgggtttgggcccgtgcgctccgctcttaacgttacgatctccaacgtccctggtccaggcga  
 aaccctgactatgaaggtgcccgcctggaggcgtatccggtcagcctgattgcgcaagggtggcgcg  
 ttgaacattacctgtctgagctacgctggtagcctgaattcgggttccactggctgcccgatccgctgc  
 cgtcgatgcagaaatggccgctctacaccggtgaggccctggatgagctggagagcctggtttctccacc  
 gcctaaccagaccaagaccaatgcgcgtaaaagctccgcgtaagaaaacggctgagaaaagctaa

**FIG. 16 Cont.**

**Secuencia de polinucleótido con codones optimizados que codifica para ES2 (*Limnobacter sp. MED105*) (SEQ ID NO: 42)**

atggcccgcaat at cctctgttggatgcgagctggctgtatgtcgaaagcaaagagggaccgcatgcaag  
 tcggtagcatggcgatctt cacgggtgccagagggcgaaacgagccaacaggcaattgcgcgcatgtgca  
 gatgctgcgtaactctctggagtgtgcaaccgctttaaactaccgtctgtccagcccacgectgctgacc  
 ctgatgccgaaatggal.cgaagccgataagattgacttggactaccactttcgccatagcgcgctgcegg  
 ctccgggtggcgaacgtgagctgggtaccctgaltagcgtttgcaagccaccgcttggactttcgtaa  
 acctctgtgggagatgcacctgattgaggggtctgtatggcaatcgttttgcggttgtacacgaagatgcat  
 cacagcttgatggacgggtgttgggtggcatgctgtatggagcgtatcttcggcaaatctgccaaagaaa  
 gcatgaatctgccagcaccttggagcgttggcaccatcagccgcaagaagaaaaactccgaaccgcaaca  
 tttcgagatcaagcgcgctgagggcgtgggaagccgcgaaaactgtcgggcccagtcctgccagcggctggc  
 cgtgcgctgatggatttgatgcccgaagccgtgaagccgaacggatccggccctggcaacgcgcttcagcg  
 gtcgaaatccatcgtcaacaagcgtgttggcgggtgcgctgcgctggcgaaccagacctaccgctgga  
 acgtgtcgtgctgttgcggagggccgcgaaggtgagcgttaacgacatttctcggctatttgacgctct  
 tctattcgtcgttacctgctggaacgcgcatgccttgcgagcaggtctctgacgctggctgctgctgtga  
 gcgtccgtcctgctgatgatctggacgggtggcaatgcatgactttatcattgccaatctgtatcagac  
 cgaggcggaccgctgacccgctgaaagaaatccgccgtagcaactcaactggcgaaggcgaaacctgcaa  
 gcaatgccgaaagaggcaatcaacaattacacgatcatgctgatggcccgatgatgctgcaactggca  
 gggccctgggtggtctgaccgctccgatcttcaacaccgcttatctocaaagtcgcccgggtccgagccgtga  
 ctgtatttctcgggttgtcgtctggaacagttctatccgatagcctgattccgcacggtcaggcgcgtg  
 aatataccgcttgtcagctatagcgggtcagtttaacgtgcgcttaccggcgaccacgatgcaactgccga  
 gcatgcagcgtctgtccgtgtacaccgggtgagccctggaagaaactggaggcggctctgggctggaagtg  
 gcaagcaagccgggtgttaaacgggtgaccgagaaacgcccggctcgccggcgaagaagccggcagttcgt  
 aagccggcgactgcaaaaagttggtgcgggt aagccggtcaaaagctccggaggattaa

**Secuencia de polinucleótido con codones optimizados que codifica para ES3 (*Metagenoma marino*) (SEQ ID NO: 44)**

atggcacgtacgcccgtgaatggtcaggatgcaacctttctgtctgttgaaaccgcccattaccogacgc  
 atattgcgggtttgcagatcttcgaaatgccggagggcagatccggattttgttggctgcctggctcgaacg  
 cctggtccaggtcccggtgcgcctttctggcgtcgtgtgctggcccctggcttccctgggtagcacctg  
 agcgcagactggattgaagccgaagagatcgacctggatttcaacgtccgtcgtatggcgtgcgcgctc  
 cgggcagcctggagcaactggaacacctggttgagcgtctgcacgcacgtccgctggaccgtagccgccc  
 actgtgggaatgctatctcgtcgaaggtctgggtccgaaccgctttgccatctacgccaaagtccaccac  
 gcgctggtcagatggtatggcggcatctggttggccctggccgcatggcacaagatccggaggcggagc  
 cgaactgcccgtggtccgtggatctgcccagccgtccgctgctccggcaccatccctgctggaccgctc  
 gaccggcgggtgcgcgtctggtgaatgacctgagcatgcaaaaactgcgcccagagccctggattgggcaggt  
 cgtctggcaggcggccatgcaacgcggaccctgccattcgtgcgcgcgatacgcgcttcaatggccgcy  
 tcgacggctaccgtcgttttggtaaccaagtcgttgcctctgacccgtgttaaggccgttggcaaggcgac  
 ggtaccaccatcaacgacgttgttctggcgtgacgggtgcccgttgcgcaactggctggatggccaa  
 ggccgctgcccggagcgcagcttgggtggcagcgttccggtgtctgttctgcccggatggcgtggca  
 acaacctgagcgcgctgctggccgacctgggcacggatgtcgagactccgttggagcgcctgacgctgt  
 tcgtgagagcacccgacgctggttaaggacatgattgacgctctgtcccggtggtgcccggaggcttggcg  
 ctggtcatgggtctggcgggtctggctccggcgtggtgaaagggtggccgtaacctgcccactggcca  
 atctggtcattagcaacgtgcccgggtccgctggtaaacgctattacgcaggtgcccgaactgatcggtta  
 ctaccgggttagcattctgacgcacggccaaggcctgaatgtgaccttggtagccgggtgagagcatc  
 gactttgggttgaccgggtgcgcagtcgltgaltcgcgcatctggacaaactgggcgacgcgctggaggctg  
 caactggcagactatgaggcagctgtgggtgatgacttggcacagcgaatgcccgttttaaccgagctgt  
 gccagcacccggtggtcgaagcgtggaagcgggtgatggtgcggcacgcctggcgtgacgcgtgtggcctaa

**FIG. 16 Cont.**

**Secuencia de polinucleótido con codones optimizados que codifica para E4 (Muestra de ballena muerta n.º 3) (SEQ ID NO: 46)**

atgagactggtgacggctggtgaccaactggttctggtgctggagagcogtaagcaaccgatgcatgtcg  
gcggtctggttgttttcgagctgccggacaacgcggacagcgattttgtgtaccaactggttaagcaaat  
gcaagaaagcgcagctgccgccttcgtttccggttcaatcaggtcctggagcatctggctttttggaagaaa  
gataaagattttgatggtgaaacaccacttgcaccacgtggccctgccgtccccgggtcgtgtccgtgagc  
tgctgatgtaacgttagccgtgagcaacggtcgtctgctggaccgcgcaatgccattgtgggaatgccatgt  
tggtgagggatcgaaccggaaaccgaaggtagcccgagcgttttgactgtatttcaaaatccatcac  
agcctggttgatggtattgcagctatgcgtttggtgcagaaaagcctgagccaaagcgcgaccgaaccgg  
tcacgctgccggtgtggagcctgatggcacgtcatcgtaaccacgtcaacgcgattctgccggctgaacg  
cagcgtgaagcgtatcatcaaagagcagatcagcaccatcaaaccgggtgttcacggaaactgctggataat  
ctgaaaaactactccgacgagggctatgtcggtaacctcgatgcacctatgagcatcctgaacaagcgc  
tttctgcctcccgcgctattgcggcacagagctacgacatcaagcgtttcaacgacattgccggagcgtct  
gaacattagcaagaacgatgtggtcctggcgggttgacagcgggtgccctgcgcccgttatctgattagcatg  
gacgcgctgccgagcaaacggtgatcgcgtttgtccctatgagcttgccgacggacaaaatccgttagcg  
gcaatcagctgagcttcgtcctggcgaatctgggcaactcacctggataaaccgctgctcgtattgagtt  
gattcatcgttctatgaacaatggtgagcgtcgttccgcgctatgaaccaagcacaggtgatcaattac  
agcgtcatcgcgtatgcatgggagggatcaatctggccaccggcctgtttccaaagaagcaagccttca  
atctgatcatctctaacgtgccgggttcggagaaaccgctgtactggaatggtgcccgcttgacagtcct  
gtatccggcgagcattgtgtttaacggtcagggcatgaaatcacgctggcgtcttatctggacaagatt  
gagttcggcatcaccgctgttctaaggcgtgcgcgctgttcaagatatgctgatgctgattgaagaag  
agctgcagttgctggaaacgactagcaaaagaactggcattcaaaggcattaccggtgaggacaaggcggg  
taacaaggcgcagcaaaaaccaagaactgacccataa

**FIG. 17**

>gi|40796035|gb|AAR91681.1| Ácido carboxílico reductasa dependiente de ATP/NADPH [Nocardia sp. NRRL 5646] (SEQ ID NO:54)

MAVDSPPERLQRRRIAQLFAEDEVKAAARPLEAVSAAVSAPGMRLAQIAATVMAGYADRPAAGQRAFELNT  
DDATGRTRSLRLLPRFETITTYRELWQRVGEVAAAHHDPENPLRAGDFVALLGFTSIDYATLADLADLHGA  
VTVPLQASAAVSQLIAILTETSPRLLASTPEHLDAAVECLLAGTTPERLVVFDYHPEDDDQRAAFESARR  
RLADAGSLVIVETLDVAVRARGRDLPAAPLFVPTDDDDPLALLIYTSGSTGTPKGAMYTNRLAATMWQNS  
MLQNSQRVGINLNYMPSHIAGRISLFGVLARCGTAYFAAKSDMSTLFEDI GLVVRPTEIFVPRVCEMV  
FQRYQSELDRRSVAGADLDTLDREVKADLRQNYLGGFRFLVAVVGSAPLAEMKTFMESVLDLPLHDCYGS  
TEAGASVLLDNQIQRPVLDYKLVDPVPELGYFRTRDRPHPRGELLKAEITIPGYKRPVETAEIFDEGDF  
YKTGDIVAELEHDLRVVYVDRRNNVLKLSQGEFVTVAHLEAVFASSPLIRQIFITYGSSERSYLLAVIVPTD  
DALRGRDTATLKSALAESIQRIAKDANLQPYEIPRDFLIETEPFTIANGLLSGIAKLLRPNLKERYGAQL  
EQMYTDLATGQADELLALRREAADLPVLETVSRAAKAMLGVASADMRAHFTDLGGDSLSALSFSNLLH  
EIFGVVFPVGVVVPANELRDLANYIEAERNRSGAKRPTFTSVHGGGSEIRAADLTDKFDARTLAAADS  
IPHAPVPAQTVLLTGANGYLGRFLCLEWLERLDKTTGGLICVVRGSDAAAARKRLDSAFDSGDPGLLEHY  
QLAARTLEVLGADIGDPLGLDDATWQRLAETVDLIVHPAALVNHVLPYTLQFQPNVVGTAEIFVRLAIT  
ARRKPVTYLSTVGVADQVDPAEYQEDSDVREMSAVRVVRESYANGYNSKWAGEVLLREAHDLGCLPVAV  
FRSDMILAHSRVAGQLNVQDVFTRLILSLVATGIAPYSFYRTDADGNRQRAHYDGLPADFAAAITALGI  
QATEGFRTYDVLNPDYDGLSDEFVDWLVESGHPYQIRITDYSDFWHRFETATRALPEKQRQASVPLLLDA  
YRNPFAVRGAILPAKEFQAAVQTAKIPEQDIPHLAPLIDKXYVSDLELLQLL

>gi|15609727|ref|NP\_217106.1| Ácido graso-CoA ligasa [Mycobacterium tuberculosis H37Rv] (SEQ ID NO:55)

MSINDQRLTRRVEDLYASDAQFAAASPNEAITQAIQCPGVALPQLIRVMMEGYADRPAALGQRALREVTDP  
DSGRTRMVELLPRFETITTYRELWARAGTLATALSAEPAIRPCDRVCVLGFNSVDYTTIDIALIRLGAVSVP  
LQTSAPVTLGRPIVITETETPMIATSIDNLDGAVEVLGAGHAPARLVVFDYHGKVDTHREAVEAARLAGS  
VTIDTLAELIERGRALPATPIADSADDALALLIYTSGSTGAPKGMARYESQVMSFWRKSSGWFPEPSGYFS  
ITLNFMPMSHVGGRRQVLYGTLNNGGTAYFVAKSDLSLTFEDLALVRPTELCEVPRVWDMVFAEFHSEVDR  
RLVDGADRAALEAQVKAELRENVLGGFRFVMAITGSAPISAEMTAWVESLLADVHLVEGYGSTEAGMVLND  
GMVRRPAVIDYKLVDPVPELGYFGTDQPYPRGELLVKTQTMFPGYQRPDVTAEVDPDGGFYRTGDIIMAKV  
GPDQFVYLDNRNVLKLSQGEFVAVSKLEAVFGDSPLVVRQIFITYGNSARAYPLAVVVPDGLSRHGIEN  
LKPVISESLEQVARAAGLQSYEIPRDFIETTPFTLENGLLTGIRKLARPKLKFYGERLERLYTELADS  
QSNELRELQSGPDAPVPLTLCRAAAALLGSTAADVRPDAHFADLGGDSLSALSANLLHEIFGVDVPPV  
VIVSPASDLRALADHIEAARTGVRPSPFASIHGRSATEVHASDLTDKFDAAATLAAAPNLPAPSAQVRT  
VLLTGATGFLGRYLALEWLDRLMVLNKGKICLVRRARSDEEAQARLDATFDGSDPYLVRHYRELGAGRLE  
LGVDKGEADLGLDRVITWQRLADTVLDIVDPAALVNHVLPYSQFQPNVVGTAEIFVRLAITGKRKPYIYTS  
TIAVGEQIPPEAFETEDADIRATISPTRRIDDSYANGYNSKWAGEVLLREAHQCGLPVTVFRCDMILADT  
SYTQQLNLPDMFTRLMLSLAATGIAPGSFYELDAGNRQRAHYDGLPVEFVAEAICTLGTHSPDRFVYH  
VMNPYDDGIGLDEFVDWLVNSPTSGSGCTIQRIADYGEWLQRFETSLRALPDRQRHASLLPLLNHYREPAK  
PICGSIAPTQDFRAAVQEAQIGPKDIPHLTAATIAKYISNLRLLGLL

>gi|118174788|gb|ABK75684.1|Proteína de la familia de epimerasa/deshidratasa dependiente de NAD [Mycobacterium smegmatis str. MC2 155] (SEQ ID NO:56)

MTIETREDRFRNRIDHLFETDPQFAAARPEAISAADPELRLFAAVKQILAGYADRPAALGKRAVEFVT  
DEEGRTTAKLLPRFDITTYRQLAGRIQAVTNAWHNPVNAGDRVAILGFTSVVDYTTIDIALLELGAVSVP  
LQTSAPVTLGRPIVITETETPMIATSIDNLDGAVEVLGAGHAPARLVVFDYHGKVDTHREAVEAARLAGS  
VTIDTLAELIERGRALPATPIADSADDALALLIYTSGSTGAPKGMARYESQVMSFWRKSSGWFPEPSGYFS  
ITLNFMPMSHVGGRRQVLYGTLNNGGTAYFVAKSDLSLTFEDLALVRPTELCEVPRVWDMVFAEFHSEVDR  
RLVDGADRAALEAQVKAELRENVLGGFRFVMAITGSAPISAEMKSWVEDLLMHLLLEGYSTEAGA  
VFIDGQIQRPVLDYKLVDPVPELGYFATDRPYPRGELLVKSEOMFPGYKRPETAEVDFDEGYYRTGDI  
VAVELGPDHLEYLDRRNNVLKLSQGEFVTVSKLEAVFGDSPLVVRQIYVYGNSARSYLLAVVVPTEALS  
RWDCDELKRSISQDSLQDAARAAGLQSYEIPRDFVETTPFTLENGLLTGIRKLARPKLKAHYGERLEQLYTD  
LAEQANLRELRRNGADRPVETVSRAAVALLGASVTDLRSDAHFTDLGGDSLSALSFSNLLHEIFDVD  
VPVGVIVSPATDLGVAAYIEGELRGSKRPTYASVHGRDATEVRARDLALGKFDKTLTSAAPGLPRSGT  
EIRTVLLTGATGFLGRYLALEWLDRLMVLNKGKICLVRRARSDEEARARLDATFDGSDPYLVRHYREL  
GAGRLEHLEVIAGDKGEADLGLDHDWQRLADTVLDIVDPAALVNHVLPYSQFQPNVVGTAEIFVRLAIT  
GKRKPYIYTSYVSTIGVQGISPEAFVEDADIREISATRRVDDSYANGYNSKWAGEVLLREAHQCGLPVTVFRCDMI  
LADTTYSQQLNLPDMFTRLMLSLVATGIAPGSFYELDAGNRQRAHYDGLPVEFVAEAICTLGTHSPDRFVYH

**FIG. 17 Cont.**

ETFHVMNPYDDGIGLDEYVDWLI EAGYPVHRVDDYATWLSRFETALRALPERQRQASLLPLLHNYQOPSP  
FVCGAMAPTDRFRAAVQDAKIGPKDIPHV TADVIKYIISNLQMLGLL

>gi|118469671|ref|YP\_889972.1| supuesta ácido graso-CoA ligasa de cadena larga  
[Mycobacterium smegmatis str. MC2 155] (SEQ ID NO: 57)

MTSDVHDATDGVTE TETALDDEQSTRRIAELYATDPEFAAAA PLPAVVDAAHK PGLRLAEILQTLFTGYGDR  
PALGYRARELATDEGGRTVTRLLPRFDTLTYAQVWSRVQAVAAA LRHNFAQPIYPGDAVATIGFASPDYL  
TLDLVCAYLGLVSVPLQHNAPVSR LAPILAEVEPRILTVSAEYLDLAVE SVRDVNSVSQLVVFDDHHPEVD  
DHRDALARAREQLAGKGI AVTTLDIAIADEGAGLPAEFIYTADHDQRLAMILYTSGSTGAPKGAMYTEAMV  
ARLWIMSFITGDPTPVINVMFPLNHLGGRIPISTAVQNGGTSYFVPESDMSTLFEDLALVRPTELGLVLP  
RVADMLYQHHLATVDRLVITQGADELTAEQKQAGAE LREQVLGGRRVITGFVSTAPLAEMRAFLDITLGAHI  
VDGYGLTETGAVTRDGVIVRPPVIDYK LIDVPELGYFSTDKPYPRGELLVRSQTLTPGYKRPVETASVF  
DRDGYHTGDVMAETAPDHLVYVDRRNNVLKLAQGEFVAVANLEAVFSGAALVVRQIFVYGNSE RSEFLAV  
VVPTFEALEQYDPAALKAALADSLQRTARDAELQSYEVPADFIVETEPFSAANGLLSGVGKLLRPNLKDR  
YQRLQEQMYADIAATQANQLREL RRAAATQPVITDLTQAARTILGTGSEVASDAHFTDLGGDSLSALTLS  
NLLSDFFGFEVPGTIVNPATNLAQLAQHIEAQTAGDRRPSFTIVHGADATEIRASELTLDKFIDAETL  
RAAPGLPKVTEPRIVLLSGANGWLGRF LTLQWLERLAPVGGTLITIVRGRDAAARARLTQAYDTPDEL  
SRRFAELADRHLRVVAGDIGDPNLGLTPEIWHRLAAEVDLVVHFAALVNHVLPYRQLFGPNVVGTAEVIK  
LALTERIKPVTYLSTVSVAMGIPDFEEDGDIRTVSPVRPLDGGYANGYGN SKWAGEVLLREAHDLGCLPV  
ATFRSDMILAHPRYRGQVNPDMFTRLLSLLITGVAPRSFYIGDGERPRAHYPLTVDFVAEAVTTLGA  
CQREGYVSYDVMNPHDDGISLDFVDWLRAGHPIDRVDDYDDWVRRFETALTALPEKRR AQTVLP LLA  
FRAPQAPLRCAPEPEVFAA VRTAKVCGDIPHLDEALIDKYIRDLREFGLI

>uniprot|A0PPD8|A0PPD8\_MYCUA Ácido graso-CoA ligasa FadD9 (SEQ ID NO:58)

MSPITREERLERRIQDLYANDPQFAAAKPVTAITAAIERPGLPLPQI IET  
VMTGYADRPALAQRSVEFVTDAGTGHTLRLLPHFETISY GELWDRI SAL  
ADVLSTEQTVKPSDRVCLLGFNSVDYATIDMTLARLGAVAVPLQTSAAIT  
QLQPIVAETQPTMIAASVDALADATELALSGQTATRVLVFDHHRQVDAHR  
AAVESARERLAGS AVVETLAEAIARGDVPRGASAGSAPGTDVSDDSLALL  
IYTSGSTGAPKGAMYPRRNVATFWRKRTWFEGGYEPSITLNFMPMSHVMG  
RQILYGLTLCNGGTAYFVVKSDLSTLFEDLALVRPTELTFVPRVDMVFDE  
FQSEVDRRLVDGADRVALEAQVKAERNDV LGGRYTSALTGSAPISDEMK  
ARWEELDMHLVEGYGSTEAGMILIDGAI RRPVLDYKLVDPDLGYFLT  
DRPHPRGELLVKTDLSLFPGYQRAEVTADVFDADGFYRTGDIMAEVGP EQ  
FVYLDRRNNVLKLSQGEFVTVSKLEAVFGDSPLVRQIYIYGN SARAYLLA  
VIVPTQEALDAVPVEELKARLGDSLQEVAKAAGLQSYEIPRDFI IETTPW  
TLQNGLLTGIRKLARPQLKKHYGELLEQIYTDLAHQADELRSLRQSGAD  
APVLVTVCRAAAALLGGSASDVQPD AHFTDLGGDSLSALSFTNLLHEIFD  
IDVPVGVIVSPANDLQALADYVEAARKPGSSRPTFASVHGASNEQVTEVH  
AGDLSLDFKIDAATLAEAPRLPAANTQVRTVLLTGATGFLGRYLALEWLE  
RMDLVEGKLCILVRAKSDTEARARLEKTFDSGAPELLAHYRALAGDHLEV  
LAGDKGEADLGLDRQTWQRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYSQLFGPNALG  
TAELLRLALTSKIKPYSYTSIGVADQIPPSAFTEDADIRVISATRAVDD  
SYANGYSNSKWAGEVLLREAHVLCGLPVAVFRCDMILADTTWAGQLNVPD  
MFTRMILSLAATGIAPGSFYELAADGARQRAHYDGLPVEFIAEAI STLGA  
QSQDGFHTYHVMNPYDDGIGLDEFVDWLNESGCP IQR IADYGDWLQRFET  
ALRALPDRQRHSSLLPLLHNYRQPERPVRGSIAPTDRFRAAVQEAKIGPD  
KDIPHVGAPIIVKYVSDLRLLGLL

>gi|227980601|ref|ZP\_04027864.1| proteína similar a tioéster reductasa  
[Tsukamurella paurometabola DSM 20162] (SEQ ID NO:59)

MSIETVQNGVPAEGSVPPADQOQTERLPQVIARIFAQFADRPAFATREAGPGTPYATVSYREIWRRTALV  
ASWQSEVAPGDFVAILGFTSSDFVTVDLATTLLGAPNVPLQAGAPAAATILDETRPKILAVSADQVDL  
AQEALAESAATPRVVVFDGERDGYEGIEADILSGSALPAPEFFAFEPGTDPLVTLIYTSGSTGTGPKGAMY  
TEQLVRDAWLKVDISVDMPAESLLHFLPMSHMYGRNWLITAGLASGGTGYFAGASDMSTLFDDLAAARP

FIG. 17 Cont.

TAIGLVPRVCELIHQRYLAVEADTDAETARVELRDRVLGGRLQAAMCGSAALSSELQTFMEWLLGIDIQI  
 GYGSTEAGGVIRDCVVRPPVTEYKLIIDVPELGYFVTDSPHPRGELLVKSTQLIPGYNSDKRIRDDEGF  
 YRTGDVMAELGPDFRLEYVDRRSNVIKLAQGEFVPIAQLEAIYAAGPDVHQIFLYGTSERSYLIQVVPVAP  
 GPDGETDAQTRTRVLDGLAAIARENDLAAEYVPRDVLIERDPFSQENGLRSGIGKLVPRPALIARYGDRRLH  
 DLYAQADTRQREGLRALDASGPIIDTVLGAAALTLGADIADFDADTRFGDLGGDLSALSALATLEGLYD  
 VVVPVQTIIVGPTATLGGVARHIEKARSGGVAAPTADSVHGVGASVARATDLTLEKFIIDPELLALAPTLPA  
 ATGEPNTVLLTGSTGYLGRFLLLDWLRVAPHGGTVIALVRGADADDARRRVTAATGSDSDPDLTQEFDSL  
 AEHHLHVIAGDFGSPALGLDDATWSDLAGRVDHVHCGALVNHVLPYDQLFQPNVVATGEVVRLALTRR  
 KSVDYVSTAVVPPQDDGRVLVEDDDVRELGAERRIGADAYANGYAVSKWAGEVLLHEAADLADLPVRVFR  
 SDMILASHRFHQFNEVDQFTRLLLSIAETGLAPASFYTPDPSGHRPHYDGLPVDFTAETITLSAAGRS  
 GYRTFPHVLNANDDGVSLDSFVDWIAASGRSIERIDDYDTWFARFEQALQQLPDEARQRSVLPVLLHAVREP  
 APAAGTSALSVDVFRGAVRETGVGPGDIPVLDRALIEKYLRDFETAGWLPAGARD

>gi|254431429|ref|ZP\_05045132.1| supuesta ácido graso-CoA ligasa de cadena larga  
 [Cyanobium sp. PCC 7001] (SEQ ID NO:60)

MNESSADQSSGNVSEGWPDASVTARALQAHLRYEQIIDAILSGYAERPALAERSYLVRPDPSTGGQTVRVH  
 EQAFRSISYRTLQERVHALTMAWRLHPDSPVQAGAFVVLVGFASIDYAVLDLALAYTKGVVPLSPNHSS  
 EDDDAILGTVPVTLAVSISEFSGCVDLIARSTSI RTVIVFDLDPAVDCERAALESIGIRALNEKGSDDVV  
 QTLQDLIDVGRDAEFSFLPIQAQDQDDLALLIHTSGSTGTFKGCACISSRALINTWRHVSQPYPKVTVVLA  
 PFHMMGRDSMITALGAGGTAYFTLRPDLSTVIEDIRLARPTGLVLFPRICEVISHHLTTAPEYSGNEIL  
 GGRQSIIVVASAPITPRLKASLECLLGVVSEGYSSSTETASGGLAMNGLNRRNNILAYRLRDVPEAGYSV  
 NDRPFPRGELCVKTRFGISGYFRNPEATAELFDDDGFYCTGDIIVEERAPDQIAIDRRKNVIKLAQGEYV  
 AVGRLEQLFQEGCGCVQIHLHGDSTRAYLLAVVVPDRNTLAPPGSRQASEALRKARVREIILTANQRE  
 LRGEIIPRDLILAEFFSQONGLSSSLGKPIRPAIRARYSRLESYASHEATRGTELEAIRASAGAVDV  
 ETTLLALLSSTLGVVCGAADRQTSFRELGGDSLAAVQLAMEIKKQFQVGLGEGSGLGPGGTVEAWARRIH  
 TASIQQAPHQRVGSPLAIPAECWLKPDHYRLENLIGIPIGTSPAEBVARPTGGPPTVLLTGATGFLGGR  
 CLEWLQRLAGQGGRLICLVRPSNSHSAWERLRNRFSHLEPEQVARFRELAGRHLVPIPADIGEPGLGLEP  
 GCQERLATEVDAICHCAAEVNHRLPYRHLVYRPNVIGTAEIHLAITTRLKSVDFISSIGVASLPRRPGGS  
 IPVEGGYARCYFASKWACEQLLRSTHDCQVVPVVRIRPDLIPDRVLGEMNPDLLSRLLYSILVTGIA  
 PGCFFEESONSGRSGFSVQGLPVDOLAQTILALGEARTEGFHVLNLDNADSSGSGVFLDAILQDIAARKGIRL  
 RRVEGYDLWLDAITTRLRLPAEQRRARSLDVAEAYAGSAGQTTQSSGEMQAGSSSCPPEITSLQPDFSR  
 AYRRKIVDDLARWGLIEPPGPVDQ

>uniprot|A0QIB5|A0QIB5\_MYCA1 Supuesta acil-CoA deshidrogenasa (SEQ ID  
 NO:61)

MSTATHERLDRRVHELIAITDPQFAAAQPDPAITAALQPGRLRPQIIRT  
 VLDGYADR PALGQRVVEFVTDAKTGRTSAQLLPRFETIITYGEVAQRVSAL  
 GRALSDDAVHPGDRVCVLGFNSVDYATIDMALGAIGAVSVPLQTSAAISS  
 LQPIVAETEPTLIASSVNQLSDAVQLITGAEQAPTRLVVFDYHPQVDDQR  
 EAVQDAAARLSGTGVAVQTLAELLERGKDLPAVAEPPADEDLALLIYTS  
 GSTGAPKAMYPQSNVGMWRRGSKNWFGEASAITLNFMPMSHVMGRSI  
 LYGTILNGGTAYFAARSDLSTLLEDELVLRPTLNFPRIWETLYGEFQR  
 QVERRLSEAGDAGERRAVEAEVLAEQRYLLGGRFTFAMTGSAPISPELR  
 NWVESLLEMHLMDGYGSTEAGMVLFDGEIQRPPVVDYKLVDPDLGYFST  
 DRPHPRGELLRLTENMFPGYKRAETTAGVFDDEDGYRTGDVFAEIAADR  
 LVYVDRRNNVCLKAQGEFVTLAKLEAVFGNSPLIRQIYVYGNASQPYLLA  
 VVPTBEALASGDPETLKPKIADSLQVQAKEAGLQSYEVPRDFIETTPF  
 SLENGLLTGIRKLAWPKLKQHYGERLEQMYADLAAGQADELAELRRNGAQ  
 APVLQTVSRAAGAMLGSAASDLSPDAHFTDLGGDSL.SALTFGNLLREIFD  
 VDVPVGVIVSPANLAAIASYIEAERQGSKRPTFASVHGRDATVVRAADL  
 TLDKFLDADTLASAPNLPKPATEVRTVLLTGATGLGRYLALEWLERMDM  
 VDGKVIALVRRASDEEARARLDKTFDSGDPKLLAHYQQLAADHLEVIAGD  
 KGEANLGLRQDVWQRLADTVDVIVDPAALVNHVLPYSELFGPNALGTAEL  
 IRLALTSKQKPYTYVSTIGVGDQIEPGKFVENADIRQMSATRAINDSYAN  
 GYGNSKWAGEVLLREAHDLCLPLVAVFRCDMILADTTYAGQLNLPDMFTR  
 LMLSLVATGIAPGFSYELDADGNRQRAHYDGLPVEFIAAAISTLGSQITD

**FIG. 17 Cont.**

SDTGFQTYHVMNPDYDDGIGLDEYVDWLVLDAGYSIERIADYSEWLRRFETS  
 LRALPDRQRQYSLPLLLHNYRTPEKPIGSIAPTDFRAAVQEAQIGPDK  
 DIPHVSPVIVKYITDLQLLGLL

>uniprot|A0QWI7|A0QWI7\_MYCS2 proteína de la familia de epimerasa/deshidratasa dependiente de NAD (SEQ ID NO:62)

MTIETREDRFNRRIIDHLEFETDPQFAAARPDFAISAAAADPELRLPAAVKQ  
 ILAGYADRPALGKRAVEFVTDEEGRTAKLLPRFDITTYRQLAGRIQAVT  
 NAWHNHPVAGDRVAIILGFTSVDYTTIDIALLELGAVSVPLQTSAPVAQL  
 QPIVAETEPKVIASSVDFLADAVALVESGPAPSRLVVFVFDYSHEVDDQREA  
 FEAAGKLAGTGVVETITDAIDRGRSLADAPLYVPDEADPLTLIYTS  
 STGTPKGMYPESKATMWQAGSKARWDET LGVMPSITLNFMPMSHVMGR  
 GILCSTLASGGTAYFAARSDLSFLEDLALVRPTQLNFVPRIDWMLFQEY  
 QSRLDNRAEGSEDRAEAAVLEEVRTQLLGGRFVSALTGSAPISAEMKSW  
 VEDLLDMHLLLEGYSGTEAGAVFIDGQIQRPVIDYKLVDPDLGYFATDR  
 PYPREGELLVKSEQMPFGYKRPETAEFDEDGYRTGDIVAELGPDHLE  
 YLDRRNNVLLKLSQGEFVTVSKLEAVFGDSPLVRQIYVYGNRSARYLLAVV  
 VPTEEALSRWDGDELKSRISDSLQDAARAAGLQSYEIPRDFLVETTPFTL  
 ENGLLTGIRKLARPKLKAHYGERLEQLYTDLAEGQANELRELRNGADRP  
 VVETVSRAAVALLGASVTDLRSDAHTDLGGDSLALSFNLLHEIFDVD  
 VPVGVIVSPATDLAGVAAYIEGELRGSKRPTYASVHGRDATEVRARDLAL  
 GKFIDAKTLSAAPGLPRSGTEIRTVLLTGATGFLGRYLALWLERMDLVD  
 GKVICLVRARSDDEARARLDATFDGDTLLEHYRALAADHLEVIAGDKG  
 EADLGLDHDWTQRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYSQMPGNALGTAEIR  
 IALTTIKPYVYVSTIGVGGQISPEAFVEDADIREISATRRVDDSYANGY  
 GNSKWAGEVLLREAHWCGLPVSVFRCDMILADTTYSGQLNLPDMFTRLM  
 LSLVATGIAPGSFYELDADGNRQRAHYDGLPVEFIAEAIISTIGSQVTDGF  
 ETFHVMNPDYDDGIGLDEYVDWLVIEAGYVHRVDDYATWLSRFETALRALP  
 ERQRQASLLPLLLHNYQQPSPVCGAMAPTDRFRAAVQDAKIGPKDIPHV  
 TADVIVKYISNLQMIGLL

>gi|254819907|ref|ZP\_05224908.1| FadD9 [Mycobacterium intracellulare ATCC 13950] (SEQ ID NO:63)

MSTAIKDEHLDRRIEELIANDPQFAAARPDPAITAATEAPGLRLPQIIRTVDGYADRPALAQRVVFEVT  
 DAKTGRTTAELLPRFETIYTGELGERVSALGRAWAGDAVRPGDRVCVLFNSVDYATIDIALGTIGAVSV  
 PLQTSAAISSLQPIVAETEPSLIASVNLQPDVAVELILAGDHVPGKLVVFDYQPCVDDQREAVEAAAARL  
 ADSCGVAVEALADVLRGKDLPAVEPPASDEDSLALLIYTSGSTGAPKGMYPQSNVGMWRGSKNWFGE  
 SAASITLNFMPMSHVMGRGILYGTILGNGGTAYFAARSDLSLLEDELELVRPTMNFVPRIDWETLYGEFOR  
 QVERRLADGDAGPEARETVAAAVLEEQRQYLLGGRFIFAMTGSAPTSPKAWAESLLQMHLMMDGYGSTE  
 AGMVLFDGGEIQRPVIDYKLVDPDLGYFSTDRPHPRGELLRTENMFPGYKRAETTANVFDEDGYRT  
 GDVFAEIAAPDRLVYVDRRNNVLLKLAQGEFVTLAKLEAVFGNSPLIRQIYVYGNSSOPYLLAVVVPTEEAL  
 ADNDLESILPKIADSLQKVAKETGLQSYEVPRDFIIEITPFTLENGLLTGIRKLAWPKLKAHYGDRLEQM  
 YAEALAAQCANELAELRRSGAAAPVAQTVSRAAAALLGATACDLADAHPTDLGGDSLALTFNLLREIF  
 DVDVPVGVIVSPANDLAGIAAYIEAERQGSKRPTFAAVHGRGATMVHASDLTLDKFLDEATLAAAPSLPK  
 PATEVVRTVLLTGATGFLGRYLALDWLERMDMVDGKVIALLVRARTDEEARARLDKTFDSDGPKLLAHYQRL  
 AADHLEVIAGDKGEANLGLDPQTWQRLAEVDVIVDPAALVNHVLPYSELFGPNALGTAEIRIALTSRQ  
 KPYTYVSTIGVGGQIQPGEFVENADIRQISATREINDGYANGYGNKSWAGEVLLREAHDLGCLPVTVFR  
 DMILADTTYAGQLNLPDMFTRLMLSLVATGIAPGSFYELDADGNRQRAHYDGLPVEFIAAAIISTLGTQIT  
 DSDTGFQTYHVMNPDYDDGIGLDEYVDWLVIEAGYSIERIADYSEWLRRFETSLRALPDRQRQYSLPLLLHN  
 YQKPEKPIGSMAPTDFRAAVQEAQIGPKDIPHVSAIVKYITDLELLGLL

**FIG. 17 Cont.**

>uniprot|A0R484|A0R484\_MYCS2 Supuesta ácido graso-CoA ligasa de cadena larga (SEQ ID NO:64)

MTSDVHDATDGVVTETALDDEQSTRRIAELYATDPEFAAAAAPLPAVVDAAH  
 KPGLRLAEILQTLFTGYGDRPALGYRARELATDEGGRTVTRLLPRFDLT  
 YAQVWSRVQAVAAALRHNFAQPIYPGDAVATIGFASPDYLTLDLVCAYLG  
 LVSVPLQHNAPVSRRLAPILAEVEPRILTVSAEYLDLAVESVRDVSQS  
 VVFDHHEVDDHRDALARAREQLAGKGIAVTTLDIAIDEGAGLPAPFIYT  
 ADHDQRLAMILYTSGSTGAPKAMYTEAMVARLWTMSFITGDPTVINVN  
 FMPLNHLGGRIPISTAVQNGGTSYFVPE.SDMSTLFEDLALVRPTEIGLVP  
 RVADMLYQHHLATVDRLVTOGADELTAEKQAGAELEQVVGRRVITGFVS  
 TAPLAAEMRAFLDITLGAHIVDGYGLTETGAVTRDGVIVRPPVIDYKLID  
 VPELGYFSTDKPYPRGELLVRSQTLTPGYKRPVETASVFDRODGYHTGD  
 VMAETAPDHLVYVDRRNNVLKLAQGEFVAVANLEAVFSGAALVRQIFVYG  
 NSERSFLLAVVVPTPEALEQYDPAALKAALADSLQRTARDAELQSYEVP  
 DFIVETEPFSAANGLLSGVGKLLRPNLKDRYQORLEQMYADIAATQANQL  
 RELRRAAATQPVVIDTLTQAAATILGTGSEVASDAHFTDLGGDSLSALTLS  
 NLLSDFFGFEVPGTIVNPNATLAQLAQHIEAORTAGDRRPSFTTVHGAD  
 ATEIRASELTDKFIIDAEFLRAAPGLPKVTEPRTVLLSGANGWLGRFLT  
 LQWLERLAPVGGTLITIVRGRDDAAARARLTQAYDTPELSRRFAELADR  
 HLRVAVAGDIGDNLGLTPEIWHRLAAEVDLVVHPAALVNHVLPYRQLFGP  
 NVVGTAEVIKALALTERIKPVTYLSTVSVAMGIPDFEEDGDIRTVSPVRPL  
 DGGYANGYGNKSWAGEVLLREAHDLCLGPVATFRSDMILAHPRYRGQVNV  
 PDMFTRLLLSLLITGVAPRSFYIGDGERPRAHYPGTLVDFVAEAVTTLGA  
 QQREGYVSYDVMNPHDDGISLDVFDVWLRAGHPIDRVDDYDDVRRFET  
 ALTALPEKRRAQTVLPLLHAFRAQAPLRGAPEPEVFFHAAVRTAKVGGP  
 DIPHLDEALIDKYIRDLREFGLI

>gi|240173202|ref|ZP\_04751860.1| FadD9 [Mycobacterium kansasii ATCC 12478] (SEQ ID NO:65)

MSTTTTRDERLERRIDTLIHDDAQFAAAKPDPAIAAALEKPGLSLPEIIQTALQGYADRPALGQRAVEFVT  
 DTQTGRTSVRLTRFETIYRQLGDRVGLARALTHDSVHAGDRVCVLGFNSLDYTTIDMALAKVGAVSV  
 PLQTSAAVTQLQPIVAETEPTMMAASVNLSDAVDVLVLSGHLPAKLVVFDYHPEVDDQREALDTARERLA  
 DTAVVVQTLKDVLDHGATLAAGSVAEPLAASGDNDLALLIYTSGSTGAPKAMYRQSNVGMWRSSKN  
 WFGPTAASITLNFMPMSHIMGRGVLYGTLGNGGTAYFAARSDDLLEDLRLVRPTELNFPVRIWETLYG  
 EYQRAVDQRSVDPGEPAAAREAVEAQVMAEQRQDLLGGRYIFAMTGSAPMSPELRNWVEALLEIPLLDGYG  
 STEAGVMVFDEIQRPVIDYKLVDPDLGYFSTIQPYPRGELLKTEMMPGYKRPVETASVFDADGY  
 YRTGDVVAEVAPDRLVYVDRRNNVLKLAQGEFVTVAKLEAVFGNSPLVRQIYVYGNSAHPYLLAVVPT  
 EASAGTDIAALKPLIADSLQTVAKEAGLQSYEVPDRFLIETTPFTLENGLLTGIRKLAWPKLRQHYGERL  
 EQLYTELAASQANELSELRRSGAHAPVLETVSRAAGALLGAASTALSPDAHFTDLGGDSLSALTFGNLLR  
 EIFDVDVVPVGVIVSPASDLAAIAAYIEGERQGSKRPTFAVIHGRDALEVHASDLDLTKFIDASTLAAAPV  
 LPPPSAAVRTVLLTGATGLGRLYLALDWLERMDLVGKVIALLVRAKSDDARARLDKTFDSDGPELLTHY  
 RRLATDHLVIAAGDKGEANLGLDQLTWQRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYSELFGPNALGTAEIRIALT  
 GKLPYTYVSTIGVGDQIEPGKFTEDADIRHISATRKINDSYANGYGNKSWAGEVLLREAHDLCLGPVAV  
 FRCDMILADTTWAGQLNVPDMFTRMMLSLVATGIAPGSFYELDADGNRQRAHYDGLPVEFIAEAIATLGA  
 RDGKGFQTYHVMNPDYDGI GMDRFVDVLDAGCAIHRIDYGDWLRRFETALRGLPEKQRHASLPLLHN  
 YQKPAPPLRGSMAPTDRFRAAVQDAKVGPKDIPHISQIIAKYLSDLRLGLL

>uniprot|A1KLT8|A1KLT8\_MYCBP Probable ácido graso-CoA ligasa fadD9 (SEQ ID NO:66)

MSINDQLTRRVEDLYASDAQFAAASPNEAITQAIQPGVALPQLIRMVM  
 EGYADRPALGQRALRFVTDPSGRTMVPELLPRFETIYRELWARAGTLAT  
 ALSAEPAIRPGDRVCVLGFNSVDYTTIDIALIRLGAHSVPLQTSAPVTGL



FIG. 17 Cont.

RLVDGADRAALEAQVKAELRENVLGGRFVMAITGSAPI SAEMTAWVESLL  
 ADVHLEVEYGGSTEAGMVLNDGMVRRPAVIDYKLVDPVELGYFGTDQPYPR  
 GELLVKTQTMFPGYYQRPDVTAEVFPDGFYRTGDIMAKVGPQDFVYLDLDR  
 RNNVLKLSQGEFIAVSKLEAVFGDSPVLRQIFIFYGNSARAYPLAVVPSG  
 DALSRHGIEMLKPVISESLQEVARAAGLQSYEIPROFIIETTPTLENGL  
 LTGIRKLARPQLKKFYGERLERLYTELADSQSNELRELRLQSGPDAPVLP  
 LCRAAAALLGSTAADVPRDAHFADLGGDSLSALSANLLHEIFGVDVPVG  
 VIVSPASDLRALADHIEAARTGVRPSPFASIHGRSATEVHASDITLDFKI  
 DAATLAAAPNLPAPSAQVTRVLLTGATGFLGRYLALWLDLDRMDLVNGKLI  
 CLVRRASDEEAQARLDATFDSDGDPYLVRHYRELGAGRLEVLGDKGEADL  
 GLDRVTWQRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYSQFLGPNAAAGTAELELRLALT  
 GKRPYIYTSIAVGEQIPPEAFTEADDIRAISPTRRIDDSYANGYANSK  
 WAGEVLLREAHEQCGLPVTVFRCDMILADTSYTGQNLNLPDMFTRMLSLA  
 ATGIAPGSFYELDAHGNRQRAHYDGLPVEFVAEAICTLGTHSPDRFVYH  
 VMNPDYDGIIGLDEFVDWLNSTSGSGCTIQRIADYGEWLQRFETSLRALP  
 DRQRHASLLPLLNHYREPAKPICGSIAPTDQFRAAVQEAIGPKDIPHL  
 TAAIIAKYISNLRLLGLL

>uniprot|A1T887|A1T887\_MYCVP Dominio de tioéster reductasa (SEQ ID NO:69)

MSTDTREDRLARRIADLYATDPQFAAAAPDDAISHAIDQPGTHLPVIVQT  
 VLDGYAERPALGQRAVRFVTDPATGRITTELLPRFETITYAELSRRIHAV  
 TAALTDVHPGDRVAVLGFTSIDYTTVDMALAMLGAVAVPLQTSAPATTVR  
 PIVAETEPVVIASSVDALTDVAVGLALDAPTIVRLVVFDRHAGVDDHRDAL  
 ISASDRLRAANSPIEVETITDIVARGSKLPVRAQFSADGDALSLLIYTS  
 STGAPKGMYPQHVLVANSWRRLARSFWDGLGVFPATLNFMPMSHVMGRG  
 LLYGTL DAGGTAYFAARSDLSTFLEDLALVRPTQLSFVPRIDWTIHAEVS  
 QELERRPSDATEVIADLRRSLLGGRYVTAMTGSAPLSPEMRAFVENLLDV  
 HLIDGYGSTEAGAVFVDGRVQRPPVIDYKLVVDVADLGYFSTDRPHRGEL  
 LVKSETLFPGGYKRPDVTAEVFPDGFYRTGDIVAETGADQLTYLDRRNN  
 VLKLSQGEFVTVSRLEAVFGNSPLVRQIYVYGN SARPYLLAVVVPTEAAL  
 AGADAKAAVAESLQDVAKATGLQSYEIPROFIIETTPTLENGL LTGIRK  
 LARPRLRERYGEQLEALYTM LSEEQADELRELRSGGERPALETVGRAAG  
 ALLGTTAGELEPSAHFTDLGGDSLSALTFANLLRDI FVDVVPVGVIVSPA  
 TDLQALADYVESARRHGSVRPTFESVHGHSRPGTEVHARDLTLDEFVDA  
 ATLAHAPTLPGPRAEVTRVLLTGATGFLGRYLALWLERMALVGGKLI  
 VRAKDDAAARVRLDSTFDSDGPELLRHYRRLAADHLEVIAGDKADADLGL  
 DARTWQRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYRQLFAPNVLGTAEELLRIALTTR  
 MKPFVYVSTIGVGAGIEPARFTEADDIRQISATRRIDDSYANGYNSKWA  
 GEVLLREAHDLCLPVSFVFRCDMILADTTYAGQNLNLPDMFTRLI FSLVAT  
 GVAPESFYHLATDGTQRQRAHYDGLPVEFIAEAI STLGSVDVAGSFRTYHVM  
 NPHDDGIIGLDEYVDWLIDAGHPIRRVDYPTWLQRFVVAITALPERQRQA  
 SLLPLLNHYQHPETPIRGS IAPTRDFREAVQDAKIGPKDIPHVTPQIVI  
 KYVTDLQRLGLL

>uniprot|A1UFA8|A1UFA8\_MYCSK Dominio de tioéster reductasa (SEQ ID NO:70)

MSTETREARLQQRIAHLFTTDPQFAAARPDPRISDAVDRDDTRLTAVSA  
 VMSGYADR PALGQRAAEFVTDPTGRTMELLPRFDITITYRELLDRVRL  
 TNAWHADGVRPGDRVALGFTGIDYTVVDLALIQLGAVAVPLQTSAAVEA  
 LRPIVAETEPMLIATGVDHVDAAEALALTGHRPSRVVVDHREQVDDERD  
 AVRAATARLGDAVPVETLAEVLRGAHLPAVAPHVFEADPLRLLIYTS  
 SAGAPKGMYPESKVAGMWRASAKAAWNNQTAIP SITLNF LPM SHVMGR  
 GLLCGTLSTGGTAYFAARSDLSTLLEDLRLVRPTQLSFVPRIDWMLFQEF  
 VGEVDRRVNDGADRPTAEADVLA VQRHELLGGRFVTAMTGSAPI SLEMKT

FIG. 17 Cont.

WVETLLDMHLVEGYGSTEAGAVFVDGHIQRPPVLDYKLVDPDLGYFSTD  
 RPHPRGELLVRSIQLFPGYYKRPDVTAEVFDDDDGFYRTGDIVAELGPDQV  
 QYLDRRNNVLKLAQGEFVTISKLEAVFAGSALVRQIYVYGNARSYLLAV  
 VVPTDDAVARHDPASLKTASASLQQAAGTAGLQSYELPRDFLVETQPFT  
 LENGLLTGIRKLARPKLKARYGDRLEALYVELVEGQAGELRTLRRDGAKR  
 PVAETVGRAAAALLGAAAADVRPDAHFTDLGGDSLSALTFGNLLQEIFGV  
 DVPVGVIVSPAADLASIAAYIEAEQASTGKRPTYASVHGRDAEQVHARDL  
 TLDKFLDAETLSAATELPGPSGEVRTVLLTGATGFLGRYLALDOWLERMAL  
 VDGKVICLVRAKDDAARKRLDDTFDSGDPKLLAHYRKLAAADHLEVLGAD  
 KGEADLGLPHPVWQRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYSQFLGPNALGTAEL  
 IRLALTTRIKPFITYVSTIGVGAGIEPGRFTEDDDIRVISPTRAVDTGYAN  
 GYGNSKWAGEVLLREAHDLGCLPVAVFRCDMILADTTYAGQLNLPDMFTR  
 MMLSLVTTGIAPKSFHPLDAKGHRQSAHYDGLPVEFVAESI SALGAQAVD  
 EAGTGFATYHVMNPHDDGIGLDEFVDWLVEAGYRIDRIDYAAWLQRFET  
 ALRALPERTROYSLPLLNHYQRPAHPINGAMAPTDRFRAAVQEAKLGPD  
 KDIPHVTPAVIVKYATDLELLGLI

>gi|254775919|ref|ZP\_05217435.1| FadD9 [Mycobacterium avium subsp.  
 avium ATCC 25291] (SEQ ID NO:71)

MSTATHDERLDRRVHELIAIDPQFAAAQPDPAITAALAEQPGRLRPQIIRTVLDGYADRPALGQRVVEFVT  
 DAKTGRISAQLLPRFETITYGEVAQRVSALGRALSDDAVHPGDRVCVLFNSVDYATIDMALGAIGAVSV  
 PLQTSAAISSLQPIVAETEPTLIASSVNQLSDAVQLITGAEQAPTRLVVFDYHPQVDDQREAVQDAAARL  
 SSTGVAVQTLAELLERKGLPAVGEPFADEDSLALIYTSGSTGAPKGMAMPQSNVGMWRRGSKNWFGE  
 SAASITLNFMPMSHVMGRSILYGTGNGGTAYFAARSDLSTLLEDLRLVRPTLNFVPRIWETLYGEFQR  
 QVERRLSESGDAGERRAVEAEVLAEQRQYLLGGRFTFAMTGSAPISPELRNWVESLLEMHLMDGYGSTE  
 GMVLFEDGEIQRPPVIDYKLVDPDLGYFSTDRPHPRGELLRTENMFPGYKRAETTAGVFDDEDGYRTG  
 DVFAEIAEDRLVYVDRRNNVLKLAQGEFVTLAKLEAVFGNSPLIRQIYVYGNASQPYLLAVVPTTEALA  
 SGPETLKPKIADSLQVQAKEAGLQSYEVPRDFI IETTPFSLENGLLTGIRKLAWPKLKQHYGERLEQMY  
 ADLAAGQANELAELRRNGAQAPVLQTVSRAAGAMLGSAASDLSPPDAHFTDLGGDSLSALTFGNLLREIFD  
 VDVPVGVIVSPANLAAIASYIEAERQGSKRPTFASVHGRDATVVRAADLTLDKFLDAETLAAAPNLKPK  
 ATEVRTVLLTGATGFLGRYLALWLERMDMVDGKVIALVRARSDEEARARLDKTFDSGDPKLLAHYQOLA  
 ADHLEVIAGDKGEANLGLGQDVWQRLADTVDVIVDPAALVNHVLPYSELFGPNALGTAELIRLALTSKQK  
 PITYVSTIGVGDQIEPKGFVENADIRQMSATRAINDSYANGYGNSKWAGEVLLREAHDLGCLPVAVFRCD  
 MILADTTYAGQLNLPDMFTRLMLSLVATGIAPGSFYELDADGNRQRAHYDGLPVEFAAAISTLGSQITD  
 SDTGFQTYHVMNPHYDDGIGLDEYVDWLVDAGYSIERIADYSEWLRFRFETSLRALPDRQRQYSLPLLNHY  
 RTPEKPIINGSIAPTDFRAAVQEAKIGPDKDIPHSPPVIVKYITDLQLLGLL

>uniprot|A3PYW9|A3PYW9\_MYCSJ Dominio de tioéster reductasa (SEQ ID NO:72)

MSTETREARLQORIAHLFATDPQFAAARPDPRISDAVDRDDARLTAIVSA  
 VMSGYADRPALGQRAAEFATDPQTGRITMELLPRFDITTYRELLDRVRAL  
 TNAWHADGVRPGDRVALGFTGIDYTVVDLALIQLGAVAVPLQTSAAVEA  
 LRPIVAETEPMLIATGVDHVDAAAELALTGHRPSQVVVDHREQVDDERD  
 AVRAATARLGDVAVPVEVTLAEVLRGGAHLPAVAPHVDFEADPLRLLIYTS  
 STGAPKGMAMPESKVGAMWRASAKAAWNNQTAIPSTLNFPLMSHVMGR  
 GLLCGTILSTGGTAYFAARSDLSTLLEDLRLVRPTQLSFVPRIWDMFLQEF  
 VGEVDRRVNDGADRPTAEADVLAELRQELLGGRFTAMTGSAPISPEMKT  
 WVETLLDMHLVEGYGSTEAGAVFVDGHIQRPPVLDYKLVDPDLGYFSTD  
 RPHPRGELLVRSIQLFPGYYKRPDVTAEVFDDDDGFYRTGDIVAELGPDQL  
 QYLDRRNNVLKLAQGEFVTISKLEAVFAGSALVRQIFVYGNARSYLLAV  
 VVPTDDAVARHDPASLKTASASLQQAAGTAGLQSYELPRDFLVETQPFT  
 LENGLLTGIRKLARPKLKARYGDRLEALYVELAEGQAGELRTLRRDGAKR  
 PVAETVGRAAAALLGAAAADVRPDAHFTDLGGDSLSALTFGNLLQEIFGV  
 DVPVGVIVSPAADLASIAAYIETEASTGKRPTYASVHGRDAEQVRARDL

**FIG. 17 Cont.**

TLDKFIDAETLSAATELPVPIGEVRTVLLTGATGFLGRYLALDWLERMAL  
 VDGKVICLVRAKDDAAARKRLDDTFDSGDPKLLAHYRKLAAADHLEVLAGD  
 KGEADLGLPHQVWQRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYSQLFGPNALGTAEL  
 IRLALTRIKPFTYVSTIGVGAGIEPGRFTEDDDIRVISPTRAVDTGYAN  
 GYGNSKWAGEVLLREAHDLCLPLVAVFRCDMILADTTYAGQLNLPDMFTR  
 MMVSLVTTGIAPKSFHPLDAKGRQRAHYDGLPVEFVAESI SALGAQAVD  
 EAGTGAFATYHVMNPHDDGIGLDEFVDWLVEAGYRIDRIDDYAAWLQRFET  
 ALRALPERTRQYSLPLHNYQRPAHPINGAMAPTDRFRAAVQEAKLGPD  
 KDIPHVTPGVIVKYATDLELLGLI

>gi|219932734|emb|CAR70557.1| proteína hipotética [Mycobacterium  
 leprae Br4923] (SEQ ID NO:73)

MSTVDGVCDEDIYYYYDCIYCAADVASPTGYLPGGLFSLAKLLVIRGEKQYVFLNDSTSVGPGPGNMPW  
 LDDPGLSAVIASSVAAAELAAARSW

>uniprot|A5CM59|A5CM59\_CLAM3 Supuesta acil-CoA sintetasa (SEQ ID  
 NO: 74)

MSTEQMGTEQMSQHEEDTSIEAIFAQHADRTRALRQRSGPDITDMGFRELW  
 DRAGALAAALGETVSAGDRIAVLGTATADAVTLDLAAWILGAVSVPLQAS  
 APVAALRAIVEETTPVWIAATADQAATARAVAEASGDGIRTMRLDTDTA  
 DTDTDAAALTLGALVARGAGLRRRSPWHPAPGDDPLALLLYTSGSTGTPKG  
 AMYTRSMVERMWHALRPDPAAPADASTTADDGDAAI VGYAYLPMSHLTG  
 RSSLLATLGRGGTVALATSTDLSTLFDLRTFAPTEFVFPVRAELVRQE  
 GDREEQRRLTAGSTDRDAVRAEVQADLRARAFGGRIHRAICTSAPLTPEL  
 RTYIEGCLGLTLHDLYGSTEAGGILHDGVIQPPVTEHKLVDVPELGYRT  
 TDRPHPRGELLVKSASVIAGYFRPDVTAAVFDEDGFYRTGDVMAQTGPG  
 TYEYVDRRNNVIKLSQGEFVAVASLEATYGGTPEVHQIALHGDSRHAFV  
 AVVVPADPAASERDILAAALQRTAREHGLAPYEVPVRCVIVEPDPFTVDGGM  
 LSDAGKLLRLRLTQRYGERLAAALYDALEEQQSGTLVAALRERADDEPTVD  
 TVVRAALLLGAEVSPATAAAARFSDLGGDSLSALTFSGILEDVFGTEVP  
 VGVLTDPINDLAAVAAAYVERSASDDRPTVTRVHGAGASTLRVGDRLDRM  
 LGGIPTVPRASAARPGSRTVLLTGANGYLGRFLAIDWLERLAATGGTLV  
 CIVRGADDADARRRLEAAFAADPAFARRFAELSGSLEVLGADVSEHRLGL  
 DDERWIDLAAARVDLVAHAAALVNHVLPYSALFGPNVVGTAEAIRLATAAG  
 SVPVTFVSSVAVAGGARPGATADAEPSPAGALDEHADIRATIPAWAVGDE  
 YANGYGASKWASEVLLREAEHHGVPVAVFRSDMILAHPRWRGQVNLDPV  
 FTRLIWSVLTGLAPASFVRRGPDGERQQRSHYDGLPADFTAAAI DGIGAA  
 LTEGHRTFNVMNPHDDGVSLDTFVDWIREDGHDIARVDDHAEWVDRFRAA  
 LGALPDADRARSVLPLMHAFASPEEPHAGSAIPADAFAEAVRAVRPLGSP  
 DIPSLDHALIAKVADDLAFLGLLAPARAAAA

>uniprot|A8M8D3|A8M8D3\_SALAI Dominio de tioéster reductasa (SEQ ID NO:75)

VTTTEQTLTERLIAEDEQIRRAQVSAEVSAAMRVPGMSQAQIVAAGFTGY  
 ADRAALGERAREAVTDPVTGRTTHRLLPWFDTITYGEVRSRVLAI SAAWW  
 HDVDAPLRPGAFVSVGVPSADLVTVLAVLHTGAVSVPLQVSS TAEQLR  
 PILDEAAPLIVATSVDRLAVVTAAMSGNASVRRIMVNLHDAAITAHRDAV  
 DAARSALAGTAVVVHTLTVLDRGRGLPAPEPYAAPTGEDPLSILLIYTS  
 STGTPKGMFPESMTRANWVRFDPKPTDMAVIRLNYLPLSHNVGRIVLFE  
 ALAVGGIAFFTAHSDLSTLLEDMALARPTDLFLIPRLCDMLAQRHSELA

FIG. 17 Cont.

RRRITTADHEGVRQVHTLREAVLGGRVTRAMSLSAPLSPQLRRFVESCL  
 GFAVHDFVFGSTEAGLLVNGRVL RPPVLDYRLVDVDPDLGYFTTDRPYPRG  
 ELLVRTATIIIPGYQRPELNAELFTEDGYRTGDIMAEGPDHLGYVDRT  
 TSVLKLKLSQGEFVAVSRLEELFAASPLIRQIYLYGNSERPYLLAVVVPT  
 AHAATREPAALKAVLGESLQRIAQHGLHPYEVPRDLIETTPTFSTANGL  
 LSDIRKPLRPLKTRYPRLAALYELAEREADRIRTLRDAGSAQPVLP  
 LREAAARAFGRPGAALDVNDRFVDLGGDSLALALSNI LSDIFEVRV  
 PVIIMISATGTLGSAVAVIEAERATAGAGIGRATPTSVHGANTQVHADDL  
 TLTGTFLDVTTLAAAACLPRAPLSDPRVLLTGATGYLGRFLALEWLDRLS  
 RSGGTLVCCVRAADDAEAARRLESVYGGSSDPELLERFRSLAGHVRLAGD  
 VAEARFGLPAGVWQELAEVLDLIVHSAALVNHVLPYEQLFGPNVAGTAE  
 LVR LAVSVRVKGI AFLSTVAVITSQTTTPDEDADIRQASPHRVLDDSYANG  
 YAASKWAGEVLLRRAHEEYGVFVSVFRSDVILAHSRVYAGQLNVPDMFTR  
 LLLL SILATGIAPASFYRTGPDGERQPAHYDGLPVDFTAAVAAVGVTEGH  
 RTFNVLNPHEDGIGLDTFVDWLVAAGHPVQRIADHDEWVTRFATAMRGLP  
 ERQRRSSILPLLHAFAPPTFGSRLPTDRFAAVKAAANVVPVNEIPLDAA  
 LVTKYADDLRLDLL

>uniprot|B1MCR9|B1MCR9\_MYCAB Probable ácido graso-CoA ligasa FadD (SEQ ID NO:76)

MTVNETNPNQEQSLRRRESLRESDPQFRAAQPDPVAEQLRPLGLHLS  
 AIAALMTGYAERPALGERARELVTDQDGRITLRLRPRFDTTTYGELWSR  
 TSVAAAWHHDAHPVKAGDLVATLGFTSIDYTVLDAIMILGGVAVPLQT  
 SAPASQWTTILAEAEPNLAVSIELIGAAMESVRATPSIKQVVVFDYTP  
 E VDDQREAFEAASTQLAGTGIAIETLDAVIARGAALPAAPLYAPSAGDD  
 PLALLIYTSGSTGAPKGAHSENI VRRWIRREDVMAGTENLPMIGLNFM  
 PMSHIMGRGTLTSTLSTGGTGYFAASSDMSTLFEDMELIRPTALALVPR  
 VCDMVFQRFQTEVDRRLASSDTASAEVAEVAEKADIRDNLFGGRVSAV  
 M VGSAPLSEELGEFIESCFELNLDG YGSTEAGMVFVRDGI VQRPPVI  
 DYKLVDPVPELGYFSTDKPHPRGELLKTDGMFLGYKRPVETAGVFDADG  
 F YMTGDIVA BLAHDNIEIDRRNNVLKLSQGEFVAVATLEAEYANSPV  
 VHQIYVYGSSE RSYLLAVVVPTPEAVAAAKGDAALKTTIADSLQDIAKE  
 IQLQSYEVPRD FIIIEPQPTQGNLLTGI AKLARP NLKAHYGPRLEQ  
 MYAEIAEQQAELRALHGVDPDKPALETVLKAAQALLGVSSAELAADA  
 HFTDLGGDSLALSFS DLLRDIFAVEVPVGVIVSAANDLSGVAKFV  
 DEQRYSGGTRPTAETVHGAG HTEIRAADLTLDKFIDEATLHAAP  
 SLPKAVGIPHTVLLTGSNGYLGHYLA LEWLERLDKTEGKLIIVR  
 GKNAEAYRLEEAFDTGDTQLLAHFRSLAD KHLEVLADGIDGPNL  
 GLDADTWQLADTVDIVHPAALVNHVLPYSQLFG PNVVGTAEIKLAI  
 TTKIKPVTYLSTVAVAAVDPPTTFDEESDIRLISAV RPVDELYANG  
 YGNSKWAGEVLLREAHDL CGLPVAVFRSDMILAHSRVYTGQ LNV  
 P DQFTRLILSLIATGIAPGSFYQAHATGERPLAHYDGLPGDFTA  
 EAITTLGTQVVDSEYETYDCVNPHADGVS LDNFVDWLI EAGYPIA  
 RIDNYTEWF TRFDTAIRSLPEKQKHSLLPLLHAFEQPSAAENHG  
 VVPAKRQFQHAVQAA GIGPAGQDGTDIPHSRRLIVKYAKOLEQLGLL

>uniprot|B1MCS0|B1MCS0\_MYCAB Probable ácido graso-CoA ligasa FadD (SEQ ID NO:77)

MTIDATAONTKEARRQLGDRIRRLFIDDEQFRAAKPDTAVDTAVAQ  
 PGLRLAQVVATIMNGYADRPALGHRVQELVADAAGRSTLRPLPEFET  
 VTYGELWGMARALASTWYHDPAAPVRAGDFVAMLGFTSVDYTA  
 VDLACIHLGAVAV PLQTSASASNWTAI LAESEPAVLAVSAELLD  
 TAMESVLATPSLRHITVFD YHPGVQVQRESLESAQHRIAEAGL  
 PISVDPIPLAIGHGRALPDAPLFTA

FIG. 17 Cont.

EGTDPALALVIYTSGSTGTPKGYSEKMWAKPWL RADTLSSKAEIPLINL  
 NFMPM SHVMGRGSLVTALACGGLAYFAASSDMSTLFEDITL TRPTVVTLV  
 PRVCDMLFQRYRNEVERRIGLDPAADLATLDADVKTDIRENLFGGRVLT  
 VCGSAPLSEELAAFIESC LDARITDGYGSTEAGVIVRNRIQRPPVIDYK  
 LVDVPELGYFSTDKPHPRGELLVKAESVFGGYFKRPDVTADVDFDPDGYK  
 TGDIVAELEPKIQIVDRRNNVIKLSQGEFVAIANLEAEFANSPLVHQIC  
 VYGSSERSYLLAVVVPTAEAYEQSGGDEDLKRLIADSLAQVAREALQS  
 YEVPRDFLLETETPFTAANGLLTGI AKLARPKLHEKYGARLEQLYSDIAAA  
 QALELQALHSAGHEDKPVLDTVQRAVTALLGLSAAEVSPDAHFI DLGGDS  
 LSALAFSDLLRDIFTVEVPVGDIVSAANDLTAIARIVERHREADGHSVTP  
 TAE SVHGAGHREIRAADLTLDKFIDADTLRAAPALSTFTGTPHTVLLTGA  
 NGYLG RFLALEWLERLDKTDGKLIATVIRGKNAEAAAYRRL EEAFTDGTQ  
 LAHFRSLADKHLEVLGADIGDPNLGLDADTWQRLAETVDVIVHPAALVNH  
 VLPYSQ LFGPNVVGTA EIIKLALTTKIKPITYLSTVAVAI SVDPKVFDED  
 SDIRTI SAVRPINDGYANGYGN AKWAGEVLLREAHDL CGLPVAVFRSDMI  
 LAHSRYTGQLNVPDQFTRLILSLIATGVAPGSFYQAHATGERPLAHYDGL  
 PADFTASAITALGPIIEFHTYDSVNPHADGISLDNFVDWLI EAGYPIARI  
 DNYTEWFTFRFDTAIRSLPEKQKQHSLLPLLHAYRHPQHHPNGAFLPAIRF  
 SEGVQAHLNADIPHLTRELIAKYAADLKQLGLL

>uniprot|B1MDX4|B1MDX4\_MYCAB Supuesta ácido graso-CoA ligasa (SEQ ID NO: 78)

MTAGAAARVAKLFESDPQFRAAMPDPAVMD SLLAPGLRLSQVLHALLSGY  
 AERPVMGFRSRESVVDATGRTVDRLLP AFETITYGQLEDISAILAEWQ  
 HGDIPMGAGDFIATIGFSSPDYVTLDLATLMNGSVS IPLQHNTSVAQLRM  
 MLEETSPRLVAASADCLDLAVEAAVGLTDLRRVVVF DYRAETDDHREKLA  
 TARERLHAACMDVVVEPLAEVIGRGRDLPEPVLYTAGDDQRTALIMYTSG  
 STGAPKGMFTEWTVTRFWSSGAAPNRDTP I INVNFLPLNHLAGRVGLLT  
 AFIPGGTCYFVPESDLSTLFEDWQLARPTHMGVVPRVVDMLFQHYQTRVD  
 ALMAGGTDVDTADRLAKTELRDVLGGRVVAGMLATAPLSPEMKAFLESS  
 LDFHLLDLYGLTEVGGVFRDGKISRPPVLDYKLVDPVPELGYTTDKPHPR  
 GELLVKSATATPGYYKRPDVTAEVFDADGYYRTGDVMAEVAPDQLVYVDR  
 RNNVIKLAQGEFVAVANLETVYVGAPLVRQIFVYGN SERAYLLAVVVPTE  
 EALRAHPDPVELKNSIRESLQRTARSNHLHSYELPADFI IETTPFTIESG  
 MAAVKGPIRPKMIEHYGDRLEQLYVDLAEARVQELRQLRDTAQQRVLD  
 TVTEAAQALLGMSADAVRPDHHFIDLGGDSL SALTFSNLLRDLFDVEVPV  
 GVITGPAADLRKLAAYIQHEREHSTATAASVHGLD TTVISATELTLDKFI  
 DAETLHNASQLDVPAGAVATVLLTGANGYLGRFLCLEWLQRLSQTGGQLI  
 CLVRGDNADQALARLVAA YGDTDRTLLEEFHTLARRHLRVIAADIAQPRF  
 GVDDATWEQLARDVDKIVHPAALVNHVLPYNQLFGPNVFGTAEVIRLALT  
 TRIKPVTYLSMAMVAMPVDFDEDDGDIRTVSPTRHIDPGYANGYANSKWA  
 GEVLLREAHDICGLPVSVFRSDMILTHRRYSQ LNVTD AFTRM LLSLVLT  
 GIAPRSFYQGDGSGAR PRAHYEGLPVDFVTEAITS LGLSSSEGFRSYDVM  
 NPHDDGISVDTFVDWLMEDGHSIDI IDNYDEWLSRFETALRGLPDEQRR  
 SVLPLL DAYRIPGNPRRAAATPNHVFRKAVQENNIGDGDADIPQIDRALI  
 AKYIADLRAHRL

>uniprot|B1MLD7|B1MLD7\_MYCAB Probable ácido graso-CoA ligasa FadD (SEQ ID NO: 79)

MTETISTA AVPTIDLEEQVKRRIEQVVSNDPQLAALLPEDSVTEAVNEPD  
 LPLVEVIRRLLEGYGDRPALGQRAFEFVTGDDGATVIALKPEYTTVSYRE  
 LWERA EIAAAWHEQGIRDGDFVAQLGFTSTDFASLDVAGLRLGTVSVPL  
 QTGASLQQRNAILEETRPVFAASIEYLDAAVDSVLATPSVRLLSVFDYH

FIG. 17 Cont.

AEVDSQREALEAVRARLESAGRTIVVEALAEALARGRDLPAAPLPSADPD  
 ALRLLIYTSGSTGTPKGAMYQWLWANLWQKKWLTDDVIPSIGVNFMPMS  
 HLAGRLTLMGTLGGGTAYYIASSDLSTFFEDIALIRPSEVLFVPRVEM  
 VFQRFQAEIDRSLAPGESNSEIAERIKVRIREQDFGGRVLSAGSGSAPLS  
 PEMTEFMESLLQVPLRDGYGSTEAGGVWRDGVLRPPVTDYKLVDVPELG  
 YFTTDSPHPRGELRLKSETMFPGYKRPETTADVFDDEGYKTDVVAEL  
 GPDHLKYLDRVKNVLKLAQGEFVAVSKLEAAYTGSPLVRQIFVYGNRSERS  
 FLLAVVPTPEVLERYADSPDALKPLIQDSLQVAKDAELQSYEIPRDFI  
 VETVPFTVESGLLSDARKLLRPKLDHYGERLEALYAELAESQNERLRQL  
 AREAATRPVLETVTDAAAALLGASSDLAPDVRFIDLGGDSLALSYSSEL  
 LRDIFEVDVPGVINSVANDLAAIARHIEAQRRTGAATQPTFASVHGKDAT  
 VITAGELTLDKFLDESLLKAAKDVQPATADVKTVLVTGGNGWLGRWLVD  
 WLERLAPNGGKVYALIRGADAEARARLDVAVYESGDPKLSAHYRQLAQQS  
 LEVIAGDFGDQDLGLSQEVWQKLAKDVDLIVHSGALVNHVLPYSQFLGPN  
 VAGTAEIKLAI SERLKPVTYLSTVGIADQIPVTEFEEDSDVRVMSAERQ  
 INDGYANGYGNKSWAGEVLLREAHDLAGLPVRVFRSDMLLAHSDYHGQLN  
 VTDVFTRSIQSLLLTGVAPASFYELDADGNRQRAHYDGVPGDFTAASITA  
 IGGVNVVDGYRSFVFNPHHDGVSMDTFVDWLDIDAGYKIARIDYDQWLA  
 RFELALKGLPEQQRQSVLPLKMYEKPQPAIDGSALPTAEFSRAVHEAK  
 VGDSGEIPHVTKELILKYASDIQLLGLV

>uniprot|B1VMZ4|B1VMZ4\_STRGG      Supuesta ácido carboxílico reductasa      (SEQ ID NO:80)

MAEPLDAATASAHDPGQGLAEALAAVEPGRALAEVMASVLEGHGDRPALG  
 ERAREPETGRLLPHFDTIISYRELWSRVRALAGRWHHDPEYPLGPGDRICT  
 LGFTSTDYATLIDLACIHLGAVPVPLPSNAPLPRAPVVEESGPTVLAASV  
 DRLDTAIDVVLASSTIRLLVFDGPGATRPGGALAAARQLSGSPVTVD  
 TLAGLIDRGRDLPPPPLYIPDPGEDPLALLIYTSGSTGAPKGAMYTQRL  
 GTAWYGFYSGAADTPAISVLYLPQSHLAGRYAVMGSLVKGGTGYFTAADD  
 LSTLFEDIALVRPTELTMPVRLCDMLLQHYRSERDRRADEPGDIEAAVTK  
 AVREDFLGGRVAKAFVGTAPLSAELTAFVESVLGFHLYTYGSGTEAGGVL  
 LDTVVQRPVPTDYKLVDVPELGYYATDLPHPRGELLLKSHLIPGYRRP  
 DLTAIFDADGYRTGDVFAETGPDRLVYVDRTKDTLKLSSQGEFVAVSRL  
 ETVLLDSPLVQHLYLYGNSEYLLAVVPTPDALAGCGDTEALRPLLM  
 ESLRSVARRAGLNAYEIPRGILVEPEPFSPEGLFTESHKLLRPRLKERY  
 GPALELLYDRLADGQDRRLRELRRTGADRPVQETVLRQAALLGSPGSDL  
 RPGAHFTDLGGDSLAVSFSSELMKEIFHVDVPGVIAIGPAADLAEVARYI  
 TAARRPAGAPRPTPASVHGEHRTEVRAGDLAPEKFLDAPTLAAAPALPRP  
 DGDVRTVLLTGATGYLGRFLCLEWLERLAPSGGRVCLVLRGSDATVAARR  
 LEAAFDSGDTALLRRYRKAAGKTLDDVVAGDIGEPVLLGLAEETWRELAGAV  
 DLIVHPAALVNHLPLPYGELFGPNVVGTAEAIRLALTTRKLPVNHVSTVAV  
 CLGTPAETADENADIRAAPVVRTTGQGYADGYATSKWAGEVLLREAHERY  
 GLPVAVFRSDMVLAHRTYTGQVNVDPVLRLLLSLVATGIAPGSFYRTDT  
 RAHYDGLPVDFTAEAVVALGAPITEGHRTFNVLNPHDDGVS LDTFVDWLI  
 EAGHPIRRIDDHGAWLTRFTAALRALPEKQRQHSLLPLIGAWAEPGEGAP  
 GPLLPARRFHAAVRAAGVGPREDIPRVSPDLIRKYVTDLRALGLLAGP

>uniprot|B2HE95|B2HE95\_MYCMM      Ácido graso-CoA ligasa      FadD9\_1 (SEQ ID NO:81)

MSITCVDTRAQRSARRIEQLYSTDAQFAAARPSTAVGIAISKSGLGLPQI  
 IQIVMDGYQRPALGQRATRVTDPNTGRSSAQLLAEFETITYRELWNR  
 NALTNFAAEALADRGQRVCVLFASIDYATIDLALMLLGAVSVPPTNA  
 ARAQLCHIVSETQPSLIASSTENLPDAISLVLSHRAPHRVVVFDYRPELD

AHREALEAARARLAAIPVTIVETLTAIIARGRTVRPAEADCGAQSADAPAL  
 LIYTSGSTGAPKGVVYTRNRVADFWRTSKAEVEATEQRTAP SITLNFMPM  
 SHANGRQVLYGTLNSGGTAYFTARSDLSTLFDDLALVRPTELGFPFRIWD  
 MLLERFGREVDRLRDGTAEGADPGALKARVAADLRQVLLGGRYALAMMG  
 SAPISEQMKASVESLLDLDMEGYGSTEAGTVIINNEVQRPQVIDYKLV  
 VAELGYFLTDRPYPRGELLVKTRTLFSGYYRDPEDGAQVDFDPGFYRTGD  
 IMAQVGPDRLAYLDRRNNVLKLSQGEFVAVSRLEAIFANSPLVRQIFVYA  
 NGARAYPLAVVPTQDAQSRHGRAELKAEHLTSLHRVAMSAGLAPYEIPR  
 DFIVETTPFTPQNGLLTAIHKLARPHLTQRYGARLELLYTELADSQTRRL  
 HRLRQTGGRLPALETIRRAAGALLGTETTEPRPEAHFKDLGGDSVSAVTF  
 SNLLHDIYGFVDPVGVILGPATDLRALASHVESRRGAGWSGSPFASVHVP  
 RATS VHAGDLKLAKFLDTKTLAAATSLPAADARARTVLLTGATGFLGRYL  
 VLEWLRRLRAVGGKLI CLVRAASDEQARVRLDTAFDSGDPQLPEHFRQLA  
 VDRLEVLGDKSEPGGLDGPTWQRLADTVDLIVDPATLVNHVLSYRQLF  
 APNVAGTAEALLRLALTTKRKPYAYVSTVSVANQIEPSAFTEADADIREISR  
 TRTIDDSFANGYTTSKWASEVLLREAHDLGGLPVTVFRCDMILADTSYAG  
 QLNLDATFTRLMLSVAATGIAPASFYRLGPDGKRQPAHFDGLPVEFIAEA  
 VATLGARRHDGQVHHVANPHHDGVLDEYVDWLVDAGCPIRRIPDYDEW  
 LSRFETALHALPDRKRRHSLPLLLQNYREPAEPIRGGIAPAPRFRGAVRQ  
 AKIGRDNDIPHVGPAIIAKYASDLQLLGLA

>uniprot|B2HN69|B2HN69\_MYCMM Ácido graso-CoA ligasa FadD9 (SEQ ID  
 NO: 82)

MSPITREERLERRIQDLYANDPQFAAAKPATAITAAIERPGLPLPQIIET  
 VMTGYADRPALAQRSVEFVTDAGTGHTTLRLLPHFETISYGELWDRI SAL  
 ADVLSTEQTVKPGDRVCLLGFNSVDYATIDMTLARLGAVAVPLQTSAAIT  
 QLQPIVAETQPTMIAASVDALADATELALSGQTATRVLVFDHHRQVDAHR  
 AAVESARERLAGSAVVETLAEA IARGDVPRGASAGSAPGTDVSDDSLALL  
 IYTSGSTGAPKGYPRNVATFRKRTWFEGGYEPSITLNFMPMSHVMG  
 RQILYGTLCNGGTAYFVAKSDLSLTFEDLALVRPTELTFFVRVWDMVFDE  
 FQSEVDRRLVDGADRVALEAQVKAERNDVLGGRYTSALTGSAPI SDEM  
 AWVEELDMHLVEGYGSTEAGMILIDGAIIRPAVLKYKLVDPDLGYFLT  
 DRPHPRGELLVKTDLSLFPGYQRAEVTADVFDADGFYRTGDIMAEVGP  
 FVYLDNRNNVLKLSQGEFVTVSKLEAVFGDSPLVRQIYIYGNSARAYLLA  
 VIVPTQEA LDVAVPEELKARLGDLSLQEVAKAAGLQSYEIPRDFI IETTPW  
 TLENGLLTGIRKLARPLKHHYGELEQIYTDLAHGQADELRSLRQSGAD  
 APVLTVCRAAAALLGGSASDVQPDHFTDLGGDSL SALSFTNLLHEIFD  
 IEVPVGVIVSPANDLQALADYVEAARKPGSSRPTFASVHGASNGQVTEVH  
 AGDLSLDFIDAATLAEAPRLPAANTQVVRTVLLTGATGFLGRYLALALEWLE  
 RMDLVDGKLI CLVRAKSDTEARARLDKTFDSGDPPELLAHYRALAGDHLEV  
 LAGDKGEADLGLDRQTWQRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYSQLFQPNALG  
 TAEALLRLALTSKIKPYSYTSSTIGVADQIPPSAFTEADADIRVISA  
 TRAVDDSYANGYSNSKWAGEVLLREAHDLGGLPVAVFRCDMILADTTWAGQLNVPD  
 MFTRMILSLAATGIAPGSFYELAADGARQRAHYDGLPVEFIAEASTLGA  
 QSQDGFHTYHVMNPDYDDGIGLDEFVDWLNESGCP IQR IADYGDWLQRFET  
 ALRALPDRQRHSSLLPLLNHYRQPERPVRGSIAPTDRFRAAVQEA  
 KIGPDKDIPHVGAPIIVKYVSDLRLLGLL

>uniprot|O69484|O69484\_MYCLE } Supuesta acil-CoA sintetasa (SEQ ID  
 NO: 83)

MSTITKQEKQLARRVDDLTANDPQFAAAKPDPAVAAA LAQGLRPLPQIIQ  
 TALDGYAERPALGQVAEFTKDPKTGRSMELLPSFETITIRQLGDRVGA  
 LARAWRHDLHAGYRVCVCLGFNSVDYATIDMALGVIGAVAVPLQTSAAIT  
 QLQSIVTETEPSMIATSVNQLPDTVELILSGQAPAKLVVFDYHPEVDEQH  
 DAVATARARLADSSVVVESLTEVLGRGKTLPATPIPVADDSADPLALLIY  
 TSGSTGAPKGYLQSNVGMWRRSDGNWFGPTAASITLNFMPMSHVMGR

**FIG. 17 Cont.**

GILYGLTNGGTAYFAARSDLSTLLEDLKLVRPTLNFVPRIWETLYDES  
 KRAVDRRLANSAGSADRAAIKAEVMDEQRQSLGGRYIAAMTGSAPT SPEL  
 KHGVESLLEMHLLEGYGSTEAGMVLFDGEVQRPPVIDYKLVDPDLGYFS  
 TDQPYPRGELLKTKQNMFPGYKREVTATVFDSDGYQTGDIVAIEVGPD  
 RLVYVDRRNNVLKLAQQQFVTVAKLEAAF SNSPLVRQIYIYGNSAHPYLL  
 AVVVPTEDALATNDIEVLKPLI IDSLQKVAKADLQSYEVPRLIVETTP  
 FSLENGLLTGIRKLAWPKLKQHYGARLEQLYADLVEGQANALHVLKQSV  
 NAPVLTQVSRVAVGTILGVATDLPNSAHFTDLGGDLSALTFGSLREL  
 DIDVDPVGVIVSPVNNLVAIADYIERERQGTKRPTFIAIHGRDAGKVHASD  
 LTLDKFIDVSTLTAAPVLAQPGTEVRTVLLTGATGFLGRYLALKWLERMD  
 LVEGVIALVRAKSNEDARARLDKTFDSGDPKLLAHYQELATDHLEVIAG  
 DKGEVDLELDRQTRRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYSELFPGNTLGTAE  
 LIRIALTSKQKPYIYVSTIGVGNQIEPAKFTEDSDIRVISPTRNINNNYA  
 NGYGNKSWAGEVLLREAHDLCLPVTVFRCDMILADTSYAGQLNVPDMFT  
 RMMLSLAATGIAPGSFYELDAESNRQRAHYDGLPVEFIAEAISTLGDQSL  
 HDRDGFTTYHVMNPHDDGIGMDEFVDWLDAGCPIQRINDYDEWLRRFEI  
 SLRALPERQRHSSLLPLLNHYQKPEKPLHGSLAPTIRFRTAVQANIGQD  
 KDIPHISPAITAKYVSDQLLGLV

>uniprot|Q10896|Q10896\_MYCTU PROBABLE PÉPTIDO SINTETASA NRP (PÉPTIDO  
**SINTASA)** (SEQ ID NO:84)

MSINDQRLTRRVEDLYASDAQFAASPNEAITQAIDQPGVALPQLIRMVM  
 EGYADRPALGQRALRFVTDPSGRTMVELLPRFETITYRELWARAGTLAT  
 ALSAEPAIRPGDRVCVLGFNSVDYTTIDIALIRLGAVSVPLQTSAPVTGL  
 RPIVTEPETMIATSIDNLGDAVEVLGAPARLVVFDYHGKVDTHREAV  
 EAARLAGSVTIDTLAELIERGRALPATPIADSADDALALLIYTSGSTG  
 APKGAMYRESQVMSFWRKSSGWFEPGYPSTLNFMPMSHVGGQVLYGT  
 LSNGGTAYFVAKSDLSTLFEDLALVRPTLFCVPRIDWVFAEFHSEVDR  
 RLVGDADRAALEAQVKAELENVGGRFVMAITGSAPI SAEMTAWVESLL  
 ADVHLVEGYGSTEAGMVLNDGMVRRPAVIDYKLVDPPELGYFGTDQPYPR  
 GELLVKTQTMFPGYYQRPDVTAEVFPDGFYRTGDIMAKVGPDQFVYLD  
 RNNVLKLSQGEFIAVSKLEAVFGDSPLVRQIFIYGNSARAYPLAVVPSG  
 DALSRHGIENLKPVI SEQLQEVARAAGLQSYEIPRDFIETTPFTLENGL  
 LTGIRKLARPLKQKFFYGERLERLYTELADSQSNELELRQSGPDAPVLP  
 LCRAAAALGSTAADVDPDAHFADLGGDLSALSANLLHEIFGVDPVPG  
 VIVSPASDLRALADHIEAARTGVRPSPFASIHGRSATEVHASDLTLDKFI  
 DAATLAAAPNLPAPSAQVRTVLLTGATGFLGRYLALWLDLDRMDLVNGKLI  
 CLVRARSDEEAQARLDATFDSGDPYLVRHYRELGAGRLEVLGDKGEADL  
 GLDRVTWQRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYSQLEFGPNAAGTAELRLALT  
 GKRKPYIYVSTIYAVGEQIPPEAFTEADIRAISPTRRIDDSYANGYANSK  
 WAGEVLLREAEQCGLPVTVFRCDMILADTSYTGQLNLPDMFTRLMLSLA  
 ATGIAPGSFYELDAHGNRQRAHYDGLPVEFVAEAICTLGTHSPDRFVYH  
 VMNPYDDGIGLDEFVDWLNSTSGSGCTIQRIADYGEWLQRFETSLRALP  
 DRQRHASLLPLLNHYREPAKPCGSIAPTDQFRAAVQEAKIGPKDIPHL  
 TAAITAKYISNLRLGLL

>uniprot|Q5YY80|Q5YY80\_NOCFA **Supuesta ácido carboxílico reductasa** (SEQ  
 ID NO:85)

VESTRATRLRQRIAAALYADDAQVRDARPEAISTALREPGLRLRELVATV  
 VDGYRDRPALAARSVQPAVDAATGACVARLLPEYTTMSYGELGLRLRAVA  
 AAWQHDDETRLRPGFVATLGFVSPDYAVVDLACVWAGAVAVPLQASASV  
 TQLTAI LAETAPAILATGLDTPHAVDCVLAGATPRALHVFDFDPAIDAQ  
 RTVYEACARLAGTGVRVRLAEVEDRGRALPPAVIDDGPGDDRLALLIY

FIG. 17 Cont.

TSGSTGTPKGAMYTERLVALMWLGQPQVAALTVNYLPLSHVAGRLALFGL  
 LARGGTAYFTARADMSILFEDLALARPTLFFVVRVCEMVLQRFQTERLR  
 RQADDDRVKADLRLELFGDRLLSVVCGSAPLAPLKAFMESVLDLTLHDG  
 YGSTEAGGSVVIDTTVRRPPVLDYRLADVPELGYFRTRDKPHPRGELLKLT  
 TTMIFGYRRPELNAQIFDEDFYRTGDVVAELAPDRLVYVDRRNVLKL  
 AQGEFVTIARLEAIFANSPLVRQIFVYGNSEAYLLAVIVPSRQAMAGDP  
 ATLKTRIAESLQLIGRDAELEAYEIPRDFLIETEPFTTESGLLSGIGKIL  
 RPAVEARYRDRLEQLYADLAAAQQDELAALRREAGQRPVLETVTRAAAAI  
 LGGTASDLSPAAHFTDLGGDSLAAALSNLLREIFAVEVPGVITGPATD  
 LRGLAAHIAAERENRTETPLFDRVHPDQILIRATDLALEKFFDAEELAAA  
 ATAAPPVAEPRVVLLTGANGYLGRFLCLEWLERLDRVDGRLICLVRGAE  
 AAALARLEAAFDSGDPELVRRFKELAQRRLLTVVAGDIGEPGLGLATATWR  
 RLAAEVEHIVHPAALVNHVLPYRQLFGPNVAGTAEILRLAL TERRKPIDF  
 LSTVAVAAQIPADRFAEDGDIRVISPTRITVDRGYANGYNSKWAAEVLIR  
 AAHDFDLVAVFRSDMILAHGSFAGQLNIPDVFTRLLLSLVTGIAPAS  
 FHAATVTGERPRAHYDGLPADFTAAAITALGARTAGFHTYDVLNPHDDGI  
 SLDTFVDWLEIAGHPIERIPEHSEWVTRFETALHALPERQRKHSLLPLLH  
 AYRRFPVALRGSALPAEFRAAVRAAGITADGDI PHLTRALIEKYVADLR  
 LHGLL

>uniprot|Q6RKB1|Q6RKB1\_9NOCA Ácido carboxílico reductasa dependiente de  
 ATP/NADPH (SEQ ID NO:86)

MAVDSPPERLQRRIAQLFAEDEQVKAARPLEAVSAAVSAPGMRLAQIAAT  
 VMAGYADRPAAQRAFELNTDDATGRSLRLLPRFETITYRELWQRVGEV  
 AAAWHHDENPLRAGDFVALLGFTSIDYATLADLADIHLGAVTVPLQASAA  
 VSQLIAILTETSPRLLASTPEHLDAAVECLLAGTTPERLVVFDYHPEDDD  
 QRAAFESARRRLADAGSLVIVETLDAVRARGRDLPAAPLFPVPTDDDDPLA  
 LLIYTSGSTGTPKGAMYNRLAATMWQNSMLQNSQRVGINLNYPMSH  
 IAGRISLFGVLARGGTAYFAAKSDMSTLFEIDIGLVRPTEIFFVPRVCDMV  
 FQRYQSELDRRSVAGADLDTLDREVKADLRQNYLGGRFVAVVGSAPLAA  
 EMKTFMESVLDLPLHDGYGSTEAGASVLLDNQIQRPPVLDYKLVDPPELG  
 YFRTRDRPHPRGELLKKAETIPGYKRPVETAEIFDEDFYKTDIVAE  
 EHDRLVYVDRRNVLKLQGEFVTVAHLEAVFASSPLIRQIFIYGSSESS  
 YLLAVIVPTDDALRGRDTATLKSALAESIQRIAKDANLQPYEIPRDFLIE  
 TEPFTIANGLLSGIAKLLRPNLKERYGAQLEQMYTDLATGQADELLALRR  
 EAADLPVLETVSRAAKAMLGVASADM RPDAHFTDLGGDSLALSFSNLLH  
 EIFGVEVPGVVVSPANELRDLANYIEAERNNGAKRPTFTSVHGGGSETR  
 AADLTLDKFDARTLAAADSI PHAPVPAQTVLLTGANGYLGRFLCLEWLE  
 RLDKTGGLICVVRGSDAAAARKRLDSAFDSGDPGLLEHYQQLAARTLEV  
 LAGDIGDPNLGLDDATWQRLAETVDLIVHPAALVNHVLPYTQLFGPNVVG  
 TAEIVRLAITARRKPVTYLSTVGVADQVDPAEYQEDSDVREMSAVRVVRE  
 SYANGYNSKWAGEVLLREAHDLCLPVAVFRSDMILAHSRVAGQLNVQD  
 VFTRLILSLVATGIAPYSFYRTDADGNRQRAHYDGLPADFTAAAITALGI  
 QATEGFRTYDVLNPHYDDGISLDEFVDWLVESGHPIQRITDYSDFHRFET  
 AIRALPEKQRQASVPLPLDAYRNPCPAVRGAILPAKEFQAAVQTAKIGPE  
 QDIPHLSAPLIDKYVSDELLQLL

>uniprot|Q741P9|Q741P9\_MYCPA FadD9 (SEQ ID NO:87)  
 MSTATHDERLDRRVHELIAIDPQFAAAQPDPAITAALEQPGRLRPQIIRT  
 VLDGYADRPALGQRVVEFVTDAKTGRISAQQLLPRFETITYSEVAQRVSAL  
 GRALSDDAVHPGDRVCVLGFNSVDYATIDMALGAIGAVSVPLQTSAAISS  
 LQPIVAETEPTLIASSVNQLSDAVQLITGAEQAPTRLVVFVDFYHPQVDDQR  
 EAVQDAAARLSSTGVAVQTLAELLERCKDLPVAEPPAEDDSLALLIYTS

FIG. 17 Cont.

GSTGAPKAMYPQSNVGMWRRGSKNWFGEAASITLNFMPMSHVMSGRSI  
 LYGTGNGGTAYFAARSDLSLLEDELELVRPTLNFVPRIVETLYGEFQR  
 QVERRLSEAGDAGERRAVEAEVLAEQRQYLLGGRFTFAMTGSAPISPELR  
 NWVESLLEMHIMDGYGSTEAGMVLFDGEIQRPPVIDYKLVDPDLGYFST  
 DRPHPRGELLRLTENMFPGYKRAETTAGVFDGYYRTGDVFAEIAPDR  
 LVYVDRRNNVLKLAQGEFVTLAKLEAVFGNSPLIRQIYVYGNQAQPYLLA  
 VVVPTEEALASGDPETLKPKIADSLQQVAKEAGLQSYEVPRDFI IETTPF  
 SLENGLLTGIRKLAWPKLQHYGERLEQMYADLAACQANELAELRRNGAQ  
 APVLTQTVSRAAGAMLGSAASDLSPDAHFTDLGGDSL SALTFGNLLREIFD  
 VDVPVGVIVSPANDLAAIASYIEAERQGSKRPTFASVHGRDATVVRADL  
 TLDKFLDAETLAAAPNLPKPATEVRTVLLTGATGFLGRYLALWLERMDM  
 VDGKVIALLVRARSDEEARARLDKTFDSGDPKLLAHYQQLAADHLEVIAGD  
 KGEANLGLGQDVWQRLADTVDIVDPAALVNHVLPYSELFGPNALGTAEL  
 IRLALTSKQKPYTYVSTIGVGDQIEPGKFVENADIRQMSATRAINDSYAN  
 GYGNSKWAGEVLLREAHDLGCLPVAVFRCDMILADTYAGQLNLPDMFTR  
 LMLSLVATGIAPGSFYELDADGNRQRAHYDGLPVEFIAAAISTLGSQITD  
 SDTGFQTYHVMNPFYDDGVGLDEYVDWLVDAGYSIERIADYSEWLRRFETS  
 LRALPDRQRQYSLPLLHNYRTPEKPIGSIAPTDFRAAVQEAKIGPDK  
 DIPHVSPPVIVKYITDQLLGLL

>uniprot|Q7D6X4|Q7D6X4\_MYCTU      Supuesta sustrato-CoA ligasa      (SEQ ID NO: 88)

MSINDQRLTRRVEDLYASDAQFAAASPNEAITQAIDQPGVALPQLIRMVM  
 EGYADRPALGQRALRFVTDPSGRIMVELLPRFETITYRELWARAGTLAT  
 ALSAEPAIRPGDRVCVLFNSVDYTTIDIALIRLGAVSVPLQTSAPVTGL  
 RPIVTETETPMIATSIDNLGDAVEVLGAPARLVVFDYHGKVDTHREAV  
 EAARARLAGSVTIDTLAELIERGRALPATPIADSADDALALLIYTSGSTG  
 APKGAMYRESQVMSFWRKSSGWFEPSGYPSITLNFMPMSHVGGQVLYGT  
 LSNGGTAYFVAKSDLSLTFEDLALVRPTLFCFVPRIDMVF AEFHSEVDR  
 RLVDGADRAALEAQKAELELRENVLGGRFVMAITGSAPI SAEMTAWVESLL  
 ADVHLVEGYGSTEAGMVLNDGMVRRPAVIDYKLVDPPELGYFGTDQPYPR  
 GELLVKTQTMFPGYQRPDVTAEVFDPDGFYRTGDIMAKVGPDPVYLDLDR  
 RNNVLKLSQGEFIAVSKLEAVFGDSPLVRQIF IYGN SARAYPLAVVPSG  
 DALSRHGIE NLKPVISESLQEVARAAGLQSYEIPRDFI IETTPF TLENGL  
 LTGIRKLARPQLKKFYGERLERLYTELADSQSNELELRLRQSGPDAPVLP  
 LCRAAAALLGSTAADVRPDAHFDLGGDSL SALSANLLEHIFGVDVPVG  
 VIVSPASDLRALADHIEAARTGVRPSPFASIHGRSATEVHASDITLTKFI  
 DAATLAAAPNLPAPSAQVRTVLLTGATGFLGRYLALWLDLDRMDLVNGKLI  
 CLVRRARSDEEAQARLDATFDSGDPYLVRHYRELGAGRLEVLGDKGEADL  
 GLDRVTWQRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYSQVLFPGPNAAGTAELRLRALT  
 GKRKPYIYTSIAVGEQIRPEAFTEADIRAI SPTRRIDDSYANGYANSK  
 WAGEVLLREAEHQCGLPVTVFRCDMILADTSYTGQLNLPDMFTRLMLSLA  
 ATGIAPGSFYELDAHGNRQRAHYDGLPVEFVAEAICTLGTHSPDRFVYH  
 VMNPFYDDIGLDEFVDWLNSTSGSGCTIQRIADYGEWLQRFETSLRALP  
 DRQRHASLPLLHNYREPAKPIGSIAPTDFRAAVQEAKIGPDKDIPHL  
 TAAITAKYISNLRLGLL

>uniprot|Q7TY99|Q7TY99\_MYCBO PROBABLE ÁCIDO GRASO CoA LIGASA FADD9  
 (ÁCIDO GRASO-CoA SINTETASA) (ÁCIDO GRASO-CoA SINTASA)      (SEQ ID NO: 89)

MSINDQRLTRRVEDLYASDAQFAAASPNEAITQAIDQPGVALPQLIRMVM  
 EGYADRPALGQRALRFVTDPSGRIMVELLPRFETITYRELWARAGTLAT  
 ALSAEPAIRPGDRVCVLFNSVDYTTIDIALIRLGAVSVPLQTSAPVTGL  
 RPIVTETETPMIATSIDNLGDAVEVLGAPARLVVFDYHGKVDTHREAV

FIG. 17 Cont.

EAARARLAGSVTIDTLAELIERGRALPATPIADSADDALALLIYTSGSTG  
 APKGAMYRESQVMSFWRKSSGWFEPSGYPSITLNFMPMSHVGGQVLYGT  
 LSNGGTAYYVAKSDLSTLFPEDLALVRPELFCFVPRIDWVFAEFHSEVDR  
 RLVDGADRRAALEAQVKAELENVVGGRFVMAITGSAPI SAEMTAWVESLL  
 ADVHLVEGYGSTEAGMVLNDGMVRRPAVIDYKLVDPVELGYFGTDQPYPR  
 GELLVKTQTMFPGYYQRPDVTAEVFDPDGFYRTGDIMAKVGPQDFVYLDL  
 RNNVLKLSQGEFIAVSKLEAVFGDSPLVRQIFIIYGN SARAYPLAVVPSG  
 DALSRHG IENLKPVIS ESLQEVARAAGLQSYEIPROFIIETTPTLENGL  
 LTGIRKLRPQLKKFYGERLERLYTELADSQSNELELRLRQSGPDAPVLP  
 LCRAAAALLGSTAADVPRDAHFADLGGDSLALS LANLHEIFGVDVPVG  
 VIVSPAADLRALADHIEAARTGVRRPSFASIHGRSATEVHASDLTLDKFI  
 DAATLAAAPNLPAQSAQVTVLTLTGATGFLGRYLALENLDRMDLVNGKLI  
 CLVRARSDEEAQARLDATFDSDGDPYLVRHYRELGAGRLEVLGDKGEADL  
 GLDRVTWQRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYSQFLGPNAAAGTAE LLRIALT  
 GKRKPYIYTSTIAVGEQIPPEAFTEADIRAI SPTRRIDDSYANGYANSK  
 WAGEVLLREAEHQCGLPVTVFRCDMILADTSYTGQNLNLPDMFTRMLSLA  
 ATGIAPGSFYELDAHGNRQRAHYDGLPVEFVAEAICTLGTHSPDRFVYH  
 VMNPDYDDGIGLDEFVDWLNSTSGSGCTIQRIADYGEWLQRFETSLRALP  
 DRQRHTSLPLLLHNYREPAKPICGSIAPTDQFRAAVQEAKIGPKDIPHL  
 TAAIIAKYISNLRLLGLL

>uniprot|Q9CCT4|Q9CCT4\_MYCLE **Supuesta acil-CoA sintetasa** (SEQ ID NO:90)

VWRQQSISHRKESVMSTITKQEKQLARRVDDLTANDPQFAAAKDPAAVAA  
 ALAQPGRLRPQIIQTALDGYAERPALGQRVAEFTKDPKTGRTSMELLPSF  
 ETITYRQLGDRVGALARAWRHDLHAGYRVCVVLGFNSVDYAIIDMALGVI  
 GAVAVPLQTSAAITQLQSIVTETEPSMIATSVNQLPDTVELILSQQAPAK  
 LVVFDYHPEVDEQHDVAVATARARLADSSVVVESLTEVLGRGKTLPATPIP  
 VADDSADPLALLIYTSGSTGAPKGMAYLQSNVGMWRSDGNWFGPTAAS  
 ITLNFMPMSHVMMGRGILYGTILGNGGTAYFAARSDLTLLLEDLKLVRPEL  
 NFVPRIWETLYDESKRAVDRRLANS GSAADRAAIKAEVMDEQRQSLGGRY  
 IAAMTGSAPTSPELKHGVESSLMEHLLLEGYGSTEAGMVLFDGEVQRPPVI  
 DYKLVDPDLGYFSTDQPYPRGELLKTQNMFPGYKRPEVTATVFDSDG  
 YYQTGDIVA EVGPDRLVYVDRNNVLKLAQQGFVTVAKLEAAFSNSPLVR  
 QIYIYGN SAHPYLLAVVPTEDALATNDIEVLKPLIIDSLQKVAKEADLQ  
 SYEVPRLIVETTPFSL ENGLLTGIRKLA WPKPKQHYGARLEQLYADLVE  
 GQANALHVLKQSVANAPVLTQVSRVGTILGVATTDLPSNAHFTDLGGDS  
 LSALTFGSLRLRELFDIDVPVGVIVSPVNNLVAIADYIERERQGTKRPTFI  
 AIHGRDAGKVHASDLTLDKFI DVSTLTAAPVLAQPGTEVRTVLLTGATGF  
 LGRYLALKWLERMDLVEGKVI ALVRAKSNEDARARLDKTFDSDGPKLLAH  
 YQELADHLEVIAGDKGEVDLELDRQTWRRADTVDLIVDPAALVNHVLP  
 YSELFGPNTLGTAELIRIALTSKQKPYIYVSTIGVGNQIEPAKFTEDSDI  
 RVISPTRNINNNYANGYGN SKWAGEVLLREAHDL CGLPVTVFRCDMILAD  
 TSYAGQLNVPDMFTRMMLSLAATGIAPGSFYELDAESNRQRAHYDGLPVE  
 FIAEAI STLGDQSLHDRDGFTTYHVMNPHDDGIGMDEFVDWLI DAGCPIQ  
 RINDYDEWLRRFEISL RALPERQRHSSLLPLLLHNYQKPEKPLHGSLAPTI  
 RFRTAVQANIGQDKDIPHISPAAIIAKYVSDLQLLGLV

>uniprot|Q54JK0|Q54JK0\_DICDI **Supuesta proteína no caracterizada** (SEQ ID NO:91)

MLKHKNFLTRKEERKEKEVEKLDGVSITEVKQSNLVVYSCNGCGSEIWPQKQERYACNECSN  
 FDLCSCEYRKEMILINGTQEEKDKLVSGESNNGIKYEPVRHYDPSPLPHQLTLENETQFQVLYSL  
 RGNSTFETMEKSFYKFNRPCLGIRERLGEDNVL SERYKWLTYGEVYKESLTLAKALNFIERRD  
 FISIYMDNCLEWYFTDFASLWAGLIVVPLHHSANSFNLLEILWNSSESKCIVCSGESFKNLIELYDQL

FIG. 17 Cont.

```
TEQDKLEKPIVLKLVHKEDLFDQSLVDRLPSGVFEKTFNEMIKIGESLSQAKYEFVPGPNDLSS
VTYTSGSTGVPKGVMLKDSIFNLLIVNSYVQFPNAVYSYNTLSHSQRLSDWRYIYMGGRAVAIYSG
DMNLLFEDLALVRPHSFVAVPRFWNLLFTQFKSDLKQYMFENPQLDERTATLYCYKGIKLLGD
RNNLVTTGGAPTANEVLKFMSCWKDINISNSYGLTEVSGVCIDGYISDEVEFKIEPVPSFGYYPT
DLPHPRGELVVKSSSTMSAGYYKNTQLTSESEFEGGWFKTGDVVELIGVRKVKIIDRIKHAFKLANG
EFVTPELENNFVSLCINQIFIIYGNLSKTLVAIVKPSQDCLKQLGLQDIPIDQLIENPTLKSLLSEI
NKISKEKLANYEIPKIIITIDFTWETIDNKLITGSGKFNREGELYKFKIKINNMFDIIDKIQQGLRNNNN
NNNNNDINNNNDNNNNNESKDNFENYIKSILNLDGRIEDNNFNLENLSFIQIGGDSLAVKLSLL
KEKENIDISPSTILNQFNLSLKLINKEKSNQSI VEDFKENFKINWNEEMILDEDIKKSIDQIKNAQ
PSSTPSSSKSTPSQSSSSPPPSLNSNINIGONAFHMKSIFITGVTGYLGTFLFNLLEDKSIGIERIY
CLVRNVKNEEFGFKLIERIFEKSCINGMNEKIREKVI PVCGDLSKPPFGVSTETFKMLS LAVDMVIH
NGAIVNMAYPYANMKSTINVTSTRDILRLCTTGRASFKKLVYVSTVG VFFGNGDEKIDESTAPSTF
FLDHGNGYNQTKLISDILVREAAASYGLPTMIFRPGTIFSH TQSGFNQND SIGLI IKGILGSSSYPTK
KDYSSGDLNLS PVDWVSSMVSLIKHLPWCNNTKIYHMVNDNR LSLDLLCQYINKEKQLEEINY
FDWIDAQLN SNNPLYSIKHLFKKDRFP IGSQS IKNPKTIK DLESIGELQCQPI SDSTVINYVKYLI
SNNLIQTINK
```

>uniprot|Q2MFQ3|Q2MFQ3\_STRRY Supuesta péptido sintetasa no ribosómica  
(SEQ ID NO:92)

```
MTDITYVSSRPLSKRPQVPGARTPAPGYPRDSRIPELFEAQAAALPQAPAAARHGDRTLT YGQLDAHADALADRLAAGG
VRPGDLIGVCGSRSLAALVALLGILKAGCAYVPLDEELPPARLRAMAEDAGISA AVTLPGSTRVRGLRVSVEVGS L
GRPAPERASGPAPDRATGSAADCAVVAFTSGTTGRPKPVALSHRGVVRVLVSDPGL
TPPGPGDGVHLHAYSLSDDASTIEIWGALLTGACLVVADREELLSPTALERLLRAGGVT VAYLTTSVFHLVARTRPEA
LAGLRFVSAGGEAMDPRLANAVLAACPRTTVVNFYGTENAVVSTAHLVTLPLPEDAAHVPLGRPF GASTCHVLRADG
SPARPGEEGELYVGGDGLALGYLGDQPQLTAERFVTLPAVEPDGPLYRTGDRAVRHADGLLE YRGRLLDRQVKLRGARI
ELDEVETRLRAHPEVGEAAVEVDGHSLTAYVTATVPGRPLPLADLRLAYCAKWLPPQAVPALI PLDRFPVTSGGKIDR
SRLKPTAPPPGPEDTAEAAARRPDEPEATDGLSGLLSEVWHQVLRVVRPTPRDDFFLLGGDSL LASETVTRTLAVLGLD
AALGSTLIRALLAAPTLESFTA AVRGVRRGGTGGPAGGQEPAVDFAAETGLGFALPPAEGPAPNPHDPEDVLLTGASG
FVGGFLLERLLHATAARVHCPVRATSPA HARQVRVTRIALTRYGLHLDEADWQRVECFPGD LTQPRIGLDHERADALAQ
RLDLIVHNGARVNLFLYPYQQLR PANVDGTREVVRIAARRRVVPHFVSTVAVVAGP GTAGVREVEDLPPAHADGLTM
GYAESKWVAEGVLRQAAAQGLPVAVYRPEYVTDGDRTHGACNTETAICSLFKMIADTG VAPDIKLPMDFVVPVDHLAES
LVHIATHRPADGRVYH LTNPRPAMLSDVLD RMRAAGFTLRTL PYPDAWV GELVVRHVAENPTSATAPFVSLCVD RSRTA
DMSVKEMYLKGTFPVLGRRNAEALAGSGLHCPPVDSALLDRYLEYFFTSGYL TRPAAGPGPESEAERIPEDEP VSG
TEPISGTEPISAAEPISGTEPISAAGPISGTEPIPAEPI SGTAAAARTERSR
```

>gi|215431545|ref|ZP\_03429464.1| Ácido graso-CoA ligasa fadD9  
[Mycobacterium tuberculosis EAS054] (SEQ ID NO:93)

```
MSINDQRLTRRVEDLYASDAQFAAASPNEAITQAI DQPGVALPQLIRVMMEGYADRPALGQRALRFV TDP
DSGRTMVVELLPRFETITYRELWARAGTLATALSAEPAIRPGDRVCVLGFNSVDYTTIDIALIRLGAVSVP
LQTSAPVTGLRPIVTEPTMIATSIDNLGDAVEVLGHPARLVVFDYHGKVDTHREAVEAARARLAGS
VTIDTLAELIERGRALPATPIADSADDALALLTYTSGSTGAPKGAMYRESQVMSFWRKS SGGWFEP SGGYPS
ITLNFMPMSHVGGQRQVLYGTLSNGGTAYFVAKSDDLSTLFEDLALVRPTELCFVPR I WDMVFAEPHSEVDR
RLVDGADRAALEAQVKAE LRENVLGGRFVMALTGSAPISAEMTAWVESLLADVHLVEGYGSTEAGMVLND
GMVRRPVIDYKLVDPVELGYFGTDQPYPRGELLVKTQTMFPGYQRPDVTAEVFDPDGFYRTGDI MAKV
GPDQFVYLD RRNNVLKLSQGEF IAVSKLEAVFGDSPLVRQIFIIYGN SARAYPLAVVVP SGDALSRHGIEN
LKPVI SELSQEVARAAGLQSYEIPRDFI IETTPFTLENGLLTGIRKLARPQLKKFYGERLERLYTELADS
QSNE LREL RQSGPDAPVLP T LCRAAAALLGSTAADV RPD AHFADLGGDSL SALSLANLLHEIFGVDPVVG
VIVSPASDLRALADHIEAARTGVR RPSFASIHGRSATEVHASD LTKFIDAATLAAAPNL PAPS AQVRT
VLLTGATGLGRYLALEWLD RMDLVNCKLICLV RARSDEEAQARLDATFDSGDPYLVRHYREL GAGRLEV
LAGDKGEADLGLDRVTWQRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYSQLFGPNAAGTAE LLRLAL TGKRPYIYTS
TIAVGEQIPPEAFTEDADIRAI SPTRRIDDSYANGYANSKWAGEVLLREAEHQCGLPVTVFRCDMILADT
SYTGQNLNLPDMFTRLMLSLAATGIAPGSFYELDAHG NRQRAHYDGLPVEFVAEICTLGT HSPDRFVTYH
VMNPDYDDGIGLDEFVDWLN SPTS GSGCTIQRIADYGEWLQRFETSLRALPDRQRHASLLPL LHNYREPAK
```

## FIG. 17 Cont.

PICGSIAPTDQFRAAVQEAKIGPKDKIPHLTAAIIAKYISNLRLGLL

>gi|218754327|ref|ZP\_03533123.1| ácido graso-CoA ligasa fadD9  
 [Mycobacterium tuberculosis GM 1503] (SEQ ID NO:94)  
 MVELLPRFETIITYRELWARAGTLATALSAEPAIRPGDRVCVLGFNSVDYTTIDIALIRLGAVSVPLQTS  
 PVTGLRPIVTEPTMIATSIDNLGDAVEVLGAPARLVVFDYHGKVDTHREAVEAARARLAGSVTIDT  
 LAELIERGRALPATPIADSADDALALLIYTSGSTGAPKGAMYRESQVMSFWRKSSGWFEPSPGYPSITLNF  
 MPMSHVGGQVLYGTLNSGGTAYFVAKSDLSTLFEDLALVRPTELCFVPRIDMVF AEFHSEVDRRLVDG  
 ADRAALEAQVKAELRENVLGGRFVMALTSAPISAEMTAWVESLLADVHLVEGYGSTEAGMVLNDGMVRR  
 PAVIDYKLVDPPELGYFGTDQPYPRGELLVKTQTMFPGYYQRPDVTAEVFDPDGFYRTGDIMAKVGPDPQF  
 VYLDRRNNVVKLSQGEFIAVSKLEAVFGDSPLVRQIF IYGN SARAYPLAVVVPSGDALSRHGIENLKPVI  
 SESLQEVARAAGLQSYEIPRDFI IETTPFTLENGLLTGIRKLARPQLKKFYGERLERLYTELADSQSNEL  
 RELRQSGPDAPVLPVPTLCRAAAALLGSTAADVPRDAHFADLGGDSLALSALANLLHEIFGVDVPGVIVSP  
 ASDLRALADHIEAARTGVRPSPFASIHGRSATEVHASDLTLDKFI DAATLAAAPNLPAPSAQVRTVLLTG  
 ATGFLGRYLALAEWLDLDRMDLVNGKLI CLVRARSDEEAQARLDATFDSGDPYLVRHYRELGAGRLEVLGDK  
 GEADLGLDRVTWQRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYSQFLGPNAAAGTAE LLRLALTGKRKPYIYTSTIAVG  
 EQIPPEAFTEADDIRAISPTRRIDDSYANGYANSKWAGEVLLREAEHQCGLPVTVFRCDMILADTSYTGQ  
 LNLPMDFTRMLSLAATGIAPGSFYELDAHGNRQRAHYDGLPVEFVAEAICTLGTHSPDRFVTVYHVMNPY  
 DDIGLDEFVDWLNPSPTSGSGCTIQRIADYGEWLQRFETSLRALPDRQRHASLLPLLNHYREPAKPICGS  
 IAPTDQFRAAVQEAKIGPKDKIPHLTAAIIAKYISNLRLGLL

>gi|215446840|ref|ZP\_03433592.1| ácido graso-CoA ligasa fadD9  
 [Mycobacterium tuberculosis T85] (SEQ ID NO:95)  
 DIALIRLGAVSVPLQTSAPVTGLRPIVTEPTMIATSIDNLGDAVEVLGAPARLVVFDYHGKVDTHR  
 EAVEAARARLAGSVTIDT LAELIERGRALPATPIADSADDALALLIYTSGSTGAPKGAMYRESQVMSFWR  
 KSSGWFEPSPGYPSITLNFMPMSHVGGQVLYGTLNSGGTAYFVAKSDLSTLFEDLALVRPTELCFVPRID  
 MVF AEFHSEVDRRLVDGADRAALEAQVKAELRENVLGGRFVMALTSAPISAEMTAWVESLLADVHLVE  
 GYGSTEAGMVLNDGMVRRPAVIDYKLVDPPELGYFGTDQPYPRGELLVKTQTMFPGYYQRPDVTAEVFDP  
 DGFYRTGDIMAKVGPDPQFVYLDRRNNVVKLSQGEFIAVSKLEAVFGDSPLVRQIF IYGN SARAYPLAVVV  
 PSGDALSRHGIENLKPVI SESLQEVARAAGLQSYEIPRDFI IETTPFTLENGLLTGIRKLARPQLKKFYG  
 ERLERLYTELADSQSNELRELRQSGPDAPVLPVPTLCRAAAALLGSTAADVPRDAHFADLGGDSLALSALAN  
 LLHEIFGVDVPGVIVSPASDLRALADHIEAARTGVRPSPFASIHGRSATEVHASDLTLDKFI DAATLAA  
 APNLPAPSAQVRTVLLTGATGFLGRYLALAEWLDLDRMDLVNGKLI CLVRARSDEEAQARLDATFDSGDPYL  
 VRHYRELGAGRLEVLGDKGEADLGLDRVTWQRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYSQFLGPNAAAGTAE LLRL  
 ALTGKRKPYIYTSTIAVG EQIPPEAFTEADDIRAISPTRRIDDSYANGYANSKWAGEVLLREAEHQCGLP  
 VTVFRCDMILADTSYTGQLNLPMDFTRMLSLAATGIAPGSFYELDAHGNRQRAHYDGLPVEFVAEAICT  
 LGTHSPDRFVTVYHVMNPYDDIGLDEFVDWLNPSPTSGSGCTIQRIADYGEWLQRFETSLRALPDRQRHAS  
 LLPLLNHYREPAKPICGSIAPTDQFRAAVQEAKIGPKDKIPHLTAAIIAKYISNLRLGLL

>gi|219558593|ref|ZP\_03537669.1| ácido graso-CoA ligasa fadD9  
 [Mycobacterium tuberculosis T17] (SEQ ID NO:96)  
 MSINDQRLTRVEDLYASDAQFAAASPNEAITQAIDQPGVALPQLIRVMMEGYADRPALGQRALRFVTD  
 DSGRTMVELLPRFETIITYRELWARAGTLATALSAEPAIRPGDRVCVLGFNSVDYTTIDIALIRLGAVSV  
 LQTSAPVTGLRPIVTEPTMIATSIDNLGDAVEVLGAPARLVVFDYHGKVDTHREAVEAARARLAGS  
 VTIDTLAELIERGRALPATPIADSADDALALLIYTSGSTGAPKGAMYRESQVMSFWRKSSGWFEPSPGYPS  
 ITLNFMPMSHVGGQVLYGTLNSGGTAYFVAKSDLSTLFEDLALVRPTELCFVPRIDMVF AEFHSEVDR  
 RLVDGADRAALEAQVKAELRENVLGGRFVMALTSAPISAEMTAWVESLLADVHLVEGYGSTEAGMVLND  
 GMVRRPAVIDYKLVDPPELGYFGTDQPYPRGELLVKTQTMFPGYYQRPDVTAEVFDPDGFYRTGDIMAKV  
 GPDQFVYLDRRNNVVKLSQGEFIAVSKLEAVFGDSPLVRQIF IYGN SARAYPLAVVVPSGDALSRHGIEN  
 LKPVISESLQEVARAAGLQSYEIPRDFI IETTPFTLENGLLTGIRKLARPQLKKFYGERLERLYTELADS  
 QSNELRELRQSGPDAPVLPVPTLCRAAAALLGSTAADVPRDAHFADLGGDSLALSALANLLHEIFGVDVPG  
 VIVSPASDLRALADHIEAARTGVRPSPFASIHGRSATEVHASDLTLDKFI DAATLAAAPNLPAPSAQVRT  
 VLLTGATGFLGRYLALAEWLDLDRMDLVNGKLI CLVRARSDEEAQARLDATFDSGDPYLVRHYRELGAGRLEV

**FIG. 17 Cont.**

LAGDKGEADLGLDRVTWQRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYSQLEFGPNAAGTAE LLRLAL TGKRKPYIYTS  
 TIAVGEQIPPEAFTEDADIRAI SPTRRIDDSYANGYANSKWAGEVLLREAHQCGLPVTVFRCDMILGRH  
 QLYRSAQPAGHVTRADAEPG

>gi|254819907|ref|ZP\_05224908.1| FadD9 [Mycobacterium intracellulare  
 ATCC 13950] (SEQ ID NO:97)

MSTAIHDEHLDRRIEELIANDPQFAAARPDPAITAATEAPGLRLPQIIRTVLDGYADRPALAQRVVEFVT  
 DAKTGRTTAELLPRFETITYGELGERVSALGRWAGDAVRPGDRVCVLGFNSVDYATIDIALGTIGAVSV  
 PLQTSAAISSLQPIVAETEPSLIASSVNQLPDAVELILAGDHVPGKLVVFDYQPQVDDQREAVEAAAAARL  
 ADSGVAVEALADVLRGKDLPAVEPPASDEDSLALLIYTSGSTGAPKGMYPQSNVGMWRRGSKNWFGE  
 SAASITLNFMPMSHVMGRGILYGTILGNGGTAYFAARSDLSTLLEDLELVRPTEMNFVPRIWETLYGEFQR  
 QVERRLADGDAGPEARETVAAAVLEEQRQYLLGGRFIFAMTGSAPTSPELKAWAESLLQMHLMMDYGGSTE  
 AGMVLFDGEIQRPPIVYDKLVDVPLDGYFSTDRPHPRGELLRLTENMFPGYKRAETTANVFDGYYRT  
 GDVFAEIAPDRLVYVDRRNVLKLAQGEFVTLAKLEAVFGNSPLIRQIYVYGNSSQPYLLAVVVPTEEAL  
 ADNDLES LKPKIADSLQKVAKETGLQSYEVPRDFIETTPFTLENGLLTGIRKLAWPKLKAHYGDRLEQM  
 YAELAAGQANELAELRRSGAAAPVAQIVSRAAAALGATAGDLSADAHFTDLGGDSL SALTFGNLLREIF  
 DVDVPGVIVSPANDLAGIAAYIEAERQGSKRPTFAAVHGRGATMVHASDLTLDKFLDEATLAAAPSLPK  
 PATEVRTVLLTGATGFLGRYLALDWLERMDMVDGKVI ALVRARTDEEARARLDKIFDSGDPKLLAHYQRL  
 AADHLEVIAGDKGEANLGLDPQTWQRLAAEEVDVIVDPAALVNHVLPYSELFGPNALGTAELIRIALTSRQ  
 KPITYVSTICVGDQIQPGEFVENADIRQISATREINDCYANGYGN SKWAGEVLLREAHDLGLPVTVFR  
 DMILADTTYAGQLNLPDMFTRLMLSLVATGIAPGSFYELDADGNRQRAHYDGLPVEFIAAAI STLGTQIT  
 DSDTGFQIYHVMNPDYDDGIGLDEYIDWLIEAGYSIERIADYSEWLRRFETSLRALPDRQRQYSLPLLHN  
 YQKPEKPINGSMAPTDFRAAVQEAKIGPKDIPHSAPVIVKYITDLELLGLL

**ygjB (NP\_418690) (SEQ ID NO:98)**

1 msmiksyaak eaggelevye ydpgelrpd vevqvdyogi chsdlsmidn ewgfsqyplv  
 61 agheivgrvv algsgaaqdkg lcvqgrvgig wtarscghcd acisgnqinc eggavptimn  
 121 rggfaeklra dwqwviplpe nidiesagpl loggitvfkp ilmhitats rvgvigiggl  
 181 ghiaikllha mgcevtafss npakegevla mgadkvvnslr dpqalkalag qfdliintvn  
 241 vsldwqpyfe altyggnfht vgavltplsv pafthliagr svsgsatgtp yelrklmrfa  
 301 arskvaptte lfpmskinda ichvrcgkar yrvvlkadf

**yahK (NP\_414859) (SEQ ID NO:99)**

1 mkikavgays akqplepmndi ttrepcpndv kieiaycgvc hsdlhqvrse wagtvyqcvp  
 61 gheivgrvva vgdqvekyap gdlvgvgciv dsckhceece dgienycdhm tgtynsprpd  
 121 epghtlgyys qqivvheryv lrirhpqeql aavaplicag ittysplrhw qagpgkxvqv  
 181 vgiqglghmg iklahamgah vvafttseak reaakalgad evvnrsnade maahlksfdf  
 241 ilntvaaphn lddfttlkr dgtmtlvgap atphkspevf nlimkraia gsmiggipt  
 301 qemldfcaeh givadiemir adqineayer mlrgdvkyrf vidnrtlt

**adhP (NP\_415995) (SEQ ID NO:100)**

1 mkaavvtkdh hvdvtyktlr slkhgeallk meccgvchtd lhvknqdfgd ktgvilgheg  
 61 igvvaevgpg vtslkpgdra svawfyegcg hceyonsgne tlcrrsvknag ysvdggmaee  
 121 civvadyavk vpdgldsaaa ssitcagvtt ykavklskir pggwlaiyg gglgnlalqy  
 181 aknvfrakvi aidvndeqlk latemgadla inshtedaak ivqektggah aavvtavaka  
 241 afneavdavr aggrvvavgl ppesms\_dip rlvlvgievv gslvgtrqd teafqfaaeg  
 301 kvvpkvalrp ladintifte meegkirgrm vidfrh

**ydjL (NP\_416290) (SEQ ID NO:101)**

1 mkalarfgka fggykmidvp qpmcgpdevv ieikaaaicg admkhynvds gsdefnsirg  
 61 hefagciaqv gekvkdwkvg qrvvsdngsh vcvvcpaqeq gdfloc tekv nlgldnntwg  
 121 gggfskyc\_lvp geilkirha lweipdgvdv edaavldpic nayxsiagqs kflpgqdvvv  
 181 igtgplg\_lfs vqmarimgav nivvvgqed vavrfpvake lgatavvngs tedvvarcqq  
 241 ccgkdnlgvl iecsganial kqaiemlrpn gevrvvgmgf kpldfsindi tawnksiigh  
 301 maydstswrn airllasgai kvkpmithri glsqwregfd amvdktaikv imtycdfde

FIG. 17 Cont.

**vdjJ (NP\_416288) (SEQ ID NO:102)**

1 mknskailqv pgtmkiisae ipvpkedevl ikveyvgicg sdvhgfesgp fippkdpnce  
 61 iglghecagt vvavgsrvrk fkpqdrvnle pgvpcghcry clegkynicp dvdfmatqpn  
 121 yrgalthylc hpesftyklp drmdtmegal vepaavgmha amladvkpgk kiiilgagci  
 181 glmtlqackc lgateiavvd vlekrlamae qlgatvving akedtiarcq qftedmgadi  
 241 vfetagsavt vkqapylvmr gkkimivgtv pgdsainflk inrevtiqtv fryanrypvt  
 301 ieaisgrfd vksmvthiyd yrdrvqafee svnkrdiik gvikiid

**idnD (NP\_418688) (SEQ ID NO:103)**

1 mqvktqscvv agkktvavte qtidwnnngt lvqitrggic gsdlhyyqeg kvgnfmikap  
 61 mvlghevigk vihsdsselh egqtvainps kpcghckyci ehnenqctdm rffgsamyfp  
 121 yrdggftryk mvetsqcvpy pakadekvma faeplavaih aahqagelqg krvfisgvpp  
 181 igclivsavk tlgaeeivca dvsprslslg kengadvlvn pqnddmhkw aekgyfdvsf  
 241 evsghpssvn tclevtrarg vmvqvgmga maefpmtli gkeislrqsf rftsefntav  
 301 swlangvinp lpllsaeypf tdleaalrfa gdktdcaakqv lvf

**tdh (NP\_418073) (SEQ ID NO:104)**

1 mkalsklkiae egimtdvpv pelghndlli kirktaicgt dvhiynwdew sqktipvpmv  
 61 vgheyvgevv gigqevkqfk igdrvsqegh itcgherncr ggrthlcrnt igvgvnrpgc  
 121 faeyivipaf nafkipdnis ddlaaifdpf gnavhtalsf dlvgedvlvs gaggpigimaa  
 181 avakhvgarr vvitdvneyr lelarkmgit ravnvaken ndvmaelgmt egfdvqlms  
 241 gappaftrml dtmnhggria mlgippsdms idwtkvifkg lfikgiygre mfetwykmaa  
 301 liqsgldlsp iithrfsidd fqkgfcaams gsgskvilsw d

**yjjN (NP\_418778) (SEQ ID NO:105)**

1 mstmnvlicq qpkelvwkqr eipipgdnea likiksvgic gtdihawggn qpffsyprvl  
 61 gheicgeivg lgkniadlkn gqqvavipyv acqqcpacks grtnceekis vigvnhqggf  
 121 seylsvpvar ilpadgidpq aaaliepfai sahavrraai apgeqvlvvg agpiglgaaa  
 181 iakadgaqvv vadtsparre hvatrlelpl ldpsaedfda qlraqfggsl aqkvidatgn  
 241 qhamantvnl irhggttvvfv glfkgeiqfs dpefhkkett mngsrnatpe dfakvgrlma  
 301 egkitadmml thrypfatla etyerdvinn reliqvitf

**rspB (NP\_416097) (SEQ ID NO:106)**

1 mksiliekn qiaivereip tpsagevrk vklagicgsd shiyrghnfp akyprvighe  
 61 ffcvidavge gvesarvger vavdpvvsog hcypcsigkp nvcttlavlg vhadggfsey  
 121 avvpaknawk ipeavadqya vmiepfata nvtghgqpte ndtvlyvgag pigltivqvl  
 181 kgvynvknvi vadriiderle kakesgadwa innsqtplge iftekqikpt liidaachps  
 241 ilkeavtlas paarivlmgf ssepseviqq gitgkelsif ssrlnankfp ividwlskgl  
 301 ikpeklitht fdfqhvdai slfeqqdkhc ckvlltfse

**gatD (NP\_416594) (SEQ ID NO:107)**

1 mksvndtdg ivrvaesvip eikhqdevrv xiassglcgs dlprifknga hyypitlghe  
 61 fsgyidavgs qvddlhpgda vacvpllpcf tceclkgfy sqcakdyfig srrdggfaey  
 121 ivvkrknvfa lptampiedg afiepitvgl hafhlaqgce nknviiigag tigllaiqca  
 181 valgaksvta idissekla aksfgamqtf nsensapqm qsvlrelrfr qliletagvp  
 241 qtvelaveia gphaqlalvg tlhqdlhlts atfgkilrke ltvigswmny sspwpggewe  
 301 tasrllterk islepliahr gsfesfaqav rdiarnampg kvllip

**yphC (NP\_417040) (SEQ ID NO:108)**

1 mktmlaaylp gnstvdllrev avptpginqv likmkssgic gsdvhyiyhq hrataaapdk  
 61 plyqgfingh epcgqivamg qcorhfkegd rvlvyhisgc gfcpcnrcrf pisctgegka  
 121 aygwqrddgh aeyllaeekd lillpdalsy edgafiscgv gtayegilrg evsgsdnvlv  
 181 vglqpvgnma mmlakgrgak riigvdmlepe rlamakqlgv mchgyllatte glpqiaaelt  
 241 hggadvaldc sgnaagrlla lqstadwgrv vyigetgkve fevsadlmh qrriiigswt  
 301 slfhmekcan dltdwklwpr naithrfsle qagdayalma sgkcgkvvin fpd

**yhdH (NP\_417719) (SEQ ID NO:109)**

1 mcalilleqqd gktlasvqtl desrlpegdv tvdvhwssln ykdalaitgk gkiirnfpmi  
 61 pgidfagtvr tsedprfhag qevlltgwgv genhwgglae qarvkgdwlv ampqglidark  
 121 amiigttagft amlcvmale agvrpqdgei vvtgasggvg stavallhkl gyqvavscq  
 181 estheyklsl gasrvlprde faesrplekq vwagaidtvq dkvlakvlaq mnyggcvaac  
 241 glaggftlpt tvmpfilrnv rlqgvdsvmt pperraqawq rlvadlpsf ytqaakeisl

FIG. 17 Cont.

301 seapnfaeai innqiqgrtl vkvn  
**ycjQ (NP\_415829) (SEQ ID NO:110)**  
 1 mkklvatapr vaalveyedr ailanevkir vrfgapkht evvdfraasp fidedfngew  
 61 qmftprpada prgliefgkfq lgnmvvgdii ecgsdvtद्या vgdsvcgypg lsetviinav  
 121 nnyklrkmpq gsswknavcy dpaqfamsqv rdanrvrgdf vvvvlggaig qiaiqlakra  
 181 gasvviqvdp iahrcdiarr hgadfclnpi gtdvgkeikt ltgkqgadvi ietsgyadal  
 241 qsairglayg gtisyvafak pfaegfnlgr eahfnaakiv ffracsepnp dypwrwkri  
 301 eetcwellmn gylncedlid pvvtfanspe symqyvdqhp eqsikmgvtf

**yncB (NP\_415966) (SEQ ID NO:111)**  
 1 mgqqkqrnr wvlasrphga pvpenfrlee ddvatpgegq vlrrtvylsl dpymrgrmsd  
 61 epsysppvdi ggvmvvgtvsv rvvesnhpdy csqgdwvlqys gwqdydissg ddlvklgdhp  
 121 qnpswslgvl gmpgftaymg lldigqpkqg etlvvaaatg pvvatvgqig klkgcrvvgv  
 181 aggaekcrha tevlgfddvcl dhaddfaeq lakacpkgid iyyenvggkv fdavplllnt  
 241 saripvcglv ssynatelpp gpdrllplma tvlkkrrlrg gfiaaqdygh rihefqrqemg  
 301 gwvkedkihy reeitdglen apqtfigllk gknfgkvvir vagdd

**gor (NP\_418475) (SEQ ID NO:112)**  
 1 matriefhkh ggpevlqave ftpadpaene iqvenkaigi nfidtyirsg lypppslpsg  
 61 lgteaagivsv kvsgvkhik agdrvvyags algayssvhn iiadkaailp aaisfeqaaa  
 121 sflkgltvvy llrkyeikp deqflfhaaa ggvgliacqw skalgaklig tvgtaqkags  
 181 alkagawqvi nyreedlver lkeitgkkv rvvydsvgrd twersldclq rrglmvsfgn  
 241 ssgavtgvnl gilngkgsly vtrpslqgyi ttreeteas nelfsliasg vikvdvaeqq  
 301 kypkdaqra heilesratq gsallip

**frmA (NP\_414890) (SEQ ID NO:113)**  
 1 mksraavafa pgkpleivei dvappkkgev likvthtgv htdaftlsgd dpegvfpvvl  
 61 ghegagvve vgegvtsvkp gdhviplya ecgecefcrs gktnlcavv etqgkglmpd  
 121 gtrrfsyngq plyhymgst fseytvvaev slakinpean hehvcllqcg vttgigavhn  
 181 takvppgdsv avfglgaigl avvggarqak agriaaidtn pkkfdlarrf gatdcinpd  
 241 ydkpikdvll dinkwgidht fecignvnm realesahrg wqgsviigva vaggeistrp  
 301 fqlvtgrvkw gsafggvkgr sqlpqmvda mkqdidlep vthtmsldei ndafdlmheg  
 361 ksirtvirv

**ybdR (NP\_415141) (SEQ ID NO:114)**  
 1 mkaltyhgh hvqvenvpdp gvegaddiil ritataicgs dlhlyrgkip qvkhgdifgh  
 61 efmgevvetg kdvknlqkgd rvvipfviac gdcffclrg yaacentnag kgaalnkkqi  
 121 papaalfgys hlyggvpgqg aeyvrpvkgn vgpfkvppli sddkalfld ilptawqaak  
 181 naqiqqgssv avygaqpvgl ltiacarllg aeqifvvdhh pyrhlfaadr ygaiainfde  
 241 dsdpaqsiie qtagherguda vidavgfek gsttetvltl lklegssgka lrqciaavrr  
 301 ggivavpgvy agfihgflfg dafdkglsfk mgqthvhaul gellpliek lkppeivth  
 361 ympfeeaarg yeifekreee crkvilvpge qsaaeaqkev sqlvnampgg ti

**YqgP (YP\_026187) (SEQ ID NO:115)**  
 1 mktkvaaiyg krdvrlrvfe lpeitdnell vsvisdsvcl stwkaallgs ehkrvpddle  
 61 nhpvitghec agvivevgkn ltgkykkqqr fvlqpmglp sqyseqysye yfggnatymi  
 121 ipeiainlge vlpghgsyfa aeslaepmcc iigayhanyh ttqyvyehrm gvkpggnial  
 181 lacagpmsgi aidyainggi qpsrvvvvdi ddkrlaqvqk llpvelaask gielvyvntk  
 241 gmsdpvqmlr altgdagfdd ifvyaavpav vemadellae dgclnffagp tdknkvvpfn  
 301 fynvhnsth vvgtsqgst dmkeaialsa tqqlqpsfmv thiggldavp etvlnlpdip  
 361 ggkkliyngv tmpltaiadf aekgktdplf kelarlveet hgiwneqaek yllaqfgvdi  
 421 geaaq

**YiaY (YP\_026233) (SEQ ID NO:116)**  
**Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:130)**  
 1 maastffips vnvigadslt damnmadyg ftrtlivtdn mltklqmagd vqkaleerni  
 61 fsviydgtp npttenvaag lkllkenncd svlislgggsp hdcakgialv aanggdirdy  
 121 egvdrsakpq lpmiainta gtasemtrfc iitdearhik maivdkhvtpl llsvndsslm  
 181 igmpksltaa tgmalthai eayvsiaatp itdacalkav tmiaenlpla vedgsnaker  
 241 eamayaqfla gmafnnaasl yvhamahqlg gfynlphgvc navllphvqv fnskvaarl  
 301 rdcaaamgvn vtgkndaega eacinairrel akkvdipagl rdlnvkeedf avlatnalkd  
 361 acgftnpiqa theeivaiyr aam

**FucO (NP\_417279) (SEQ ID NO:117)**  
 1 mnanrmilne tawfgrgav altdevkrrg yqkalivtdk tlvgcgvvak vtdkmdaagl

FIG. 17 Cont.

61	awaiydgvpv	nptitvkeg	lgvfqnsfad	yliaigggsp	qdtckaigii	snnpefadvr
121	sleglsptnk	psvpilaip	tagtaaevti	nyvitdeekr	rkfvcvdpd	ipqvafidad
181	mmdgmpalk	aatgvcalth	aiegyitrga	waltcalhik	aieliagair	gsvagdkdag
241	eemalgqyva	gmqfsrvglg	lvhgmahplg	afyntphgva	naillphvmr	ynadftgeky
301	rdiarvmgvk	vegmsleear	naaveavfal	nrdvqipphl	rdvgvrkedi	palaqaaldd
361	vctggnprea	tledivelyh	taw			
<b><u>EutG (NP_416948) (SEQ ID NO:118)</u></b>						
1	mqnelqtalf	qafdtlnlcr	vktfsvppvt	lcpqgsvssc	gqqqatrglk	hlfvmadsfl
61	hqagmtaglt	rsltvkgiam	tlwpcpvgep	citdvcaava	qlresgdcgv	iafgggsvld
121	aakavtllvt	npdstlaems	etsvlqprlp	liaipttagt	gsettnvtvi	idavsgrrkv
181	lahaslmadv	aildaalteg	vpshvtamtg	idalthaiea	ysalnatpft	dslaigaiam
241	igkslpkavq	yghdlaares	mllascmagm	afssaglglc	hamahqpgaa	lhiphglana
301	mllptvmefn	rmvcrerfsq	igralrtkks	ddrainavs	eliaevgigk	rlgdvqatsa
361	hygawaqaal	ediclrnspr	tasleqivgl	yaaac		
<b><u>YqhD (NP_417484) (SEQ ID NO:119)</u></b>						
1	mnnfnlhtpt	riflgkgaia	glregiphda	rvlitygggs	vkktgvldqv	ldalkgmdvl
61	efggiepnpa	yetlmnavkl	vreqkvtfll	avgggsvldg	tkfiaaaany	penidpwhil
121	qtggkeiksa	ipmgcvitlp	atgsesnaga	visrkttgdk	qafhsahvqp	vfavldpvyt
181	ytllpprqvar	gvvdafvhtv	ecyvtkpvda	kiqdrfaegi	lltlliedgpk	alkepenydv
241	ranvmwaatq	alngligagv	pqdwathmig	he_tamhgl	haqtlaiivlp	alwnekrdtk
301	rakllqyaer	vwnitegsdd	eridaaiaat	rnffeqlgvp	thlsdygidg	ssipallkkl
361	eehgmtqlge	nhditldvsv	riyeaar			
<b><u>AdhE (NP_415757) (SEQ ID NO:120)</u></b>						
1	mavtnvaeln	alvervkaaq	reyasftqeq	vdkifraaal	aaadaripla	knavaesqmg
61	ivedkviknh	faseyiynay	kdektcgvls	eddtfgtiti	aepiglicgi	vpttnpsta
121	ifkksliskt	rnalifshp	rakdatnkaa	divlqaaiaa	gapkdligwi	dqpsvelsna
181	lmhhpdinli	latggpgmvk	aayssgkpai	vggagntpvv	idetadikra	vasvlmsktf
241	dncvicaseq	svvvvdsvyd	avrerfathg	gyllggkelk	avqdvilkng	alnaaivgqp
301	aykiaelagf	svpentkili	gevtvvdese	pfaheklspt	lamyrakdfe	davekaeklv
361	amggightsc	lytdqdnqpa	rvsyfggkkm	tarilintpa	sgggigdlyn	fklapsltlg
421	cgswwggnsis	envgpkhlin	kktvakraen	mlwklkpsi	yfrgslpia	ldevitdghk
481	raliivtdrfl	fnngyadqit	svlkaagvet	evffeveacp	tlsivrkgae	lansfkpdvi
541	ialgggppmd	aakimwvmye	hpethfeela	lrfmdirxri	ykfokmgvka	kmiavttsg
601	tgsevtpfav	vtddatgqky	pladyaltpd	maivdanlvm	dmpxslcafz	gldavthame
661	ayvsvlasef	sdgqalqalk	llkeylpasy	hegsknpvar	ervhsaattia	giafanaflg
721	rlgshmahklg	sqfhiphgl	nallicnvir	ynandnptkq	tafsgydrpq	arrryaead
781	hlglsapgdr	taakieklla	wletlkaelg	ipksireagv	qeadflanvd	klsecadddd
841	ctganprypl	iselkqilld	tyygrdyveg	etaakkeaap	akaekkakks	a
<b><u>dkgB (NP_414743) (SEQ ID NO:121)</u></b>						
1	maipafglgt	frlkddvvis	svitalelgy	raidtaqiye	neaaavgqaa	esgvprhely
61	ittkiwienl	skdklipslk	eslqklrtdy	vdllihwps	pndevsveef	mqalleakkq
121	gltreigisn	ftiplmekai	aavgaeniat	nqielspylg	nrkvvawakq	hgihitsymt
181	laygkalkde	viariaakhn	atpaqvilar	amgegysvip	sstkrknles	nlkaqnlqld
241	aedkkaiaal	dcndrlvspe	glapewd			
<b><u>YdjG (NP_416285) (SEQ ID NO:122)</u></b>						
1	mxxiplgttd	itlstrmglt	waigggpaw	gdldrqicid	tileahrcgi	nldtapgyn
61	fgnsevivgq	alkklpreqv	vvetkcgivw	erkgslnkv	gdrqlyknls	pesireevaa
121	slqrlgidyi	diymthwqsv	ppfftptiaet	vavlnelkse	gkairaigaan	vdadhireyl
181	qygeldiiga	kysildrame	nellplcrdn	givvqvyspl	eqglltgit	rdivpvggaa
241	nxvwfqrnm	lkvidmlegw	qplcaryqct	iptlalawil	xqsdlisils	gatapeqvre
301	nvaalnins	dadatlmrem	aealer			
<b><u>YeaE (NP_416295) (SEQ ID NO:123)</u></b>						
1	mqqkmiqfsg	dvslpavggq	twymgedasq	rktevaalra	gielgltlid	taemyadgga
61	ekvvealtg	lrekvflvsk	vypwnaggqk	ainaceaslr	rntdyldly	llhwsqsfaf
121	eetvaamekl	iaqgkixrwg	vsnladyadm	elwqlpggnq	catnqvlyhl	gsrgleydll
181	pwocqqqmpv	maysplaqag	rlrngllkna	vnneiahahn	isaaqvllaw	vishqgvmai
241	pkaatiahvq	qnaavlevel	ssaelam_lck	aypapqkcta	ldmv	
<b><u>dkgA (NP_417485) (SEQ ID NO:124)</u></b>						
1	manptviklq	dgnvmpqlgl	gvwqasneev	itaiqkalev	gyrsidtaaa	ykneegvgka
61	lknasvntree	lfittklwnd	dhkrpreall	dsllklqldy	idlylmhwpv	paidhyveaw

## FIG. 17 Cont.

121 kgmielqkxeg liksigvcnf qihhlqrlid etgvtpvinq ielhplmqqr qlhawnathk  
 181 iqteswspla qggkgvfdqk virldladkyg ktpaqivirw hldsglvvip ksvtpsriae  
 241 nfdvwdfrld kdelgeiakl dqgkrlgpdp dqfgg  
**YajO (NP\_414953) (SEQ ID NO:125)**  
 1 mqynplgktd lrvsrlclgc mtfgepdrgn hawtlpeess rpiikralcg ginffdtans  
 61 ysdgsseeiv gralrdrfarr edvvvatkvf hrvgdlpegl sraqilrsid dsirrlgmdu  
 121 vdilqihrwd yntpieetle alndvukagk aryigassmh asqfaqalel qkqhgwaqfv  
 181 smqdhynliy reeeremipl cyqegvavip wsplargrlt rpwgettarl vsdevgnly  
 241 kesdendaqi aerltgvsee lqatraqval awllskpgia apiigtsree qldeilnavd  
 301 itlkpeqiae letpykphpv vgfk  
**YghZ (NP\_417474) (SEQ ID NO:126)**  
 1 mvwlanpery gqmgyrycgk sglrlpalsl glwhnfgvhn alesqrailr kafdlgithf  
 61 dlannygppp gsaaenfgrl lredfaayrd eliistkagy dmwpgpygsg gsrkylasl  
 121 dqslkmgle yvdifyshrv dentpmeeta salahavqsg kalyvgissy spertqkmve  
 181 llrewkipll ihcpsynlln rrvdksglld tlqnrvgvci aftplaqgl tgkylngipq  
 241 dsrmhregnk vrgltpkmlt eanlnslrll nemaqqrqgs maqmalswil kddrvtsvli  
 301 gasraeqlee nvcalnntf stkelaqicg hiadqelnlv cassdk  
**Tas (NP\_417311) (SEQ ID NO:127)**  
 1 mqyhriphss levstlglqt mtfgeqnsea dahaqldyav aqginlidva emypvprrpe  
 61 tggitetyvg nwlakhsre kliaaskvsg psrnrndkgir pdqaldrkni realhdsldr  
 121 lqtdyldlyq vhwppzprtrc fgklgyswtd sapavslldt ldalaeyqra gkiryigvsn  
 181 etafgvmyrl hlakhdipr ivtignpysl lnrsfevqla evsqyegvel layscigfgt  
 241 ltgkylingak pagarntlfs rftrysgect qkavaayvdi arrhgldpaq malafvrrqp  
 301 fvastllgat tmdqlktnie slhlelsedv laeieavhqv ytypap  
**YdhF (YP\_025305) (SEQ ID NO:128)**  
 1 mssntftlgt ksvnrlygya mqlagpgvfg pprdrhvait vlrealalgv nhidtsdfyg  
 61 phvtngiire alypysddlt ivtkigarrg edaswlpafs paelqkavhd nlrnlqldvl  
 121 dvvnlrvmmg dqhgpaegsi easltvlaem gqgglvkhiq lsnvtpqva earkiaeivc  
 181 vqneyniahr addamidala ndgiayvpff plggftplqs stlsdvaasl gatpmqvala  
 241 wllqrsnil lipgtssvah lrenmaaecl hlseevlstl dgisre  
**ybbO (NP\_415026) (SEQ ID NO:129)**  
 1 mthkateilt gkvmqksvli tgcsscigle salakkrqgf hvlagcrkpd dvermnsmgf  
 61 tgvldldisp esvdraadev ialtdnclyg ifnngfgyg gplstisraq meqqfsanff  
 121 gahqltmrll pamlphgegr ivmtssvngl istpgrgaya askyaleaws dalrmelrhs  
 181 gikvsliepg pirtrftdnv nqtqscpkpve npgiaarftl gpeavvdvkr hafisekpm  
 241 rypvtlvtwa vmvkrllpg rvmdkilqg  
**yohF (NP\_416641) (SEQ ID NO:130)**  
 1 maqvaiitas dsigigkecal llaqqgfdig itwhsdeega kdtarevvsh gvraeivqld  
 61 lgnlpegala leklicrlgr idvlvnnaga mtkapflama fdewzkiftv dvdgaflocsq  
 121 iaarqmkkqg qggriinits vhehtplpda saytaakhal ggltkamale lvrhkilvna  
 181 vapgaiatpm ngmddsdkvp daepsiplrr fgatheiasl vvwlcsegan yttgqslivd  
 241 ggfmlanpqf npe  
**YciK (NP\_415787) (SEQ ID NO:131)**  
 1 mhyqpkqdl1 ndrliilvtga sdgigreaam tyarygatvi llgrneeklr qvashineet  
 61 grqpqwfild llttsencq qlaqriavny prldgvlhna gllgdvcpmc cnpqvwqdv  
 121 mqvvnatfm ltqallplll ksdagslvft ssvgrqgra nwgayaaskf ategmmqvla  
 181 deyqqrllrvn cinpggtrta mrasafpted pqklktpadi mplylwlmgd dsrrxtgmtf  
 241 daqpgzrkpgi sq  
**YqfF (NP\_417378) (SEQ ID NO:132)**  
 1 maialvtggs rgigratall laqegyvtav nyqqnlhaaq evmnlitqag gkafvlqadi  
 61 sdenqvamf taidqhdepl aalvnnagil ftqctvenlt aerinrvlst nvtgyfloccr  
 121 eavkrmalkn gsgggaivnv ssvasrlgsp geyvdaask gaidtlttgl slevaaggir  
 181 vncvrpgfiy temhasggcp grvdrvxni pmqrggqae vaqaivwlls dkasyvtgfsf  
 241 idlaggk  
**YghA (NP\_417476) (SEQ ID NO:133)**  
 1 mgaftgktvl ilggsggiga aivrrfvtdg anvrftyags kdaakrlaqe tgatavfids  
 61 adrdavidv rksgaldilv vnagigvfgc alelnaddid rlfkinihap yhasveaarq  
 121 mpeggrilii gsvngdrmpv agmaayaask salqgmargl ardfgprgit invvqppid  
 181 tdanpangpm rdmlhslmai krhgqpeeva gmvawlagpe asfvtagmht idgafga  
**YdfG (NP\_416057) (SEQ ID NO:134)**

FIG. 17 Cont.

1 mivlvtgata gfgecitrff icqghkviat grrqerlqel kdelgdnyli aqldvrnraa  
 61 ieemlaslpa ewncidilvn naglalmgmp ahkasvedwe tmidtnnkgl vymtravlpq  
 121 mvernhghii nigstagswp yaggnyvgat kafvrqfsln lrtldlhtav rvtddiepglv  
 181 ggtefsnvrf kgddgkaekt yqntvaltpe dvseavwvvs tlpahvnint lemmpvtqsy  
 241 aglnvhrq

**YgcW (NP\_417254) (SEQ ID NO:135)**  
 1 msieslnafs mdffslkgkt aivtggnsqg qgafamalak aganifipsf vkdnggetkem  
 61 iekqgvvevdf mqvgitaega pqkiiiaacce rfgtvdilvn nagicklnkv ldfgradwdp  
 121 midvnltAAF elsyeaakim ipqksqkiin icslfsylgg qwspaysatk halagftkay  
 181 cdelgqyniq vnglapgyya tditlatrsr petnqrvlth ipanrwgdtq dimgaavfla  
 241 spasnynvng llvvdggylv r

**UcpA (NP\_416921) (SEQ ID NO:136)**  
 1 mgkltgktal itgalcggige giartfarhg anlilldisp eiekladelc grghrctavv  
 61 advrdpasva aaikrakeke gridilvnaa gvcrlgfild msdddrdfhi dinikgvwnv  
 121 tkavlpemia rkdgrivmrs svtgdmvadp getayaltka aivgltksla veyaqsgirv  
 181 naicpgyvrt pmaesiargq npedpesvlt emakaipmrr ladplevgei aafldasess  
 241 yltgtqnvld ggstlpetvs vgi

**EntA (NP\_415128) (SEQ ID NO:137)**  
 1 mdfsgknvww tgagkgigya talafveaga kvtgfdqaft qeqypfatev mdvadaaqva  
 61 qvcqrllaet erldalvnaa gilrmgatdq lskedwqqtF avnvvgafnl fqqtmqfrr  
 121 qrggaivtva sdaahtrprip msaygaskaa lkslalsvql elagsgvrcn vvspgsdtd  
 181 mqrtlwvsdd aeeqrirgfg eqfklgiplg kiarpqeian tilflasdla shitlqdivv  
 241 dggstlga

**Fo1M (NP\_416123) (SEQ ID NO:138)**  
 1 mgktgqlpil itgggrrigl alawhfingq qpviVsyRth ypaidglina gacqicadfs  
 61 tndgvmafad evlKstHglr ailhnasawm aekpgaplac vIacmmqihv ntpyllnhal  
 121 erllrghgha asdiihftdy vvergsdkhi ayaaskaald nmtrsfarkl apevkvnslia  
 181 pslilfnehd daeyrqgaln kslmktapge xevidivdyl ltscfvtrgrs fpldggzhlr

**HdhA (NP\_416136) (SEQ ID NO:139)**  
 1 mfnsdnlrld gkcaaitgag agigkeiait fatagasvuv sdinadaanh vvdeiqlgg  
 61 qafacredit seqelsalad faisklgkvd ilvnnagggg pkpfdmpmed frrayelnvf  
 121 sffhlsqqlva pemekngggv iltitsmaae nkninmtsy sskaaashlv rnmafdIgek  
 181 nirvngiapg ailtDalksv itpeieqkml ghtpirrlgg pqdianaalf lcsPaaswvs  
 241 gqiltvsggg vqeln

**HcaB (NP\_417036) (SEQ ID NO:140)**  
 1 msdlhnesif itgggsglgl alverfieeg aqvatilela akvaslrqrf gehilavegn  
 61 vtocyadyqra vdqiltrsgk ldcfignagi wdhnaslvtnt paeletgfh elfvvnvlgy  
 121 llgakacapa liasegsmif tIsnaawypg gggplytask haa-glirql ayelapkvrv  
 181 ngvpgcgmAs dlrgpqaIgg setsimqslt pekiaailpl qffpqpadft gpyvmltsrr  
 241 nnralsqvmi nadaglaIrg irhvaagldl

**Sz1D (NP\_417185) (SEQ ID NO:141)**  
 1 mnqvavvigg gqtlgafich glaaegyryva vvdIqsdkaa nvaqeinaey gesmaygfga  
 61 datseqsvla lsrqvdeifg rvdllvysag iakaafisdf qlgdfdrslq vnlvgylca  
 121 refsrlmird giqgriiqin sksgkvsgkh nsygysaakfg gvgltslsl dIaeygitvh  
 181 slrlgnllks pmfqsllpqy atklgikpdq veqyyidkvp lkrgcdyqdv lnmllyasp  
 241 kasycteqsi nvtggqvmf

**KduD (NP\_417319) (SEQ ID NO:142)**  
 1 milsafsleg kvavvtgcdt gIqggmalgl aqagcdivgi niveptetie qvtalgrfl  
 61 sltadlrkid gipalldrav aefghidilv nnagIirred alefsekdw dvmnlniksv  
 121 ffnsqaaakh fiaqnggki iniasmlsfq ggirvpsyta sksgvmgvtr lmanewakhn  
 181 invnaiapgy matntqqlr adeqrsaeil dripagrwl pedlmgpivf lassasyvvn  
 241 gytiavdggw lar

**IdnO (NP\_418687) (SEQ ID NO:143)**  
 1 mndlflslagk nilitgsaqq igfllatglg kycaqiiinc itaeraelav eklhgqigca  
 61 vaapfnvthk heidaavehi ekdigpidvl vnrಾಗಿqrrh pftfepqew ndviavnqta  
 121 vflvsqavtr hmverkagkv inicsmqsel grdtitpyaa skgavkmltr gmcvelarhn  
 181 iqvnqiapgy fktemtkalv edeaftawlc krtpaarwgc pqeligaavf lsskasdfvn  
 241 ghllfvdggm lvav

**FabG (NP\_415611) (SEQ ID NO:144)**  
 1 mnfeqkialv tgasrgigra iaetlaarga kvigtatsen gaqaisdylg angkglmlnv

FIG. 17 Cont.

61 tdpasiesvl ekiraefgev dilvnnagit rdnllrmkd eewndietn lssvfrlka  
 121 vmrammkrh griitigsvv gtmngggqan yaaakaglig fkslareva srgitvnvva  
 181 pgfietdmtr alsddqragi laqvpagrlg qaqeianava flasdeaaayi tgetlhvngg  
 241 mymv

**FabI (NP\_415804) (SEQ ID NO:145)**

1 mgflsgkril vtqvaskisi aygiaqamhr eqaelaftyq ndklkgrvee faaqlgsdiv  
 61 lqcdvaedas idtmfaelgk vwpkfdgfvh sigfapgdql dgdyvnavtr egfkiahdis  
 121 sysfvamaka cxsmlnpgsa lltlsylgae raipnynvmg lakasleanv rymanamgpe  
 181 gvrvnaisag pirtlaasgi kdfkmlahc eavtpirrtv tiedvqnsaa flcsdlsagi  
 241 sgevvhvdgg fsiaamnele lk

**Ydja (NP\_416279) (SEQ ID NO:146)**

1 mdalellinr rsasrlaepa ptgeqlqnil ragmrapdhk smqpwhffvi egegrerfisa  
 61 vleggaiiaag sddkaidkar napfraplii tvvakceenh kvprweqems agcavmamgm  
 121 aavaqqffgi wrsgaltesp vvreafgcre qdkivgflyl gtpqlkasts invpdptpfv  
 181 tyf)

**Enzima Ala de *Acinetobacter* sp. ADP1 (CAG70248.1) (SEQ ID NO:147)**

1 mttnvihaya amqagealvp ysfdagelqp hqvevkveyc glehsdsvl nnewhssvyp  
 61 vvaqhevigt itqlgseakg lkigqrvig wtaescqacd qcisgqqvlc tgentatiig  
 121 haggfadkvr agqwvviplp deldptsagp lldggitvfd pilkhqigai hhvavigigg  
 181 lghmaiklk awqceitafs snpntdelk amgadhvvn rdadaeiksqq gkfdlllstv  
 241 nvplnwnayl ntlepnqtfh flgvvmepip vpvqallgga ksiltasptgs paalrkllf  
 301 aarkniapqi emypmselne aierlshgqa ryrivlkadf

***Synechococcus elongatus* PCC7942 Synpcc7942\_1594 (YP\_400611) aminoácidos (SEQ ID NO:148)**

1 mfglighlts leqardvsrr mgydeyadqg lefwssappq ivdeitvtsa tgkvihgryi  
 61 escflpempla arrfktatr vlnamshaqk hgidisalgg ftsiifenfd laslrqvrtd  
 121 tleferfttg nthtayvicr qveaaaktlg iditqatvav vqatgdigsa vcrwldklg  
 181 vgdlliltarn qerldnlqae lgrgkilple aalpeadviv wvasmpqgvv idpatlkqpc  
 241 vlidggypkn lgskvqgegi yvlnnggvveh cfdidwqims aaemarperq mfacfaeaml  
 301 lefegwhtnf swgrnqitie kmeaigeasv rhgfqplala i

***Synechocystis* sp. PCC6803 sl10209 (NP\_442146) aminoácidos (SEQ ID NO:149)**

1 mfglighlts lehaqavaed lgypeyanqg ldfwcsappq vvdnfvqkxv tgqviegkyv  
 61 escflpemt rrikaairk ilnamalaqk vgllditalgg fssivfeefn lkqnnqvrnv  
 121 eldfqrfttg nthtayvicr qvesgakqlg idlsqatvav cgatgdigsa vcrwldskhq  
 181 vkelliarn rqrlnlqee lgrgkimdle talpqadiiv wvasmpkqve iagemlkkpc  
 241 livdggypkn ldtrvkadgv hilkggives slditweimk ivemdipsrq mfacfaeail  
 301 lefegwrtmf swgrnqisvn kmeaigeasv khgfcplval

***Cyanothece* sp. ATCC51142 cce\_1430 (YP\_001802846) aminoácidos (SEQ ID NO:150)**

1 mfglighlts lehahsvada fgygpyatqg ldlwcsappq fvehfhvtsi tgqtiegkyi  
 61 esafpempli krikaairk ilnamafaqk nlnitalgg fssiiifeefn lkenrqvrnv  
 121 slefdrfttg nthtayiicr qvegasaklg idlsqatvai cgatgdigsa vcrwldrkt  
 181 tqelfliarn kerlqrlqde lgrgkimgle ealpeadiiv wvasmpkqve inaetlkkpc  
 241 liidggypkn ldtkikhpdv hilkggives sldidwkime tvnmdvpsrq mfacfaeail  
 301 lefegwhtnf swgrnqitvt kmeqigeasv khglqpllw

***Prochlorococcus marinus* subsp. pastoriscep. CCMP1986 PMM0533 (NP\_892651) aminoácidos (SEQ ID NO:151)**

1 mfglighsts fedakrkasl lgfdhiadgd ldvwctappq lvenvevksa igisiegsyi  
 61 dscfvpemls rftarrkvl namelaqkkg initalggft siifenfnll qhkqirntsl  
 121 ewerfttgnt htawvicrql emnapkigid lksatvavvg atgdigsavc rwlinktgig

**FIG. 17 Cont.**

181 elllvarqke pldslqkeld ggtiknldea lpeadivvwv asmpktmeid annlkqpcml  
 241 idggypknld ekfqgnnihv vkggivrffn digwnmmela emqnpqremf acfaeamile  
 301 fekchtnfsw grnnislekm efigaasvkh gfsaigldkh pkvlav

*Gloeobacter violaceus* PCC7421 NP\_96091 (gll3145) aminoácidos(SEQ ID NO:152)

1 mfglighltn lshaqrvard lgydeyashd lefwcmappq avdeititsv tgqvihgqyv  
 61 escflpempla qgrfktamrk ilnamalvqk rgiditalgg fssiifenfs ldkllnvrldi  
 121 tldiqrfttg nthtayilcq qveqgavryg idpakatvav vgatgdigsa vcrwltdrag  
 181 ihelllvard aerldrlqqe lgtgrilpve ealpkadivv wvasmnggma idpaglrtpc  
 241 llidggypkn magtlqrpgi hildggmveh slldidwqims flnvpnparg ffacfaesml  
 301 lefeglhfnf swgrnhitve kmaqigslsk khgfrpllep sqrsqgelvhg

*Nostoc punctiforme* PCC73102 ZP\_00108837 (Npun02004176) aminoácidos(SEQ ID NO:153)

1 mfglighlts lehaqavaqe lgypeyadqg ldfwcsappq ivdsiivtsv tgqqiegryv  
 61 escflpempla srrikaatrkl ilnamahaqk hginitalgg fssiifenfk leqfsqvrni  
 121 kleferfttg nthtaiiick qveeaskqlg inlsnatvav cgatgdigsa vtrwldartd  
 181 vqellliard qerlkelqge lgrgkimlgt ealpqadvv wvasmpgrve idpttikqpc  
 241 llidggypkn latkiqyppgv hvlnnggiveh slldidwkimk ivnmdvparq lfacfaesml  
 301 lefeklytnf swgrnqitvd kmeqigrvsv khgfrpllv

*Anabaena variabilis* ATCC29413 YP\_323044 (Ava\_2534) aminoácidos (SEQ ID NO:154)

1 mfglighlts lehaqavaqe lgypeyadqg ldfwcsappq ivdhikvtsi tgeiiegryv  
 61 escflpempla srrikaatrkl vlnamahaqk hgiditalgg fssiifenfk leqfsqvrnv  
 121 tleferfttg nthtaiicr qveqasqqlg ielsqatvai cgatgdigsa vtrwldaktd  
 181 vkellliarn qerlqelqse lgrgkimsld ealpqadivv wvasmpkgve inpqvlkqpc  
 241 llidggypkn lgtkvqyppgv yvlnnggiveh slldidwkimk ivnmdvparq lfacfaesml  
 301 lefeklytnf swgrnqitvd kmeqigqasv khgfrpllv

*Synechococcus elongatus* PCC6301 YP\_170761 (syc0051\_d) aminoácidos(SEQ ID NO:155)

1 mfglighlts leqardvsrr mgydeyadqg lefwssappq ivdeitvtsa tgkvihgryi  
 61 escflpempla arrfktatrkl vlnamshaqk hgidisalgg ftsiifenfd laslrqvrtd  
 121 tleferfttg nthtayvicr qveaaaktlg iditqatvav vgatgdigsa vcrwldklkg  
 181 vgdliiltarn qerldnlqae lgrgkilple aalpeadviv wvasmpqgvv idpatlkqpc  
 241 vlidggypkn lgskvqgegi yvlnnggiveh cfdidwqims aaemarperq mfacfaeaml  
 301 lefegwhtnf swgrnqitie kmeaigeasv rhgfqplala

*Nostoc* sp. PCC 7120 alr5284 (NP\_489324) aminoácidos (SEQ ID NO:156)

1 mfglighlts lehaqavaqe lgypeyadqg ldfwcsappq ivdhikvtsi tgeiiegryv  
 61 escflpempla srrikaatrkl vlnamahaqk ngiditalgg fssiifenfk leqfsqvrnv  
 121 tleferfttg nthtaiicr qveqasqqlg ielsqatvai cgatgdigsa vtrwldaktd  
 181 vkellliarn qerlqelqse lgrgkimsld ealpqadivv wvasmpkgve inpqvlkqpc  
 241 llidggypkn lgtkvqyppgv yvlnnggiveh slldidwkimk ivnmdvparq lfacfaesml  
 301 lefeklytnf swgrnqitvd kmeqigqasv khgfrpllv

**Vector pY75 (SEQ ID NO:48)**

ggcgcaggg cggatcccc gggctgcagg aattcgatat caagcttata gataccgctg  
 acctcgaggg ggggcccggg acccaattcg cctatagtg agtcgtatta cgcgcgctca  
 ctggcgtcg tttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttacca acttaatcgc  
 cttgcagcac atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc  
 ccttcccaac agttgocgag cctgaatggc gaatggcgcg acgcgccctg tagcggcgca

FIG. 17 Cont.

```

ttaagcgcgg  cgggtgtggt  ggttacgcgc  agcgtgaccg  ctacacttgc  cagcgcctta
gcgcccgtc  ctttcgcttt  ctcccttcc  tttctcgcca  cgttcgccgg  ctttccccgt
caagctctaa  atcgggggct  ccctttaggg  ttccgattta  gtgctttacg  gcacctcgac
ccccaaaaac  ttgattaggg  tgatggttca  cgtagtgggc  catcgccttg  atagacgggt
tttcgccctt  tgacgttgga  gtccacgttc  tttaatagtg  gactcttggt  ccaaactgga
acaacactca  accctatctc  ggtctattct  tttgatttat  aagggathtt  gccgatctcg
gcctattggt  taaaaaatga  gctgatttaa  caaaaattta  acgcgaattt  taacaaaata
ttaacgttta  caatttcctg  atgcggtatt  ttctccttac  gcactctgtc  qgtatttcac
accgcatatc  gacggtcgag  gagaacttct  agtatatcca  catacctaata  attattgcct
tattaaaaaa  ggaatcccaa  caattacatc  aaaatccaca  ttctcttcaa  aatcaattgt
cctgtacttc  cttgttcatg  tgtgttcaaa  aacgttatat  ttataggata  attatactct
atcttcacac  aagtaattgg  ttgtttggcc  gagcggctca  aggcgcctga  ttcaagaaat
atcttgaccg  cagttaactg  tgggaatact  caggtatcgt  aagatgcaag  agttcgaatc
tcttagcaac  cattatthtt  ttctcaaca  taacgagaa  acacaggggc  gctatcgcac
agaatcaaat  tcgatgactg  gaaatthttt  gttaatthca  gaggtcgct  gacgcatata
cctttttcaa  ctgaaaaatt  gggagaaaaa  ggaagggtga  gaggcggaa  cggcttttc
atatagaata  gagaagcgtt  catgactaaa  tgcttgcata  acaatacttg  aagttgacaa
tattatthta  ggacctattg  ttttttccaa  taggtggta  gcaatcgtct  tactttctaa
ctttcttac  cttttacatt  tcagcaatat  atatatatat  ttcaaggata  taccattcta
atgtctgcc  ctatgtctgc  ccctaagaag  atcgtcgttt  tgccaggtga  ccacgttgg
caagaaatca  cagecgaagc  cattaagggt  ctaaaagcta  tttctgatgt  tcgttccaat
gtcaagttcg  atttcgaaaa  tcatttaatt  ggtggtgctg  ctatcgatgc  tacagggtgc
ccacttccag  atgaggcgct  ggaagcctcc  aagaagggtg  atgcgctttt  gttagggtgc
gtggtgggc  ctaaatgggg  taccggtagt  gttagacctg  aacaagggtt  actaaaaatc
cgtaaagaac  ttcaattgta  cgccaactta  agaccatgta  actttgcata  cgactctctt
ttagacttat  ctccaatcaa  gccacaatth  gctaaaggta  ctgacttctg  tgttgtcaga
gaattagtgg  gaggtattta  ctttggtta  agaaggaag  acgatggtga  tgggtgcgct
tggtgatag  aacaatacac  cgttccagaa  gtgcaaagaa  tcacaagaat  ggcgcgtttc
atggccctac  aacatgagcc  accattgcct  atttggtcct  tggataaagc  taatcttttg
gcctcttcaa  aatttgagg  aaaaactgtg  gaggaacca  tcaagaacga  attccctaca
ttgaaggttc  aacatcaatt  gattgattct  gccgcatga  tectagttaa  gaaccaacc
cacctaaatg  gtattataat  caccagcaac  atgtttggtg  atatcatctc  cgatgaagcc
tccgttatcc  caggttcctt  gggtttcttg  ccatctgcgt  ccttggcctc  tttgccagac
aagaacaccg  catttggttt  gtacgaacca  tgccacgggt  ctgctccaga  tttgccaaag
aataagggtg  accctatcgc  cactatcttg  tctgctgcaa  tgatgttgaa  attgtcattg
aacttgctg  aagaaggtaa  ggccattgaa  gatgcagtta  aaaaggthtt  ggatgcagg
atcagaactg  gtgatttagg  tggttccaac  agtaccaccg  aagtcggtga  tgcgtgcgc
gaagaagtta  agaaaatcct  tgcttaaaaa  gattctcttt  ttttatgata  tttgtacata
aactttataa  atgaaattca  taatagaaac  gacacgaaat  tcaaaaatgg  aatagtcca
taggtagac  gaaactatat  acgcaatcta  catacattta  tcaagaagga  gaaaaaggag
gatagtaaag  gaatacaggt  aagcaattg  atactaatgg  ctcaacgtga  taaggaaaaa
gaattgcaact  ttaacattaa  tattgacaag  gagggaggca  ccacacaaaa  agttagggtg
aacagaaaaa  catgaaacta  cgattcctaa  tttgatattg  gaggatthtt  tctaaaaaaa
aaaaaataca  acaataaaaa  aacactcaat  gacctgacca  ttgatggag  tttaatgcaa
taccttcttg  aagcatttcc  cataatgggt  aaagttccct  caagaatttt  actctgtcag
aaacggcctt  acgacgtagt  cgataggtg  cactctcagt  acaatctgct  ctgatgccgc
atagttaagc  cageccccgac  acccgccaac  acccgtgac  gcgccctgac  gggcttgtct
gctcccggca  tccgcttaca  gacaagctgt  gaccgtctcc  gggagctgca  tgtgtcagag
gttttcaccg  tcatcaccga  aacgcgcgag  acgaaagggc  ctcgtgatac  gcctatthtt
ataggttaat  gtcatgataa  taatgthttc  ttagtatgat  ccaatataca  aggaaatgat
agcattgaag  gatgagacta  atccaattga  ggagtggcag  cataagaac  agctaaaggg
tagtgctgaa  ggaagcatac  gatacccgcc  atggaatggg  ataatacac  aggaggtact
agactaccct  tcatctaca  taatagacg  cataaagta  cgcattlaag  cataaacgc
cactatgccg  ttcttctcat  gtatatatat  atacaggcaa  cacgcagata  taggtgogac

```

gtgaacagtg agctgtatgt ggcgagctcg cgttgcaatt tcggaagcgc togttttcgg  
 aaacgctttg aagttcctat tccgaagttc ctattctcta gaaagtatag gaacttcaga  
 gcgcttttga aaaccaaag cgctctgaag acgcactttc aaaaaacca aaacgcaccg  
 gactgtaacg agctactaaa atattgcgaa taccgcttcc acaaacattg ctcaaaagta  
 tctctttgct atatatctct gtgctatata cctatataac ctacccatcc accttcgct  
 ccttgaactt gcatctaaac tcgaccteta cattttttat gtttatctct agtattactc  
 tttagacaaa aaaattgtag taagaactat tcatagagtg aatcgaaaac aatacgaaaa  
 tgtaaacatt tcctatacgt agtatataga gacaaaatag aagaaaccgt tcataatttt  
 ctgaccaatg aagaatcctc aacgctatca ctttctgttc acaaagtatg cgcaatccac  
 atcggtatag aatataatcg gggatgcctt tatcttgaaa aaatgcacc gcagcttcgc  
 tagtaatcag taaacgcggg aagtggagtc aggccttttt tatggaagag aaaatagaca  
 ccaaagtagc cttcttctaa ccttaacgga cctacagtgcc aaaaagtat caagagactg  
 cattatagag cgcacaaagg agaaaaaaag taatctaaga tgctttgtta gaaaaatagc  
 gctctcggga tgcatttttg tagaacaanaa aagaagtata gattctttgt tggtaaaata  
 gcgctctcgc gttgcatttc tgttctgtaa aaatgcagct cagattcttt gtttgaaaaa  
 ttagcgctct cgcggtgcat ttttgtttta caaaaatgaa gcacagattc ttcggtggta  
 aataagcgtc ttcgcggtgc atttctgttc tgtaaaaatg cagctcagat tctttgtttg  
 aaaaattgag gctctcggg tgcatttttg tgcaactttt ttctacaaaa tgaagcacag atgctcgtt  
 cagtgggcac ttttcgggga aatgtgcgcy gaacccctat ttgtttatft ttctaatac  
 attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa  
 aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcctc tattcccttt tttgcggeat  
 tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgtcggtgaa agtaaaagat gctgaagatc  
 agttgggtgc acgagtggtg tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga  
 gttttcggcc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg  
 cggattatc ccgtattgac ggcgggcaag agcaactcgg tcgcccata cactattctc  
 agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatacag  
 taagagaatt atgcagtct gccataacca tgagtgataa cactcggcc aacttactc  
 tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg  
 taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gaccgagcgtg  
 acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac  
 ttactctagc ttcgggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac  
 cacttctgog ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggcggcgtg  
 agctgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggttaagccc tcccgtatg  
 tagttatcta cagcagggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgtg  
 agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac  
 tttagattga tttaaaact catttttaat ttaaaaggat ctagggtgag atccttlltg  
 ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg  
 tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct cgcgtaate tgctgcttgc  
 aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc  
 ttttccgaa ggtactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt  
 agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctctagcacc gcctacatac ctcgctctgc  
 taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gsgttggact  
 caagacgata gttaccggat aagggcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac  
 agccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag  
 aaagcggcac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggttaagc ggcagggtcg  
 gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg  
 tcgggtctcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca gggggcggga  
 gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctgyccttt tgctggcctt  
 ttgctcacat gttctttcct gcggtatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgct  
 ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcag tccagtgcag  
 aggaagcggg agagcgcoca atacgcaaac cgcctctccc cgcgcttgg ccgattcatt  
 aatgcagctg gcacgacagg tttcccgaact ggaaagcggg cagtgcagc aacgcaatta  
 atgtgagttt cctcactcat taggcacccc aggctttaca cttatgctt ccggtccta  
 tgttgtggtg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt  
 acgcaagct cgcaattaac cctcactaaa ggaacaaaaa gctggagctc caccgcggga  
 ttcgaaaact aagttcttgg tgttttaaaa ctaaaaaaaa gactaactat aaaagtgaa  
 ttttaagaagt ttaagaaata gatttacaga attacaatca atacctaccg tctttatata

FIG. 17 Cont.

```

cttattagtc aagtaggga ataatttcag ggaactggt tcaacctttt ttttcagctt
tttccaaatc agagagagca gaaggtaata gaagggtgaa gaaatgaga tagatacatg
cgtgggtcaa ttgccttggt tcatcattta ctccaggcag gttgcatcac tccattgagg
ttgtgcccgt tttttgcctg tttgtgcccc tgttctctgt agttgcgcta agagaatgga
cctatgaact gatggttggg gaagaaaaca atattttggg gctgggattc ttttttttc
tggatgccag cttaaaaagc gggctccatt atattttagt gatgccagga ataaactgtt
caccagaca cctacgatgt tatatattct gtgtaacccg cccctattt tgggcatgta
cgggttacag cagaattaa aggctaattt tttgactaaa taaagttagg aaaatcacta
ctattaatta tttacgtatt ctttgaatg gcagtattga taatgataaa ctcgaaatca
ctagtggatc cgcccagc

```

Vector pZP2-YACBP (SEQ ID NO:49)

```

ggccgcaagt gtggatggg aagtgagtc cgggttctgt gtgcacaatt ggcaatccaa
gatggatgga ttcaacacag ggatatagcg agctacgtgg tgggtgaggy atatatgcaac
ggatatttat gtttgacact tgagaatgta cgatacaagc actgtccaag tacaatacta
aacatactgt acatactcat actcgtaccc gggcaacggt ttcacttgag tgcagtggtt
agtgtcttta ctcgtacagt gtgcaatact gcgtatcata gtctttgatg tatatcgtat
tcattcatgt tagttgcgta cgggcgtcgt tgccttggtg atttttgagg acccatccct
ttggtatata agtatactct ggggttaagg ttgcccgtgt agtctaggtt atagttttca
tgtgaaatac cgagagccga gggagaataa acgggggtat ttggacttgt ttttttcgcy
gaaaagcgtc gaalcaaccc tgcgggcctt gcaccatgtc cagcagctgt ttctcgcctc
aattcgcctc ttgcacgtea aaattaggcc tccatctaga cccctccata acatgtgact
gtggggaaaa gtataaggga aaccatgcaa ccatagacga cgtgaaagac ggggaggaaac
caatggaggc caaagaaatg ggttagcaac agtccaggag acagacaagg agacaaggag
agggcgcccg aaagatcgga aaaacaaaca tgtccaattg gggcagtgac ggaacgaca
cggacacttc agtacaatgg accgaccatc tccaagccag ggttattccg gtatcacctt
ggcctgaacc tcccgctggt acctgatatt gtacacgttc acattcaata tactttcagc
tacaataaga gaggctgttt gtcgggcatg tgtgtccgtc gtatgggggtg atgtccgagg
gcgaaattcg ctacaagctt aactctggcg cttgtccagt atgaatagac aagtcaagac
cagtggtgce atgatgaca gggaggtaca agacttcgat actcagcat tactcggact
tgtggcgatt gaacagacgg gcgatcgctt ctccccgta ttgcccggcgc gccagctgca
ttaatgaate ggccaacgcy cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc
ctcgtcact gactcgctgc gctcggctcgt tccgctgcyg cgagcggat. cagctcactc
aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaqa acatgtgagc
aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcy ttgctggcgt ttttccatag
gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tgcacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc
gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccttggagc tccctcgtgc gctctcctgt
tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgtc
ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtogttcgt ccaagctggg
ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccgta actatcgtct
tgagtccaac ccgtaagac acgacttate gccactggca gcagccactg gtaacaggat
tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtgggtggc ctaactcggg
ctacactaga agaacagtat ttggatctcy cgtctgctg aagccagtta ccttcggaaa
aagagttggg agctcttgat ccggcaaaqa aaccaccgct ggtagcggty gttttttgt
ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatctttc
tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctacagttaa gggattttg tcatgagatt
atcaaaaagc atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta
aagtatatat gagttaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagty aggcacctat
ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcy tgtagataac
tacgataccg gagggcttac catctggccc cagtgctgca atgataccgc gagaccacg
ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggcgy agcgcagaag
tggctctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgcgggy aagctagagty
aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcactcgtgt

```

FIG. 17 Cont.

```

gtcacgctcg  togtttggtg  tggettccatt  cagctccggt  tcccaacgat  caaggcgagt
tacatgatcc  cccatgttgt  gcaaaaaagc  ggttagctcc  ttcggtcctc  cgatcgttgt
cagaagtaag  ttggccgcag  tgttatcact  catggttatg  gcagcactgc  ataattctct
tactgtcatg  ccatecgtaa  gatgcttttc  tgtgactggg  gagtactcaa  ccaagtcatt
ctgagaatag  tgtatgcggc  gaccgagttg  ctcttgcccg  gcgtcaaac  gggataatac
cgcgccacat  agcagaactt  taaaagtgtc  catcatggga  aaacgttctt  cggggcgaaa
actctcaagg  atcttaccgc  tgttgagatc  cagttcgatg  taacccaetc  gtgcacccaa
ctgatcttca  geatctttta  ctttcaccag  cgtttctggg  tgagcaaaaa  caggaaggca
aaatgcgcga  aaaaagggaa  taaggcgac  acggaatgt  tgaataactca  tactcttct
ttttcaatat  tattgaagca  tttatcaggg  ttattgtctc  atgagcggat  acatatttga
atgtatttag  aaaaataaac  aaataggggt  tccgcgcaca  tttccccgaa  aagtgccacc
tgatgcggtg  tgaataaccg  cacagatgcg  taaggagaaa  ataccgcac  aggaaattgt
aagcgttaat  attttgtaa  aatcgcggt  aaattttgt  taaatcagct  cattttttaa
ccaataggcc  gaaatcggca  aatccctta  taaatcaaaa  gaatagaccg  agatagggtt
gagtgttgtt  ccagtttggg  acaagagtcc  actattaaag  aacgtggact  ccaacgtcaa
agggcgaaaa  accgtctatc  agggcgatgg  cccactacgt  gaaccatcac  cctaatcaag
lttttggggg  lcgaggtgcc  gtaaaagcact  aaatcggaac  cctaaaggga  gcccccgatt
tagagcttga  cggggaaagc  cggcgaacgt  ggcgagaaag  gaagggaaga  aagcgaaagg
agcgggcgct  agggcgctgg  caagtgtagc  ggtcacgctg  cgcgtaacca  ccacacccgc
cgcgcttaat  ggcgcgctac  agggcgctc  cattcgccat  tcaggctcgc  caactgttgg
gaaggcgat  cgggtgcggc  ctcttcgcta  ttacgccagc  tggcgaaagg  gggatgtgct
gcaaggcgat  taagttgggt  aacgccaggg  tttcccagt  caccgacttg  taaaacgacg
gccagtgaat  tghtaatcga  ctactatag  ggcaattgg  gccgcagctc  gcatgcgctg
atgacacttt  ggtctgaaag  agatgcattt  tgaatcccaa  acttgcagtg  cccaagtac
atacatctcc  gogttttgga  aaatgttcag  aaacagttga  ttgtgttga  atggggaatg
gggaatggaa  aatgactca  agtatcaatt  ccaaaaactt  ctctggctgg  cagtacctac
tgtccatact  actgcatttt  ctccagtcag  gccactctat  actcgacgac  acagtagtaa
aaccagata  atttcgacat  aaacaagaaa  acagacccaa  taatatttat  atatagtcag
ccgttltgcc  agttcagact  gtaatagccg  aaaaaaaatc  caaagtttct  attctaggaa
aatatatcc  aatattttta  attcttaatc  tcatttattt  tattctagcg  aaataactt
cagctacttg  agacatgtga  taccacaaaa  tccgattcgg  actcggttgt  tcagaagatt
atatggcatt  cgtgctcgct  tgttcacgta  ttcttctgt  tccatctctt  ggccgacaat
cacacaaaa  tggggttttt  tttttaattc  taatgattca  ttacagcaaa  attgagatat
agcagaccac  gtattccata  atcaccaagg  aagtcttgg  gcgtcttaat  taagtcatac
acaagtcagc  tttcttcgag  cctcatataa  gtataagtag  ttcaacgtat  tagcactgta
cccagcatct  ccgtatcgag  aaacacaaca  acatgcccc  ttggacagat  catgcggata
cacagttgt  gcagatcat  acatactcga  tcagacaggt  cgtctgacca  tcatacaagc
tgaacaagcg  ctccatactt  gcacgctctc  tatatacaca  gttaaattac  atatccatag
tctaactctc  aacagttaat  ctctggtaa  gcctcccagc  cagccttctg  gtatcgcttg
gcctcctcaa  taggatctcg  gttctggccg  tacagacctc  ggccgacaat  tatgatatcc
gttccgtag  acatgacatc  ctcaacagtt  cggtagctg  gtccgagagc  gctcctctg
tcgtcaagac  ccaccccggg  ggtcagaata  agccagtcct  cagagtcgcc  cttaggtcgg
ttctgggcaa  tgaagccaac  cacaaactcg  gggcggatc  gggcaagctc  aatggctcgc
ttggagtact  cgccagtggc  cagagagccc  ttgcaagaca  getcggccag  catgagcaga
cctctggcca  gcttctcgtt  gggagagggg  actaggaact  ccttgtactg  ggagttctcg
tagtcagaga  cgtcctcctt  cttctgttca  gagacagttt  cctcggcacc  agctcgcagg
ccagcaatga  ttccggttcc  gggtacaccg  tggcggttgg  tgatatcgga  ccactcggcg
attcggtgac  accggtactg  gtgcttgaca  gtgttgccaa  tatctgogaa  ctttctgtcc
tcgaacagga  agaaaccgtg  cttaaagagca  agttccttga  gggggagcac  agtgccggcg
taggtgaagt  cgtaatgat  gtcgatatgg  gttttgatca  tgcacacata  aggtccgacc
ttatcggcaa  gctcaatgag  ctcttgggtg  gtggtaacat  ccagagaagc  acacaggttg
gtttctctgg  ctgccagag  cttgagcaet  cgagcggcaa  aggcgactt  gtggacgtta
gctcgacttt  cgtgagagg  cattttggtg  gtgaagagga  gactgaata  aattlagtct
gcagaacttt  ttatcggaac  cttatctggg  gcagtgaaat  atatgttatg  gtaatagtta

```

FIG. 17 Cont.

```

cgagttagtt gaacttatag atagactgga ctatacggct atcgggtccaa attagaaaga
acgtcaatgg ctctctgggc gtcgcctttg ccgacaaaaa tgtgatcatg atgaaagcca
gcaatgacgt tgcagctgat attgttgctg gccaacccgc ccgaaaacgc agctgtcaga
cccacagcct ccaacgaaga atgtatcgtc aaagtgatcc aagcacactc atagttggag
tcgtactcca aaggcgcaaa tgacgagtca gacagatact cgtcaaacgg taggttagtg
cttggtatat gagttgtagg catgacaatt tggaaagggg tggactttgg gaatattgtg
ggatthcaat accttagttt gtacagggtg attgttacia atgatacaaa gaactgtatt
tcttttcatt tgttttaatt ggttgtatat caagtccggt agacgagctc agtgccttgg
cttttggcac tgtatttcat ttttagaggt aactacatt cagtgaggtg tggtaaggtt
gagggcataa tgaaggcacc ttgtactgac agtcacagac ctctcaccga gaatthtatg
agataatact ggggtcattt taggctcatc gatgagccta aaatgaacce gagtatctc
cataaaattc tccgtgagag gtctgtgact gtcagtacaa ggtgccttca ttatgcctc
aaccttacca tacctcactg aatgtagtgt acctctaaaa atgaaataca gtgccaaaaag
ccaaggcact gagctcgtct aacggacttg atatacaacc aatataaaca aatgaaaaga
aatacagttc tttgtatcat ttgtaacaat taccctgtac aaactaaggt attgaaatcc
cacaatattc ccaaagtcca cccctttcca aattgtcatg cctacaactc atataccaag
cactaaccta ccgtttaaac agtgtacgca gatctactat agaggaacat ttaaatttgc
ccggagaaga cggccaggcc gcctagatga caaattcaac aactcacagc tgactttctg
ccattgccac tagggggggg cctttttata tggccaagcc aagctctcca cgtcggttgg
getgcaccca acaataaatg ggtagggttg caccaacaaa gggatgggat ggggggtaga
agatacagag ataaccgggc tcaatggcac aaataagaac gaatactgcc attaagactc
gtgatccagc gactgacacc attgcatcat ctaagggcct caaaactacc tccgaactgc
tgcgctgatc tggacaccac agaggttccg agcactttag gttgcaccaa atgtcccacc
aggtgcaggc agaaaacgct ggaacagcgt gtacagtttg tcttaacaaa aagtgagggc
getgaggtcg agcaggggtg tgtgacttgt tatagccttt agagctgcca aagcgcgtat
ggatthggct catcaggcca gattgagggt ctgtggacac atgtcatgtt agtgtacttc
aatcgcctcc tggatatagc cccgacaata ggccgtggcc tcattthttt gccttccgca
catttccatt gctcgttacc cacaccttgc ttctectgca cttgccaaacc ttaatactgg
tttacattga ccaacatctt acaagcgggg ggcttgtcta gggatatata aaacagtgcc
tctcccaatc ggttgccagt ctctthtttc ctttcttcc ccacagattc gaaatctaaa
ctacacatca cagaattccg agccgtgagt atccacgaca agatcagttg cgagacgacg
cgthttgtgt aatgacacaa tccgaaagtc gtagcaaca cacactctct acacaaacta
accagctct ggtaccatgg ctcccgccga attcaccgcc gctgccgact ctgtgcagaa
gcttcccaag actccttccg acgacgagct tcttgagctc tacggactgt acaagcaggc
caccgtccgc gacaacaaca ccgaccgacc ccgccccttc aacttaagg ccaagtacaa
gtgggacgcc tgggacaagc tcaagggcaa gtctcaggag gaggctgagc aggagtacat
tgctcttgc cagaccctt ccgacaagta caactaagc

```

Plásmido pGPD-425 (SEQ ID NO:50)

```

ggtggagctc cagctthttg tccctthtagt gagggthaat tgcgcgcttg gcgtaatcat
ggtcatagct gthtctgtg tgaattgtt atccgctcac aattccacac aacataggag
ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaattgagt gaggttaactc acattthttg
cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa
tcggccaacg cgcgggggaga ggcggthttg gtattggggc ctcttccgct tctctgctca
ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg
taatacggth atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaaggcc
agcaaaaagg caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gthtttccat aggtcccgcc
cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtccagag gtggcgaaac ccgacaggac
tataaagata ccaggcgtth cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc
tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc tcccttccgg aagcgtggcg cthtctcata
gctcagctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcc ctccaagctg ggctgtgtgc
acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgc ccttatccgg taactatcgt cttgagttca
accggtaag acacgactta tgcactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag

```

FIG. 17 Cont.

```

cgaggtatgt aggcgggtgct acagagttct tgaagtgggtg gcctaactac ggctacacta
gaaggacagt atttgggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg
gtagctctcg atccggcaaaa caaaccaccg ctggttagcgg tggttttttt gtttgcaagc
agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacgggggt
ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa
ggatcttcac ctgatccctt taaatataaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat
atgagtaaac ttggctctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagega
tctgtctatt tegtccatcc atagttgect gactccccgt cgtgtagata actacgatac
gggagggctt accatctggc cccagtgctg caatgatacc gcgagacca cgtccaccgg
ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggctctg
caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtgtt
cgccagttaa tagtttgccg aacggtgttg ccattgctac aggcctcgtg gtgtcacgct
cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat
ccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtec tccgatcgtt gtcagaagta
agtggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca
tgccatccgt aagatgcttt totgtgactc gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat
agtgtatgcg gcgaccgagt tgcctctgcc cggcgtcaat acgggataat acccgccac
atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgctc ttcggggcga aaactctcaa
ggatcttacc gctggtgaga tccagttcga tgt aacccac tctgtcacc aactgatctt
cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg
caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactctc ctttttcaat
attattgaag catttatcag ggtaattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt
agaaaaataa acaaataggg gtcccgcgca catttccccg aaaagtcca cctgaacgaa
gcctctgtgc ttcattttgt agaacaaaaa tgcaacgcga gagcgctaat ttttcaaca
aagaatctga gctgcatttt tacagaacag aaatgcaacg cgaaagcgtc attttaccaa
cgaagaatct gtgcttcatt tttgtaaaac aaaatgcaa cgcgagagcg ctaatttttc
aaacaaagaa tctgagctgc atttttacag aacagaaatg caacgcgaga gcgctatttt
accaacaaag aatctatact tcttttttgt tctacaaaaa tgcctcccga gagcgctatt
tttctaacaa agcatcttag attacllllt ttctcctltg tgcgctctat aatgcagtct
cttgataact ttttgactg taggtccggt aagggttagaa gaaggctact ttggtgtcta
tttctcttc cataaaaaa gctgactcc acttcccgcg tttactgatt actgaacgaa
ctgcgggtgc attttttcaa gataaaggca tccccgatta tattctatac cgatgtggat
tgccatact ttgtgaacag aaagtgatag cgttgatgat tcttcattgg tcagaaaatt
atgaaagggt tcttctatct tgtctctata tactacgtat aggaaatggt tacatttctg
tattgttttc gattcactct atgaatagtt cttactacaa tttttttgtc taaagagtaa
tactagagat aaacataaaa aatgtagagg tccagtttag atgcaagttc aaggagcga
aggtgatgg gtaggtata tagggatata gcacagagat atatagcaaa gagatacttt
tgagcaatgt ttgtggaagc ggtattcgca atatttttagt agctcgttac agtccgggtc
gtttttgggt ttttgaaagt gcgctctcag agcgtttttg gttttcaaaa gcgctctgaa
gttctatcac tttctagaga ataggaactc cggaatagga acttcaaagc gtttccgaaa
acgagcgtt ccgaaaatgc aacgcgagct gcgcacatac agctcactgt tcacgtcgca
cctatactctg cgtgttgccg gtatataat atacatgaga agaacggcat agtgcgtgtt
tatgcttaaa tgcgtaacta tatgctcta tttatgtagg atgaaaggta gtctagtacc
tctgtgata ttatcccatt ccctcggggg tatcgtatgc ttcttcagc actacccttt
agctgttcta tatgctgcca ctctcaatt ggattagtct catccttcaa tgctatcatt
tcctttgata ttggatcata ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaaat
aggcgtatca cgaggccctt tctgtctcgg cgtttcgggtg atgacgggtg aaacctctga
cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa
gcccgtcagg gcgctcagc ggggtgtggc ggggtgtcggg gctggcttaa ctatgcggca
tcagagcaga ttgtactgag agtgcacat atcgactacg tcgtaaggcc gtttctgaca
gagtaaaat cttgagggaa ctttaccat tatgggaaat gcttcaagaa ggtattgact
taaaactaat caaatggtca ggtcattgag tgttttttat ttgtgtatt ttttttttt
tagagaaaaat cctccaatat caaattagga atcgtagttt catgattttc tgttacacct
aactttttgt gtgggtgcct cctcctgtc aatattaatg ttaaagtgea attctttttc

```

FIG. 17 Cont.

```

cttatcacgt  tgagccatta  gtatcaatth  gcttacctgt  attcctttac  tatectcctt
tttctccttc  ttgataaatg  tatgtagatt  gcgtatatag  tttcgtctac  cctatgaaca
tattccattt  tgtaatttcg  tgtcgtttct  attatgaatt  tcatttataa  agtttatgta
caaatatcat  aaaaaaagag  aatcttttta  agcaaggatt  ttcttaactt  cttcggcgac
agcatcaccg  acttcgggtg  tactgttggg  accacctaas  tcaccagttc  tgatacctgc
atccaaaacc  tttttaactg  catcttcaat  ggccttacct  tcttcaggca  agttcaatga
caatttcaac  atcattgcag  cagacaagat  agtggcgata  gggtaaacct  tattctttgg
caaatctgga  gcagaaccgt  ggcattggtc  gtacaaacca  aatgcgggtg  tcttgtctgg
caaagaggcc  aaggacgcag  atggcaacaa  acccaaggaa  cctgggataa  cggaggcttc
atcggagatg  atatcaccaa  acatgttgct  ggtgattata  ataccattta  ggtgggttg
gttcttaact  aggatcatgg  cggcagaatc  aatcaattga  tgttgaacct  tcaatgtagg
gaattcgttc  ttgatggttt  cctccacagt  tttctccat  aatcttgaag  aggccaaaag
attagcttta  tccaaggacc  aataggcaa  tgggtgctca  tgtttaggg  ccatgaaagc
ggccattctt  gtgattcttt  gcacttctgg  aacggtgat  tgttctact  cccaagcgac
accatcacca  tegtcttctt  ttctcttacc  aaagtaata  cctcccacta  attctctgac
aacaacgaag  tcagtacctt  tagcaaattg  tggcttgatt  ggagataagt  ctaaaagaga
gtcggatgca  actttacatg  gtcttaagtt  ggcgtacaat  tgaagttctt  tacggatttt
tagtaaacct  tgttcaggtc  taacactacc  ggtaccccat  ttaggaccag  ccacagcacc
taacaaaacg  gcatcaacct  tcttggaggc  ttccagcgcc  tcatctggaa  gtgggacacc
tgtagcatcg  atagcagcac  caccaattaa  atgattttcg  aaatcgaact  tgacattgga
acgaacatca  gaaatagctt  taagaacctt  aatggcttcg  gctgtgattt  cttgaccaac
gtggtcacct  ggcaaaaacg  cगतcttctt  aggggcagac  atagggcgag  acattagaat
ggtatatcct  tgaaatata  atatatattg  ctgaaatgta  aaaggtaga  aaagttagaa
agtaagaaga  ttgctaacca  cctattggaa  aaaacaatag  gtccttaaat  aatattgtca
acttcaagta  ttgtgatgca  agcatttagt  catgaaagct  tctctattct  atatgaaaag
cgggttcggg  cctctcacct  ttctttttt  tcccaatttt  tcagttgaaa  aaggtatatg
cgtcaggcga  cctctgaaat  taacaaaaaa  tttccagtea  tcaaatgtga  ttctgtgcga
tagcgcctct  gtgtgttctc  gttatgttga  ggaaaaaat  aatggttgct  aagagattcg
aactcttga  tcttacgata  cctgagtatt  cccacagtta  actgcggtca  agatatttct
tgaatcaggc  gcctlagacc  gctcggccaa  acaaccaatt  acttgttgag  aaatagagta
taattatcct  ataaatata  cgtttttgaa  cacacatgaa  caaggaagta  caggacaatt
gattttgaag  agaatgtgga  ttttgatgta  attgttggga  ttccattttt  aatattgtca
taatattagg  tatgtggata  tactagaagt  tctcctcgac  cgtcgatatg  cgggtgtgaa
taccgcacag  atgcgtaagg  agaaaatacc  gcatacaggaa  attgtaaacg  ttaatatttt
gttaaaatc  gcgttaaat  tttgttaaat  cagctcattt  ttaaccaat  agcccgaat
cggcaaaaac  ccttataaat  caaaagaata  gaccgagata  gggttgagtg  ttgttccagt
ttggaacaag  agtccaat  taagaacgt  ggactccaac  gtcaaaaggc  gaaaaaccgt
ctatcagggc  gatggccac  tacgtgaacc  atcacccaa  tcaagttttt  tggggctgag
gtgccgtaaa  gcactaaatc  ggaaccctaa  agggagcccc  cgatttagag  cttgacgggg
aaagccggcg  aacgtggcga  gaaaggaagg  gaagaaagcg  aaaggagcgg  gcgctagggc
gctggcaagt  gtagecgtca  cgtgcgcgt  aaccaccaca  cccgccgcgc  ttaatgcgcc
gctacagggc  gcgtcgcgcc  attcgcatt  caggctgcgc  aactgttggg  aagggcgatc
ggtcggggcc  tcttcgctat  tacgccagct  ggcgaaaggg  ggatgtgctg  caaggcgatt
aagtgggta  acgccaggt  tttcccagtc  acgacgttgt  aaaacgacgg  ccagtgagcg
cgcgtaatac  gactcaat  agggcgaatt  gcgtaaccgg  cccccctcg  aggtcgacgg
tatcgataag  cttgatctg  aattcctgca  gcccggggga  tccactagtg  attcagattt
tatcattatc  aatactgcca  ttcaaagaa  tacgtaaata  attaatagta  gtattttcc
taactttatt  tagtcaaaaa  attagccttt  taattctgct  gtaaccgta  catgccaaa
atagggggcg  ggttacacag  aatatataac  atcgtaggtg  tctgggtgaa  cagtttattc
ctggcatoca  ctaaatata  tggagccgc  tttttaagct  ggcatacaga  aaaaaaaga
atcccagcac  caaatattg  ttttcttcac  caaccatcag  ttcataggte  cattctctta
gcgcaactac  agagaacagg  ggcacaaaca  ggcaaaaaac  ggcacaacc  tcaatggagt
gatgcaacct  gcctggagta  aatgatgaca  caaggcaatt  gaccacgca  tgtatctatc
tcattttctt  acaccttcta  ttaccttctg  ctctctctga  ttggaaaaaa  cglgaaaaaa
aaggttgaaa  ccagttccct  gaaattattc  ccctacttga  ctaataagta  tataaagacg

```

FIG. 17 Cont.

gtaggatttg attgtaattc tghtaaatcta tttcttaaac ttcttaaat ctacttttat  
 agttagtctt ttttttagtt ttaaaacacc aagaacttag tttcgaaatc cgcg

Vector pFBAIN-Mod-1 (SEQ ID NO:51)

gccccgcaa gtgtggatgg ggaagtgagt gccccggttct gtgtgcacaa ttggcaatcc  
 aagatggatg gattcaacac agggatatag cgagctacgt ggtgggtgca ggatatagca  
 accgatattt atgtttgaca cttgagaatg tacgatacaa gcactgtcca agtacaatac  
 taaacatact gtacatactc atactcgtac ccgggcaacg gtttcacttg agtgagtggt  
 ctagtgtctc tactcgtaca gtgtgcaata ctgcgtatca tagtctttga tgtatatcgt  
 attcattcat gttagttagc tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta  
 atgagtgagc taactcacat taattgcggt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa  
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat  
 tgggagctct tccgcttccct cgctcactga ctgcgtgoc tccggtcgttc ggtgcggcg  
 agcggtatca gctcactcaa agcgggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc  
 aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccag aaccgtaaaa aggcgcggtt  
 gctggcggtt tccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag  
 tcagaggtgg cgaacccga caggactata aagataccag gcggttcccc ctggaagctc  
 cctcgtgccc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc  
 ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt  
 cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagccccacc gctgcgctt  
 atccgtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc  
 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa  
 gtggtggcct aactacggct acactagaag gacagttatt ggtatctcgc ctctgctgaa  
 gccagttacc ttcggaaaaa gaggttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg  
 tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga  
 agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtg aacgaaaaact cacgttaagg  
 gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg  
 aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt  
 aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatctcgt tcatccatag ttgcctgact  
 ccccgctcgt tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggccccca gtgctgcaat  
 gataccgca gaccacgct cacgggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg  
 aaggcccgag cgcagaagtg gtccctgcaac tttatccgct tccatccagt ctattaattg  
 ttgcccggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgocgcaac ttggtgccat  
 tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttgggatg gcttcattca gctccggtc  
 ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catggtgtgc aaaaaagcgg tttagctcctt  
 cggctcctcc atcgttgtca gaagtaagt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc  
 agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgctttcttg tgactggtga  
 gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcccga ccgagttgct cttgcccggc  
 gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa  
 acgttcttcg ggcgaaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcagatga  
 acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg  
 agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaa aaagggaata agggcgacac ggaatggtg  
 aatactcata ctcttctttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat  
 gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacia atagggttc cgcgcacatt  
 tccccgaaa gtgccacctg acgcgcctg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt  
 ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgccctc ggcgccgctc ctttcgctt  
 cttcccttcc tttctcgeca cgttegcggg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct  
 ccttttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac cccaaaaaac ttgattaggg  
 tgatggttca cgtagtggc catgccectg atagacggtt tttcgccctt tgacgttga  
 gtccacgctt ttaaatagtg gactcttgtt ccaaactgga acaacactca accctatctc  
 ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctatggg taaaaaatga  
 gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta caatttccat  
 tcgccattca ggctgcgcaa ctgttgggaa gggcgatcgg tgccggcctc ttcgctatta  
 ccccagctgg cgaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggtt

FIG. 17 Cont.

```

tcccagtcac gacggtgtaa aacgacggcc agtgaattgt aatacgcactc actatagggc
gaattgggta cccggccccc cctcagaggc gatgggtgctg ataagcttga tatcgaattc
atgtcacaca aaccgatctt cgcctcaagg aaacctaatt ctacatccga gagactgccg
agatccagtc tacactgatt aattttcggg ccaataaatt aaaaaaatcg tgttatataa
tattatatgt attat.ata.ata tacatcatga tgat actgac agtcatgtcc cattgctaaa
tagacagact ccatctgccg cctccaactg atgttctcaa tatttaaggg gtcactctgc
attgtttaat aataaacaga ctccatctac cgctccaaa tgatgtctc aaaatatatt
gtalgaactt atttttatta cttagtatta ttagacaact tacttgcttt atgaaaaaca
cttcttattt aggaacaat ttataatggc agttcgttca tttacaatt tatgtagaat
aaatgttata aatgcgtatg ggaaatctta aatatggata gcataaatga tatctgcatt
gcctaattcg aatcaacag caacgaaaaa aatcccttgt acaacataaa tagtcacga
gaaatatcaa ctatcaaaga acagctattc acacgttact attgagatta ttattggacg
agaatcacac actcaactgt ctttctctct lctagaaata cagglacaag tatgtactat
tctcattggt catacttcta gtcatttcat cccacatatt ccttggattt ctctccaatg
aatgacattc tatcttgcaa attcaacaat tataataaga tataccaaag tagcgggata
gtggcaatca aaaagcttct ctgggtgtgct tctcgtattt atttttattc taatgatcca
ttaaagggtat atattttatt cttgttatat aatccttttg tttattacat gggctggata
cataaaggta ttttgattta attttttgct taaattcaat cccccctcgl lcagtgctca
ctgtaatggg aggaaattac catacttttg aagaagcaaa aaaaatgaaa gaaaaaaaaa
atcgtatttc caggtagac gttccgcaga atctagaatg cggtagcggg tacattgttc
ttcgaacgta aaagttgcgc tccctgagat attgtacatt tttgctttta caagtacaag
tacatcgtae aactatgtac tactgttgat gcatccacaa cagtttgttt tgtttttttt
tgtttttttt ttttctaag attcattacc gctatgtata cctacttga cttgtagtaa
gccgggttat tggcgttcaa ttaactatag acttatgaat ctgcacggtg tgcgctgca
gttactttta gcttatgcat gctacttggg tgtaaatattg ggatctgttc ggaatcaac
ggatgctcaa tcgatttcga cagtaattaa ttaagtcata cacaagtcag ctttcttoga
gcctcatata agtataagta gttcaacgta ttagcaactg acccagcacc tccgtatcga
gaaacacaac aacatgccc attggacaga tcatgoggat acacaggttg tgcagtatca
tacatactcg atcagacagg tegtctgacc atcatacaag ctgaaacagc gctccatact
tgcacgctct ctatatacac agttaaatta catatccata gtctaaccle taacagttaa
tcttctggta agcctcccag ccagccttct ggtatcgctt ggectctca ataggatctc
ggtctggcc gtacagacct cggccgacaa ttatgatatc cgtt.cgggta ataggatctc
cctcaacagt tccgtaactgc tgcctcgagag cgtctccctt gtcgtcaaga cccaccccg
gggtcagaat aagccagtcc tcagagtcgc ccttaggtcg gttctgggca atgaagccaa
ccacaaactc ggggtcggat cgggcaagct caatggctcg cttggagtac tccgagtg
ccagagagcc cttgcaagac agctcgcca gcatgagcag acctctggcc agcttctcgt
tgggagaggg gactaggaac tccttgtact gggagttctc gtatcagag acgtectcct
tcttctgttc agagacagtt tectcggcac cagctcgcag gccagcaatg atctcggttc
cgggtacacc gtggcgttg gtgatctcg accactcggc gattcgggta caccggtact
ggtgcttgac agtgttgcca atatctgca actttctgtc ctogaacagg aagaaaccgt
gcttaagagc aagttccttg agggggagca cagtgcgggc gttaggtgaag tegtcaatga
tgtcgatag ggttttgatc atgcacaca aaggctccgac cttatcggca agctcaatga
gctccttggg ggtggt aaca tccagagaag cacacaggtt ggttttcttg gctgccacga
gcttgagcac tccagcggca aaggcggact lgtggacggt agctcgagct tctgtaggag
gcattttggg ggtgaagagg agactgaaat aaatttagtc tgagaactt tttatcggaa
ccttatctgg gccagtgaag tatatgttat ggtaatagtt acgagttagt tgaactata
gatagactgg actatacggc tatcggcca aattagaaaag aacgtcaatg gctctctggg
cgtcgccttt gccgacaaa atgtgatcat gatgaaagcc agcaatgacg ttgcagctga
tattgttgtc ggccaaccgc gccgaaaacg cagctgtcag acccacagcc tccaacgaag
aatgtatcgt caaagtgatc caagcacact catagttgga gtcgtactcc aaaggcggca
atgacgagtc agacagatac cctcgaaaa cagtgtacgc agatctacta tagaggaca
tttaaattgc cccggagaag acggccaggc cgcctagatg acaaattcaa caactcacag
ctgactttct gccattgcca ctaggggggg gcttttttat atggccaagc caagctctcc
acgtcgggtt ggtgcaccc aacaataaat gggtaggggt gcaccaaca aggatggga
tgggggtag aagatacag gataacgggg ctcaatggca caataaagaa cgaatactgc

```

**FIG. 17 Cont.**

```

cattaagact cgtgatccag cgactgacac cattgcatca tctaagggcc tcaaaactac
ctcggaaactg ctgcgctgat ctggacacca cagaggttcc gagcacttta gggtgcacca
aatgtcccac caggtgcagg cagaaaacgc tggaaacagcg tgtacagttt gtcttaacaa
aaagtgaggg cgctgaggtc gagcaggggtg gtgtgacttg ttatagcctt tagagctgog
aaagcgcgta tggatttggc tcatcaggcc agattgaggg tctgtggaca catgtcatgt
tagtgtactt caatcgcccc ctggatatag ccccgacaat aggcctggtc ctcatTTTTT
tgccttccgc acatttccat tgctcggtac ccacaccttg cttctcctgc acttgccaac
cttaatactg gtttacattg accaacatct tacaagcggg gggcttgtct agggatata
taaacagtgg ctctcccaat cggttgccag tctctTTTTT cctttcttcc cccacagatt
cgaaatctaa actacacatc acagaattcc gagccgtgag tatccacgac aagatcagtg
tcgagacgac gcgttttgtg taatgacaca atccgaaagt cgctagcaac acacactctc
tacacaaact aaccagctc tggtagcatg g
    
```

**Gen de resistencia a cloranfenicol (SEQ ID NO:157)**

```

atggagaaaaaatcactggatataccaccggttgatatatcccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttca
gtcagttgctcaatgtacctataaccagaccggttcagctggatattacggcctttttaagaccgtaagaaaaata
agcacaagttttatccggccttttatccattcttgcggcctgatgaatgctcatccggaattccgtagggcaatg
aaagacggtgagctggtgatatgggatagtggtccacccttggtacacggctttccatgagcaaaactgaaacggtttc
atcgtctggagtgaaataccacgacgatctccggcagtttctacacataatcgcaagatgtggcgtggttacggtg
aaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatagttttcgtctcagccaatccctgggtgagttccacc
agttttgatttaaacgtggccaatattggacaactctctcggcccggtttccaccatgggcaaatattatcgcaagg
cgacaaggtgctgatgccgctggcgattcaggttcatcatgccgtttgtgatggctccatgtcggcagaatgctta
atgaattacaacagtagtgcgatgagtgccaggcggggggg
    
```

**Gen de resistencia a kanamicina parcial (SEQ ID NO:158)**

```

ttagaagaactcgtcaagaaggcagatagaaggcagatgcgctgcgaatcgggagcggcgataccgtaagacacgagga
agcggtcagcccattcgcgccaagctcttcagcaatatacagggtagccaacgctatgtcctgatagcggctcggc
acccccagccggccacagtcgatgaatccagaaaagcggccattttccaccatgatatacggcaagcagggcatcgcc
atgggtcagcagcagatcctcggcctcgggcatgcgcgcttgagcctggcgaacagttcggctggcggcagccct
gatgctcttcgtccagatcatcctgatcgacaagaccggctccatccgagtagctgctcgtcgtatgcatggttcc
gcttgggtggaatggcaggtagccggatcaagcgtatgcagccgcgcgatgcacagccatgatggatacttt
ctcggcaggagcaaggtgagatgacaggagatcctgcccggcacttcgccaatagcagccagtccttcccgctt
cagtgacaacgctcgagcacagctgc
    
```

**Secuencia de homólogo de LacZ (SEQ ID NO:159)**

```

cagacgatggtgcaggatatacctgctgatgaagcagaacaactttaacggcgtgcgctggttcgattatc
    
```

**Secuencia de homólogo de LacI (SEQ ID NO:160)**

```

atgtgaaaccagtaacgttatagcatgtcgcagagtatgccggtgtctcttatcagaccggttcccgcgtggtgaaac
caggccagccacgtttctcgcgaaaaacggggaaaaaagtggaaagcggcgatggcggagctgaattacattcccacccg
cgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcggttgcgtgatggcgttgccacctccaagtctggcctgcacgcgccgt
cgcaaatgtcgcggcgattaaatctcgcgcgatcaactgggtgccagcgtggtggtgctgatggtagaacgaagc
ggcgtcgaagcctgtaaagcggcgtgcacaatctctcgcgcaacgcgctcagtgggctgatcattaaactatccgct
ggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttccggcgttatctcttgatgtctctgaccaga
caccatcaacagtatattttctccatgaagacggtacgcgactggcgtggagcatctggtcgcattgggtcac
cagcaaatcgcgctgttagcgggcccattaaagtctcgtctcggcgcgtctgcgltcggctggctggcataaatactc
cactcgcaatcaaatcagccgatagcggaaacgggaaggcgaactggagtgccatgtccggtttcaacaaaccatgc
aaatgctgaatgagggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgtggcgcaatgcgcgcc
attaccgagtcgggctgcgcgttggcgggatctcggtagtgggatacgacgataccgaagacagctcatgta
tatcccgcgttaaccaccatcaaacaggattttcgcctgctggggcaaacaccgctggaccgcttgcgtgcaactct
ctcagggccaggcggtagaaggcaatcagctgttgcgcgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaat
acgcaaacgcctctcccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcagcacaggttcccgaactggaagcgg
cagtgaa
    
```

