

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 405**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
C10L 1/02 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2008 E 08744695 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 2129785**

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

30 Prioridad:

28.03.2007 US 908547 P
18.05.2007 WO PCT/US2007/011923
21.11.2007 US 989798 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HU, ZHIHAO y
VALLE, FERNANDO

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 536 405 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 potenciada de derivados de ácidos grasos

Campo técnico

5 Se proporcionan células y microorganismos modificados por ingeniería genética que producen productos a partir de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos (es decir, derivados de ácidos grasos), así como métodos para su uso. Los productos son particularmente útiles como biocombustibles.

Antecedentes

10 Los desarrollos en la tecnología han ido acompañados de una dependencia aumentada de fuentes de combustibles. Tales fuentes de combustibles están pasando a ser cada vez más limitadas y difíciles de conseguir. Con la combustión de combustibles fósiles teniendo lugar a un ritmo sin precedentes, es probable que la demanda mundial de combustible sea pronto mayor que las existencias de combustible actuales.

15 Como resultado, se han dirigido esfuerzos para aprovechar fuentes de energía renovable, tales como luz solar, agua, viento y biomasa. El uso de biomásas para producir nuevas fuentes de combustible que no se derivan de fuentes de petróleo (es decir, biocombustible) ha aparecido como una opción alternativa. El biocombustible es un combustible de combustión limpia, biodegradable que puede estar compuesto por 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.

20 El biodiésel ofrece varias propiedades beneficiosas interesantes y atractivas en comparación con diésel a base de petróleo, incluyendo emisiones reducidas (por ejemplo, monóxido de carbono, azufre, hidrocarburos aromáticos, partículas de hollín, etc.) 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 no es tóxico, es completamente biodegradable, y es muy seguro 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.

25 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 geográfica 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. Un subproducto no deseado del procedimiento de transesterificación es la glicerina. 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 30 35 1300 l/hectárea debido a que sólo se usa el aceite de la semilla para la producción de biodiésel, y no el resto de la biomasa de la colza. 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.

Zhang Hanxing *et al.*, FEMS Microbiology Letters (2006), vol. 259, n.º 2, páginas 249-253 dan a conocer la sobreexpresión de acil-CoA sintasa FadD en *Escherichia coli*.

40 Voelker TA *et al.*, Journal of Bacteriology (1997), vol. 176, n.º 23, páginas 7320-7327 dan a conocer la expresión de un ADNc de acil de cadena media-proteína portadora de acilo tioesterasa vegetal en *Escherichia coli*.

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

Sumario

45 Esta invención se refiere a la producción de derivados de ácidos grasos a partir de células recombinantes. Generalmente, los derivados de ácidos grasos se producen mediante expresión o sobreexpresión de al menos un gen que codifica para una enzima de derivado de ácido graso. Además, un gen que codifica para una enzima acil-CoA deshidrogenasa puede modificarse en la célula recombinante de modo que la expresión del gen está atenuada.

50 Se proporciona una célula recombinante que comprende al menos uno de (a) al menos un gen que codifica para una enzima de derivado de ácido graso, gen que está modificado de modo que se sobreexpresa el gen, y (b) un gen que codifica para una enzima acil-CoA deshidrogenasa, gen que está modificado de modo que la expresión del gen está atenuada. El gen modificado que codifica para un gen de enzima de derivado de ácido graso puede ser un gen que codifica para una acil-CoA sintasa, una tioesterasa, una éster sintasa, una alcohol aciltransferasa, una alcohol deshidrogenasa, una acil-CoA reductasa, o una acil-CoA reductasa que forma alcohol graso. El gen modificado

puede codificar para una acil-CoA sintasa, una tioesterasa o una éster sintasa. La acil-CoA sintasa y una tioesterasa y/o una éster sintasa pueden modificarse. La célula también puede comprender un gen que codifica para una proteína transportadora.

5 La célula huésped o recombinante de la invención puede ser una célula de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica*, *E. coli*, *Arthrobacter*, *Rhodotorula glutinins*, *Acinetobacter*, *Candida lipolytica*, *Botryococcus braunii*, *Vibrio furnissii*, *Micrococcus leuteus*, *Stenotrophomonas maltophilia* o *Bacillus subtilis*, por ejemplo, una célula de *Arthrobacter AK 19*, *Acinetobacter sp.* cepa M-1, *E. coli* B, *E. coli* C, *E. coli* K o *E. coli* W. En otras realizaciones, la célula recombinante es una célula cianobacteriana, por ejemplo, una célula de *Synechocystis sp.* PCC6803 o *Synechococcus elongatus* PCC7942. En todavía otras realizaciones, la célula recombinante es una célula vegetal, animal o humana. Alternativamente, la célula recombinante es una célula de microorganismo de una bacteria, levadura u hongo filamentoso.

15 Se proporciona una célula recombinante que puede producir un derivado de ácido graso, en la que la célula está modificada para incluir al menos una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica para una enzima de derivado de ácido graso. La secuencia de ácido nucleico exógena puede codificar para una acil-CoA sintasa, una tioesterasa, una éster sintasa, una alcohol aciltransferasa, una alcohol deshidrogenasa, una acil-CoA reductasa o una acil-CoA reductasa que forma alcohol graso. La célula puede modificarse para incluir al menos dos secuencias de ácido nucleico exógenas que codifican para una enzima de derivado de ácido graso, por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico exógena codifica para una acil-CoA sintasa y una segunda secuencia de ácido nucleico exógena codifica para una tioesterasa o una éster sintasa. El gen que codifica para una enzima de derivado de ácido graso puede modificarse para optimizar un codón para su expresión en la célula recombinante.

20 En una realización, la célula recombinante comprende un gen modificado que codifica para una acil-CoA sintasa, tal como *fadD*, *fadk*, *BH3103*, *yhfL*, *Pfl-4354*, *EAV15023*, *fadD1*, *fadD2*, *RPC_4074*, *fadDD35*, *fadDD22*, *faa3p* o el gen que codifica para la proteína ZP_01644857. Ejemplos de los genes de acil-CoA sintasa son *fadDD35* de *M. tuberculosis* HR7Rv [NP_217021], *yhfL* de *B. subtilis* [NP_388908], *fadD1* de *P. aeruginosa* PAO1 [NP_251989], el gen que codifica para la proteína ZP_01644857 de *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3 o *faa3p* de *Saccharomyces cerevisiae* [NP_012257].

25 En una segunda realización, la célula recombinante comprende un gen modificado que codifica para una tioesterasa, tal como *tesA*, *tesA*, *tesB*, *fatB*, *fatB2*, *fatB3*, *fatB* [M141T], *fatA* o *fatA1*.

30 En una tercera realización, la célula recombinante comprende un gen modificado que codifica para una éster sintasa, tal como un gen de éster sintasa obtenido de *Acinetobacter spp.*, *Alcanivorax borkumensis*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens*, *Simmondsia chinensis*, *Mortierella alpina*, *Cryptococcus curvatus*, *Alcanivorax jadensis*, *Alcanivorax borkumensis*, *Acinetobacter sp.* HO1-N o *Rhodococcus opacus*. Los ejemplos de genes de éster sintasa incluyen *wax/dgat*, una éster sintasa/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa bifuncional de *Simmondsia chinensis*, *Acinetobacter sp.* cepa ADP1, *Alcanivorax borkumensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fundibacter jadensis*, *Arabidopsis thaliana* o *Alkaligenes eutrophus*.

35 En una realización, la célula recombinante de la invención comprende además al menos uno de un gen *pdh*, *panK*, *aceEF*, *fabH*, *fabD*, *fabG*, *acpP* y *fabF* que está modificado para expresarse o sobreexpresarse. En una segunda realización, la célula recombinante comprende además al menos uno de un gen de *fadE*, *gpsA*, *ldhA*, *pflB*, *adhE*, *pta*, *poxB*, *ackA* y *ackB* que está modificado de modo que la expresión del gen está atenuada. En una tercera realización, la célula recombinante comprende además al menos un gen modificado de *plsB* y *sfa*.

40 En otras realizaciones, el gen que codifica para una enzima acil-CoA deshidrogenasa está deletado.

Las células recombinantes según la invención producen más acil-CoA con respecto a una célula no recombinante, por ejemplo, una célula no recombinante por lo demás idéntica o una célula de linaje o fenotipo similar.

45 Se proporcionan además composiciones producidas por las células recombinantes dadas a conocer en el presente documento. Las composiciones que comprenden derivados de ácidos grasos producidos a partir de una célula recombinante pueden comprender menos de o igual a aproximadamente 50 ppm de arsénico, aproximadamente 30 ppm, aproximadamente 25 ppm o entre aproximadamente 10-50 ppm de arsénico; menos de o igual a aproximadamente 200 ppm de calcio, aproximadamente 150 ppm de calcio, aproximadamente 119 ppm de calcio o entre aproximadamente 50-200 ppm de calcio; menos de o igual a aproximadamente 200 ppm de cloro, aproximadamente 150 ppm de cloro, aproximadamente 119 ppm de cloro o entre aproximadamente 50-200 ppm de cloro; menos de o igual a aproximadamente 50 ppm de cobre, aproximadamente 30 ppm de cobre, aproximadamente 23 ppm de cobre o entre aproximadamente 10-50 ppm de cobre; menos de o igual a aproximadamente 300 ppm de hierro, aproximadamente 200 ppm de hierro, aproximadamente 136 ppm de hierro o entre aproximadamente 50-250 ppm de hierro; menos de o igual a aproximadamente 50 ppm de plomo, aproximadamente 30 ppm de plomo, aproximadamente 25 ppm de plomo o entre aproximadamente 10-50 ppm de plomo; menos de o igual a aproximadamente 50 ppm de manganeso, aproximadamente 30 ppm de manganeso, aproximadamente 23 ppm de manganeso o entre aproximadamente 10-50 ppm de manganeso; menos de o igual a aproximadamente 50 ppm de magnesio, aproximadamente 30 ppm de magnesio, aproximadamente 23 ppm de

5 magnesio o entre aproximadamente 10-50 ppm de magnesio; menos de o igual a aproximadamente 0,5 ppm de mercurio, aproximadamente 0,1 ppm de mercurio, aproximadamente 0,06 ppm de mercurio o entre aproximadamente 0,01-0,2 ppm de mercurio; menos de o igual a aproximadamente 50 ppm de molibdeno, aproximadamente 30 ppm de molibdeno, aproximadamente 23 ppm de molibdeno o entre aproximadamente 10-50 ppm de molibdeno; menos de o igual a aproximadamente el 2% de nitrógeno; aproximadamente el 1% de nitrógeno, aproximadamente el 0,5% de nitrógeno o entre aproximadamente el 0,1-1% de nitrógeno; menos de o igual a aproximadamente 200 ppm de potasio, aproximadamente 150 ppm de potasio, aproximadamente 103 ppm de potasio o entre aproximadamente 50-200 ppm de potasio; menos de o igual a aproximadamente 300 ppm de sodio, 200 ppm de sodio, aproximadamente 140 ppm de sodio o entre aproximadamente 50-300 ppm de sodio; menos de o igual a aproximadamente 1 ppm de azufre, menos de o igual a aproximadamente el 1% de azufre, aproximadamente el 0,14% de azufre o entre aproximadamente el 0,05-0,3% de azufre; menos de o igual a aproximadamente 50 ppm de zinc, aproximadamente 30 ppm de zinc, aproximadamente 23 ppm de zinc o entre aproximadamente 10-50 ppm de zinc; o menos de o igual a aproximadamente 700 ppm de fósforo, aproximadamente 500 ppm de fósforo, aproximadamente 350 ppm de fósforo o entre aproximadamente 100-700 ppm de fósforo.

20 En un aspecto, la composición producida por una célula recombinante de la invención comprende un ácido graso que tiene un doble enlace en la posición 7 en la cadena de carbono (entre C₇ y C₈) desde el extremo reducido del derivado de ácido graso. En algunas realizaciones, la composición comprende ésteres grasos C₅-C₂₅, o ésteres grasos C₁₀-C₂₀, o ésteres grasos C₁₂-C₁₈. Los derivados de ácidos grasos pueden comprender derivados de ácidos grasos de cadena lineal, derivados de ácidos grasos de cadena ramificada, restos cíclicos. Los derivados de ácidos grasos pueden estar insaturados (por ejemplo, monoinsaturados) o saturados.

25 En otros aspectos, la composición comprende un éster graso que se produce a partir de un alcohol y una acil-CoA, en la que el alcohol tiene al menos aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 10, aproximadamente 12, aproximadamente 14, aproximadamente 16 o aproximadamente 18 carbonos de longitud, y la acil-CoA tiene al menos aproximadamente 2, aproximadamente 4, aproximadamente 6, aproximadamente 8, aproximadamente 10, aproximadamente 12, aproximadamente 14, aproximadamente 16, aproximadamente 18, aproximadamente 20, aproximadamente 22, aproximadamente 24 o aproximadamente 26 carbonos de longitud. En algunas realizaciones, el alcohol y la acil-CoA a partir de los cuales se produce el éster graso varían en aproximadamente 2, aproximadamente 4, aproximadamente 6, aproximadamente 8, aproximadamente 10, aproximadamente 12 o aproximadamente 14 átomos de carbono.

En una realización, la composición producida por una célula recombinante de esta invención tiene una fracción de carbono moderno de aproximadamente 1,003 a aproximadamente 1,5.

35 Se proporciona un método para producir derivados de ácidos grasos en una célula recombinante que comprende a) obtener una célula recombinante; b) cultivar la célula recombinante, y c) producir derivados de ácidos grasos.

40 Se proporciona un método de aumento de la producción de derivados de ácidos grasos en una célula recombinante que comprende introducir un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de derivado de ácido graso en la célula recombinante, y expresar el ácido nucleico exógeno, en el que la expresión del ácido nucleico en la célula recombinante da como resultado un aumento de la producción de derivados de ácidos grasos con respecto a una célula no recombinante, por ejemplo, una célula no recombinante por lo demás idéntica o una célula de linaje o fenotipo similar. El ácido nucleico exógeno puede codificar para una acil-CoA sintasa, una tioesterasa o una éster sintasa. Puede introducirse ácido nucleico exógeno que codifica para una acil-CoA sintasa, una tioesterasa y una éster sintasa en la célula recombinante. Se proporciona un método para aumentar el nivel de producción de derivados de ácidos grasos en una célula recombinante, comprendiendo el método: introducir un constructo de ácido nucleico en una célula huésped, comprendiendo el constructo de ácido nucleico (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una enzima de derivado de ácido graso de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 13, y (b) secuencias reguladoras para la expresión de la secuencia de ácido nucleico; expresar la secuencia de ácido nucleico; y obtener los derivados de ácidos grasos.

50 Se proporciona un constructo recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una enzima de derivado de ácido graso, en el que la secuencia de ácido nucleico está modificada para sobreexpresar el gen que codifica para una enzima de derivado de ácido graso. La secuencia de ácido nucleico puede modificarse para sobreexpresar el gen que codifica para una acil-CoA sintasa, una tioesterasa o una éster sintasa. La secuencia de ácido nucleico puede modificarse para sobreexpresar (1) el gen que codifica para una acil-CoA sintasa, y (2) el gen que codifica para una tioesterasa o una éster sintasa. La secuencia de ácido nucleico está modificada para sobreexpresar el gen que codifica para (1) una acil-CoA sintasa, (2) una tioesterasa, y (3) una éster sintasa. El constructo puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa que está modificada de modo que la expresión de la acil-CoA deshidrogenasa está atenuada. También se proporcionan vectores que comprenden estos constructos recombinantes. El vector puede comprender además un gen estructural que proporciona la selección de células transformadas.

60 Se proporciona un método para aumentar la producción de derivados de ácidos grasos en una célula huésped, que

comprende: transformar la célula huésped con una secuencia de nucleótidos de modo que la célula huésped expresa o sobreexpresa un gen de enzima derivado de ácido graso, en el que la producción de derivados de ácidos grasos en la célula huésped se ha aumentado con respecto a una célula que no se ha transformado. En un método de este tipo, las células huésped pueden recogerse o lisarse para obtener los derivados de ácidos grasos que se han producido. Alternativamente, la célula huésped se transforma con una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína transportadora y la célula huésped libera los derivados de ácidos grasos de manera extracelular.

Se proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una enzima derivado de ácido graso operativamente unida a un promotor que es funcional en una célula huésped, en el que la secuencia de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una acil-CoA sintasa y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para una tioesterasa o éster sintasa. El vector puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína transportadora. La segunda secuencia de ácido nucleico puede codificar para una tioesterasa y el vector puede comprender además una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica para una éster sintasa. El vector puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína transportadora.

Se proporciona un método de producción de derivados de ácidos grasos que comprende: (a) proporcionar una célula huésped que comprende el vector de la invención, y (b) cultivar la célula huésped para producir derivados de ácidos grasos. En algunas realizaciones, se recoge un sobrenadante del cultivo de la célula huésped para obtener los derivados de ácidos grasos que se han producido. También se proporcionan derivados de ácidos grasos producidos mediante tales métodos.

En un aspecto, derivados de ácidos grasos producidos según la invención pueden usarse como composiciones de biocombustible. Los derivados de ácidos grasos pueden usarse como biodiésel, alcohol graso, éster graso, triacilglicérido, gasolina o combustible para motores a reacción.

En otro aspecto, las composiciones producidas por una célula recombinante de la invención comprenden ésteres grasos y ácidos grasos libres. Por ejemplo, en una realización, el porcentaje de ácidos grasos libres en peso es de al menos aproximadamente el 1%, aproximadamente el 2%, aproximadamente el 3%, aproximadamente el 4%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 6%, aproximadamente el 7%, aproximadamente el 8%, aproximadamente el 9%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 20% o aproximadamente el 25%. En otra realización, el porcentaje de ésteres grasos producido en peso es de al menos aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85% o aproximadamente el 90%. En una realización adicional, la razón de ésteres grasos con respecto a ácidos grasos libres es de aproximadamente 10:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 8:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 2:1 o aproximadamente 1:1.

En una realización, la composición producida según la invención incluye un éster graso, en la que el éster graso es al menos uno de: 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, octadecanoato de etilo, o una combinación de los mismos.

En una segunda realización, la composición producida según la invención incluye un ácido graso libre, en la que el ácido graso libre es al menos uno de: ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico, ácido pentadecanoico, ácido cis-9-hexadecenoico, ácido hexadecanoico, ácido cis-11-octadecenoico, o combinaciones de los mismos.

Las composiciones de estas realizaciones también pueden usarse como biocombustibles, por ejemplo, como biodiésel, alcohol graso, éster graso, triacilglicérido, gasolina o combustible para motores a reacción.

En algunas realizaciones, las composiciones dadas a conocer en el presente documento contienen un porcentaje en peso de ácidos grasos libres C_{12} con respecto a los ácidos grasos libres totales de al menos aproximadamente el 5%, el 10% o el 15%. En otras realizaciones, las composiciones dadas a conocer en el presente documento contienen un porcentaje en peso de ácidos grasos libres C_{14} con respecto a los ácidos grasos libres totales de al menos aproximadamente el 20%, el 30% o el 40%. En otras realizaciones, las composiciones dadas a conocer en el presente documento contienen un porcentaje en peso de ácidos grasos libres C_{15} con respecto a los ácidos grasos libres totales de al menos aproximadamente el 1% o el 2%. En otras realizaciones, las composiciones dadas a conocer en el presente documento contienen un porcentaje en peso de ácidos grasos libres C_{16} con respecto a los ácidos grasos libres totales de al menos aproximadamente el 20%, el 30% o el 40%. En otras realizaciones, las composiciones dadas a conocer en el presente documento contienen un porcentaje en peso de ácidos grasos libres C_{18} con respecto a los ácidos grasos libres totales de al menos aproximadamente el 15%, el 20% o el 25%.

En algunas realizaciones, las composiciones dadas a conocer en el presente documento contienen un porcentaje en peso de ésteres grasos C_{12} con respecto a los ésteres grasos totales de al menos aproximadamente el 1%, el 2% o el 3%. En otras realizaciones, las composiciones dadas a conocer en el presente documento contienen un porcentaje en peso de ésteres grasos C_{14} con respecto a los ésteres grasos totales de al menos aproximadamente

el 10%, el 15% o el 20%. En otras realizaciones, las composiciones dadas a conocer en el presente documento contienen un porcentaje en peso de ésteres grasos C₁₆ con respecto a los ésteres grasos totales de al menos aproximadamente el 30%, el 40% o el 50%. En otras realizaciones, las composiciones dadas a conocer en el presente documento contienen un porcentaje en peso de ésteres grasos C₁₈ con respecto a los ésteres grasos totales de al menos aproximadamente el 20%, el 30% o el 40%.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una tabla que identifica diversos genes que pueden sobreexpresarse o atenuarse para aumentar la producción de derivados de ácidos grasos. La tabla también identifica diversos genes que pueden modularse para alterar la estructura del producto de derivado de ácido graso. Algunos de los genes que se usan para alterar la estructura del derivado de ácido graso también aumentarán la producción de derivados de ácidos grasos.

La figura 2 es un diagrama que ilustra la ruta de biosíntesis de FAS.

La figura 3 es un diagrama que ilustra la ruta de beta-oxidación, incluyendo etapas catalizadas por las siguientes enzimas (1) acil-CoA sintasa (EC 6.2.1.-), (2) acil-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.99.3), (3) enoil-CoA hidratasa (EC 4.2.1.17); (4) 3-hidroxi-butiril-CoA epimerasa (EC 5.1.2.3), y (5) 3-cetoacil-CoA tiasa (EC 2.3.1.16). Esta reacción final del ciclo de β -oxidación libera acetil-CoA y un ácido graso acil-CoA dos carbonos más corto, listo para pasar de nuevo por reacciones de β -oxidación.

La figura 4 es un diagrama que ilustra rutas de biosíntesis que producen ésteres grasos dependiendo de los sustratos proporcionados.

La figura 5 es un diagrama que ilustra rutas de biosíntesis que producen alcoholes grasos.

La figura 6 es un diagrama que ilustra rutas de biosíntesis que producen ésteres grasos.

La figura 7 es un gráfico que representa la producción de alcoholes grasos por la cepa, descrita en el ejemplo 5, cotransformada con pCDFDuet-1-fadD-acr1 y plásmidos que contienen diversos genes de tioesterasa. Se identificaron alcoholes grasos C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆ y C₁₈ saturados.

La figura 8 es un gráfico que representa la liberación de alcoholes grasos a partir de la cepa de producción. Aproximadamente el 50% del alcohol graso producido se liberó de las células cuando se hicieron crecer a 37°C.

La figura 9A-D son representaciones gráficas que representan espectros de CG-EM de octanoato de octilo (C₈C₈) producido por un huésped de producción que expresa alcohol acetil transferasa (AATs, EC 2.3.1.84) y huéspedes de producción que expresan éster sintasa (EC 2.3.1.20, 2.3.1.75). La figura 9A es un espectro de CG-EM que muestra extracto de acetato de etilo de la cepa C41 (DE3, Δ fadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B en la que el plásmido pHZ1.43 expresaba éster sintasa de ADP1 (EC 2.3.1.20, 2.3.1.75). La figura 9B es un espectro de CG-EM que muestra extracto de acetato de etilo de la cepa C41 (DE3, Δ fadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B en la que el plásmido pHZ1.43 expresaba SAAT. La figura 9C es un espectro de CG-EM que muestra extracto de acetato de etilo de la cepa C41 (DE3, Δ fadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B en la que el plásmido pHZ1.43 no contenía ADP1 (éster sintasa) ni SAAT. La figura 9D es un espectro de CG-EM que muestra el espectro de masas y el patrón de fragmentación de C₈C₈ producido por C41 (DE3, Δ fadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B en la que el plásmido pHZ1.43 expresaba SAAT.

La figura 10 es un gráfico que representa la distribución de ésteres etílicos preparados cuando se coexpresó la éster sintasa de *A. baylyi* ADP1 (WSadp1) con gen de tioesterasa de *Cuphea hookeriana* en un huésped de producción.

La figura 11 es un gráfico que representa la producción de ésteres etílicos por diversas éster sintasas a 25°C. Los ésteres etílicos se produjeron mediante cepas recombinantes de *E. coli* que portaban diversos genes de éster sintasa. Las cepas recombinantes fueron 1. C41 (DE3, Δ fadE Δ fabR)/pETDuet-1-tesA + pCDFDuet-1-fadD con 1 pHZ1.43; 2. pHZ1.97_377; 3. pHZ1.97_atfA2; 4. pHZ1.97_376; 5. pHZ1.97_atfA1; 6. sin plásmidos (control).

La figura 12 es un gráfico que representa la composición en acilo de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) producidos a partir de diversas cepas de *E. coli*. Las cepas recombinantes son 1. C41. (DE3, Δ fadE Δ fabR)/pETDuet-1-tesA + pCDFDuet-1-fadD con 1 pHZ1.43; 2. pHZ1.97_377; 3. pHZ1.97_atfA2; 4. pHZ1.97_376; 5. pHZ1.97_atfA1; 6. sin plásmidos (control).

La figura 13 es un gráfico que representa la producción de ésteres etílicos por diversas éster sintasas a 37°C. Los ésteres etílicos se produjeron mediante cepas recombinantes de *E. coli* que portaban diversos genes de éster sintasa. Las cepas recombinantes fueron 1. C41 (DE3, Δ fadE Δ fabR)/pETDuet-1-tesA + pCDFDuet-1-fadD con 1 pHZ1.43; 2. pHZ1.97_377; 3. pHZ1.97_atfA2; 4. pHZ1.97_376; 5. pHZ1.97_atfA1; 6. sin plásmidos (control).

La figura 14 es un gráfico que representa concentraciones de ácidos grasos libres (FFA) y ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) producidos a partir de tres colonias individuales de los transformantes, C41 (DE3, Δ fadE Δ fabR)/pETDuet-1-tesA + pCDFDuet-1-fadD + pHZ1.97_atfA2 t. El FFA se convirtió en éster etílico de ácido

graso (FAEE) y se cuantificó mediante CG/EM.

La figura 15 es un diagrama que representa la región de control para FabA y FabB. Los sitios de unión consenso de FadR y FabR se muestran en negrita. Las flechas verticales indican las posiciones en las que pueden realizarse mutaciones para alterar la expresión de *fabA*. La base propuesta para cada posición también se indica mediante los corchetes. Las dos regiones que constituyen las regiones -35 y -10 del promotor de *E. coli* típico se indican mediante los corchetes. También se muestran las mutaciones propuestas que hacen que el promotor esté más cerca de la secuencia de promotor consenso.

La figura 16A y la figura 16B son cromatogramas que representan un análisis de CG/EM. La figura 16A es un cromatograma que representa el extracto de etilo del cultivo de *E. coli* cepa LS9001 transformada con plásmidos pCDFDuet-1-fadD-WSadp1, pETDuet-1-tesA. La figura 16B es un cromatograma que representa hexadecanoato de etilo y oleato de etilo usados como referencia.

La figura 17 es un mapa del plásmido pOP-80.

La figura 18 es SEQ ID NO: 1, la secuencia de ADN completa del plásmido pOP-80.

La figura 19 es SEQ ID NO: 2, la secuencia de ADN para el gen *fadD35* con codones optimizados de *E. coli* (código de registro NP_217021).

La figura 20 es SEQ ID NO: 3, la secuencia de ADN para el gen *fadD1* con codones optimizados de *E. coli* (código de registro NP_251989).

La figura 21 es SEQ ID NO: 4, el cebador BsyhflBspHIF basado en la secuencia de ADN depositada en el NCBI con el código de registro NC_000964.

La figura 22 es SEQ ID NO: 5, el cebador BsyhflEcoR basado en la secuencia de ADN depositada en el NCBI con el código de registro NC_000964.

La figura 23 es SEQ ID NO: 6, la secuencia de ADN para el gen *yhfL* de *Bacillus subtilis*.

La figura 24 es SEQ ID NO: 7, el cebador Scfaa3pPciF basado en la secuencia de ADN depositada en el NCBI con el código de registro NC_001141.

La figura 25 es SEQ ID NO: 8, el cebador Scfaa3pPcil basado en la secuencia de ADN depositada en el NCBI con el código de registro NC_001141.

La figura 26 es SEQ ID NO: 9, la secuencia de ADN para el gen de FAA3 de *Saccharomyces cerevisiae* (NP_012257).

La figura 27 es SEQ ID NO: 10, el cebador Smprk59BspF basado en la secuencia de ADN depositada en el NCBI con el código de registro NZ_AAVZ01000044.

La figura 28 es SEQ ID NO: 11, el cebador Smprk59HindR basado en la secuencia de ADN depositada en el NCBI con el código de registro NZ_AAVZ01000044.

La figura 29 es SEQ ID NO: 12, el cebador PrkBsp.

La figura 30 es SEQ ID NO: 13, la secuencia de ADN que codifica para la proteína ZP_01644857 de *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3.

La figura 31 es SEQ ID NO: 14, la secuencia de proteína de ZP_01644857 de *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 17679.

Abreviaturas y términos

Las siguientes explicaciones de términos y métodos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para guiar a los expertos habituales en la técnica en la práctica de la presente divulgación. Tal como se usan en el presente documento, las formas en singular “un” o “una” o “el/la” incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a “una célula” o a “la célula” incluye una o una pluralidad de tales células. El término “o” se refiere a un único elemento de elementos alternativos mencionados o a una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la frase “actividad tioesterasa o actividad acil-CoA reductasa que forma alcohol graso” se refiere a actividad tioesterasa, actividad acil-CoA reductasa que forma alcohol graso, o una combinación tanto de actividad tioesterasa como de actividad acil-CoA reductasa que forma alcohol graso. Adicionalmente, a lo largo de toda la memoria descriptiva, puede hacerse referencia usando un nombre de enzima o nombre de gen abreviado, pero se entiende que tal nombre de enzima o de gen abreviado representa el género de genes o enzimas. Por ejemplo “*fadD*” se refiere a un gen que codifica para la enzima “FadD”, así como a genes que codifican para acil-CoA sintasa (EC

6.2.1.-). Tales nombres de genes incluyen todos los genes que codifican para el mismo péptido y enzimas homólogas que tienen la misma función fisiológica, y los nombres de enzimas incluyen todos los péptidos que catalizan la misma reacción química fundamental o tienen la misma actividad. La figura 1 proporciona diversos nombres de péptidos y genes abreviados, descripciones de sus actividades y sus números de clasificación de enzimas. Estos pueden usarse para identificar otros miembros de la clase de enzimas que tienen la actividad asociada y sus genes asociados, que pueden usarse para producir derivados de ácidos grasos.

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

Números de registro: Los números de registro a lo largo de esta descripción se derivan de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mantenida por el National Institute of Health, EE.UU. Los números de registro son tal como se proporcionan en la base de datos el 27 de marzo de 2007.

Números de clasificación de enzimas (EC): 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 proporcionados 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. Los números EC son tal como se proporcionan en la base de datos el 27 de marzo de 2007.

Atenuar: Debilitar, reducir o disminuir. En un ejemplo, la sensibilidad de una enzima particular a la inhibición por retroalimentación o inhibición provocada por una composición que no es un producto o un reactante (retroalimentación no específica de la ruta) se reduce de modo que la actividad enzimática no se ve impactada por la presencia de un compuesto. En otro ejemplo, la expresión del gen *fabH* es sensible a la temperatura y su secuencia puede alterarse para disminuir la sensibilidad a fluctuaciones de la temperatura. La expresión del gen *fabH* puede atenuarse cuando se desean aminoácidos ramificados. En otro ejemplo, una enzima que se ha modificado para ser menos activa puede denominarse atenuada.

Una modificación funcional de la secuencia que codifica para una enzima puede usarse para atenuar la expresión de una enzima. Las modificaciones de secuencia pueden incluir, por ejemplo, una mutación, delección o inserción de uno o más nucleótidos en una secuencia génica o una secuencia que controla la transcripción o traducción de una secuencia génica, modificación que da como resultado la reducción o inhibición de la producción del producto génico, o hace que el producto génico no sea funcional. Por ejemplo, la delección funcional de *fabR* en *E. coli* reduce la represión de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos y permite que *E. coli* produzca más ácidos grasos insaturados (UFA). En algunos casos, una delección funcional se describe como una mutación de desactivación.

Hay otros métodos disponibles para atenuar la expresión de una enzima. Por ejemplo, puede lograrse la atenuación modificando la secuencia que codifica para el gen tal como se describió anteriormente; poniendo el gen bajo el control de un promotor menos activo, expresando ARN interferente, ribozimas o secuencias antisentido que seleccionan como diana el gen de interés; cambiando el entorno físico o químico, tal como temperatura, pH o concentración de soluto, de modo que no se obtiene la actividad óptima del gen o producto génico; o mediante cualquier otra técnica conocida en la técnica.

Biocombustible: El término "biocombustible" se refiere a cualquier combustible derivado a partir de biomasa.

La biomasa es un material biológico que puede convertirse en un biocombustible. Una fuente de biomasa a modo de ejemplo es materia vegetal. Por ejemplo puede usarse maíz, caña de azúcar y 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, azúcares).

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. Ejemplos no limitativos de biocombustibles son biodiésel, hidrocarburos (por ejemplo, alcanos, alquenos, alquinos o hidrocarburos aromáticos) y alcoholes derivados de biomasa.

Biodiésel: El biodiésel es un biocombustible. El biodiésel puede ser un sustituto de diésel, que se deriva del 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.

- 5 El biodiésel puede estar compuesto por hidrocarburos o ésteres. En una realización, el biodiésel está compuesto por ésteres grasos, tales como ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) o ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE). En una realización preferida, estos FAME y FAEE están compuestos por restos acilo graso que tienen una longitud de la cadena de carbono de aproximadamente 8-20, 10-18 ó 12-16 carbonos de longitud. Los ésteres grasos usados como biodiésel pueden contener cadenas de carbono que están saturadas o insaturadas.
- 10 Biocrudo: El biocrudo es un biocombustible. Puede usarse biocrudo como sustituto para combustibles a base de petróleo. Además, el biocrudo, como el crudo de petróleo; puede convertirse en otros combustibles, por ejemplo, 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, etc.
- 15 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.
- 20 Fuente de carbono: Generalmente se refiere a un sustrato o compuesto adecuado para usarse como fuente de carbono para el crecimiento de células procariotas o eucariotas 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, gases (por ejemplo, CO y CO₂), etc. 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 etanol, etc., o mezclas de los mismos.
- 25 La fuente de carbono puede ser adicionalmente un producto de fotosíntesis, incluyendo, pero sin limitarse a, glucosa.
- 30 Punto de turbidez de un fluido: La temperatura a la que los sólidos disueltos ya no son completamente solubles, precipitando como una segunda fase dando al fluido una apariencia turbia. Este término es relevante para diversas aplicaciones con diferentes consecuencias.
- 35 En la industria petrolera, el punto de turbidez se refiere a la temperatura por debajo de la cual la cera u otros hidrocarburos pesados cristalizan para dar un aceite crudo, aceite refinado o combustible para formar una apariencia turbia. La presencia de ceras solidificadas influye en el comportamiento de flujo del fluido, la tendencia a obstruir los filtros de combustible/inyectores, etc., la acumulación de cera sobre superficies frías (por ejemplo, incrustación de tuberías o intercambiadores de calor) e incluso las características de emulsión con agua. El punto de turbidez es una indicación de la tendencia del aceite a obstruir filtros u orificios pequeños a temperaturas de funcionamiento frías.
- 40 El punto de turbidez de un tensioactivo no iónico o disolución de glicol es la temperatura a la que la mezcla comienza a separarse en fases y aparecen dos fases, volviéndose por tanto turbia. Este comportamiento es característico de tensioactivos no iónicos que contienen cadenas de polioxietileno, que muestran solubilidad inversa frente al comportamiento de temperatura en agua y por tanto “se separan produciendo turbidez” en algún punto a medida que aumenta la temperatura. Los glicoles que muestran este comportamiento se conocen como “glicoles con punto de turbidez” y se usan como inhibidores de esquistos. El punto de turbidez se ve afectado por la salinidad, siendo generalmente inferior en fluidos más salinos.
- 45 Aditivo de reducción del punto de turbidez: Un aditivo que puede añadirse a una composición para disminuir o reducir el punto de turbidez de una disolución, tal como se describió anteriormente.
- 50 Detectable: Que puede confirmarse su existencia o presencia. Por ejemplo, la producción de un producto a partir de un reactante (por ejemplo, la producción de ácidos grasos C₁₈) es detectable usando los métodos proporcionados a continuación.
- 55 Endógeno: Tal como se usa en el presente documento, con referencia a una molécula de ácido nucleico y una célula o microorganismo particular, “endógeno” se refiere a una secuencia de ácido nucleico o péptido que está en la célula y no se introdujo en la célula usando técnicas de 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 gen 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.
- Éster sintasa: Una éster sintasa es un péptido que puede producir ésteres grasos. Más específicamente, una éster sintasa es un péptido que convierte un tioéster en un éster graso. En una realización preferida, la éster sintasa convierte el tioéster, acil-CoA, en un éster graso.
- En una realización alternativa, una éster sintasa usa un tioéster y un alcohol como sustratos para producir un éster graso. Las éster sintasas pueden usar acil-CoA de cadena corta y larga como sustratos. Además, las éster sintasas

pueden usar alcoholes de cadena corta y larga como sustratos.

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. En la figura 1 se proporcionan números de registro de GenBank a modo de ejemplo.

Exógeno: Tal como se usa en el presente documento, con referencia a una molécula de ácido nucleico y una célula particular, "exógeno" se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico que no se origina a partir de esa célula particular tal como se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, "ADN exógeno" puede referirse a una secuencia de ADN que se insertó dentro de la secuencia de ADN genómico de un microorganismo, o a una secuencia de ácido nucleico extracromosómica que se introdujo en el microorganismo. Por tanto, se considera que una molécula de ácido nucleico que no se produce de manera natural es exógena para una célula una vez que se introduce en la célula. Una molécula de ácido nucleico que se produce de manera natural también puede ser exógena para una célula particular. Por ejemplo, una secuencia codificante completa aislada de una célula DH5alpha de *E. coli* es un ácido nucleico exógeno con respecto a una segunda célula DH5alpha de *E. coli* una vez que se introduce esa secuencia codificante en la segunda célula DH5alpha de *E. coli*, aunque ambas células sean células DH5alpha.

Expresión: El proceso por el cual la información heredable en un gen, tal como la secuencia de ADN, se convierte en un producto génico funcional, tal como proteína o ARN.

Pueden modularse varias etapas en el proceso de expresión génica, incluyendo la etapa de transcripción, la etapa de traducción y la modificación postraduccional de la proteína resultante. La regulación génica da a la célula control sobre su estructura y función, y es la base para la diferenciación celular, morfogénesis y la versatilidad y adaptabilidad de cualquier organismo. La regulación génica también puede servir como sustrato para cambio evolutivo, ya que el control del momento, la ubicación y la cantidad de la expresión génica puede tener un profundo efecto sobre las funciones (acciones) del gen en el organismo.

Los genes expresados incluyen genes que se transcriben para dar ARN mensajero (ARNm) y después se traducen para dar una proteína, así como genes que se transcriben para dar tipos de ARN, tales como ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr) y ARN regulador que no se traducen para dar una proteína.

Éster graso: Un éster graso es un éster. En una realización preferida, un éster graso es cualquier éster compuesto por un ácido graso, por ejemplo un éster de ácido graso.

En una realización, un éster graso contiene 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). En una realización preferida, cuando el éster graso se deriva de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos, al lado A contribuye 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. 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.

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.

En una realización, el éster graso se produce de manera biosintética. En esta realización, 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, y un trifosfato de nucleótido de adenosina (ATP). Un ejemplo de una enzima que produce acil-CoA es acil-CoA sintasa.

Tras activarse el ácido graso, puede transferirse fácilmente a un nucleófilo receptor. Nucleófilos a modo de ejemplo son alcoholes, tioles o fosfatos.

En otra realización, el éster graso puede derivarse de un acil graso-tioéster y un alcohol.

En una realización, el éster graso es una cera. La cera puede derivarse de un alcohol de cadena larga y un ácido

graso de cadena larga. En otra realización, el éster graso es un tioéster de ácido graso, por ejemplo acil graso-coenzima A (CoA). En otras realizaciones, el éster graso es un pantotenato de acilo graso, una acil-proteína portadora de acilo (ACP) o un éster de fosfato graso.

5 Los ésteres grasos tienen muchos usos. Por ejemplo, pueden usarse ésteres grasos como biocombustible o tensioactivo.

Derivado de ácido graso: El término “derivado de ácido graso” incluye productos preparados en parte a partir de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos del organismo huésped de producción. El “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, alcoholes de cadena corta y larga, hidrocarburos, y alcoholes y ésteres grasos, incluyendo ceras, ésteres de ácidos grasos o ésteres grasos.

Enzimas de derivados de ácidos grasos: Todas las enzimas que pueden expresarse o sobreexpresarse en la producción de derivados de ácidos grasos se denominan colectivamente en el presente documento enzimas de derivados de ácidos grasos. Estas enzimas pueden formar parte de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. Los ejemplos no limitativos de derivado de ácido graso sintasas incluyen ácido graso sintasas, tioesterasas, acil-CoA sintasas, acil-CoA reductasas, alcohol deshidrogenasas, alcohol aciltransferasas, acil-CoA reductasa que forma alcohol graso y éster sintasas. Las enzimas de derivados de ácidos grasos 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.

Péptidos que forman alcohol graso: Péptidos que pueden catalizar la conversión de acil-CoA en alcohol graso, incluyendo acil-CoA reductasa que forma alcohol graso (FAR, EC 1.1.1.*), acil-CoA reductasa (EC 1.2.1.50) o alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1). Adicionalmente, un experto habitual en la técnica apreciará que algunos péptidos que forman alcohol graso también catalizarán otras reacciones. Por ejemplo, algunos péptidos de acil-CoA reductasa aceptarán otros sustratos además de ácidos grasos. Por tanto, también se incluyen tales péptidos no específicos. En la técnica se conocen secuencias de ácido nucleico que codifican para péptidos que forman alcohol graso y tales péptidos están disponibles para el público. En la figura 1 se proporcionan números de registro de GenBank a modo de ejemplo.

Fracción de carbono moderno: La fracción de carbono moderno (f_M) se define 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 (en referencia a AD 1950). 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.

Hidrocarburo: incluye compuestos químicos que contienen los elementos carbono (C) e hidrógeno (H). Todos los hidrocarburos consisten en un esqueleto de carbono y átomos de hidrógeno unidos a ese esqueleto. Algunas veces, el término se usa como forma abreviada del término “hidrocarburo alifático”. Hay esencialmente tres tipos de hidrocarburos: (1) hidrocarburos aromáticos, que tienen al menos aproximadamente un anillo aromático; (2) hidrocarburos saturados, también conocidos como alcanos, que carecen de dobles, triples enlaces o enlaces aromáticos; y (3) hidrocarburos insaturados, que tienen uno o más dobles o triples enlaces entre átomos de carbono e incluyen: alquenos (por ejemplo, dienos) y alquinos.

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

En un ejemplo, aislado se refiere a una molécula de ácido nucleico que se produce de manera natural que no es contigua a ninguna de las secuencias a las que es directamente adyacente (es decir, la secuencia en el extremo 5' y la secuencia en el extremo 3') en el genoma que se produce de manera natural del organismo del que se deriva.

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

Molécula de ácido nucleico: Abarca secuencias tanto de ARN como de ADN que incluyen, sin limitación, ADNc, secuencias de ADN genómico y ARNm. El término incluye moléculas de ácido nucleico sintéticas, tales como las

que se sintetizan químicamente o se producen de manera recombinante. La molécula de ácido nucleico puede ser bicatenaria o monocatenaria. Cuando es monocatenaria, la molécula de ácido nucleico puede ser la cadena sentido o la cadena antisentido. Además, una molécula de ácido nucleico puede ser circular o lineal.

5 Operativamente unido: Una primera secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con respecto a la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante si el promotor está en una posición para afectar a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN operativamente unidas son contiguas y pueden agrupar dos regiones que codifican para proteína en el mismo marco de lectura. Las configuraciones de genes separados que
10 están operativamente unidos y se transcriben en tándem como un único ARN mensajero se denominan operones. Colocar genes en estrecha proximidad, por ejemplo en un vector de plásmido, bajo la regulación transcripcional de un único promotor, constituye un operón sintético.

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

20 Sobreexpresar: Cuando un péptido está presente en una concentración mayor en una célula huésped recombinante en comparación con su concentración en una célula huésped no recombinante de la misma especie. La sobreexpresión puede lograrse usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede provocarse sobreexpresión alterando las secuencias de control en la secuencia de ADN genómico de una célula huésped, introduciendo una o más secuencias codificantes en la secuencia de ADN genómico, alterando uno o más genes implicados en la regulación de la expresión génica (por ejemplo, delecionando un gen represor o produciendo un activador activo), amplificando el gen en una ubicación cromosómica (repeticiones en tándem), introduciendo una secuencia de ácido nucleico extracromosómica, aumentando la estabilidad del ARN transcrito mediante introducción de secuencias estabilizantes, y combinaciones de los mismos.

25 Los ejemplos de microorganismos recombinantes que sobreproducen un péptido incluyen microorganismos que expresan secuencias de ácido nucleico que codifican para acil-CoA sintetas (EC 6.2.1.-). Otros ejemplos incluyen microorganismos en los que se han introducido secuencias promotoras exógenas en el sentido de 5' con respecto a la secuencia codificante endógena de un péptido de tioesterasa (EC 3.1.2.-). La sobreexpresión también incluye tasas elevadas de traducción de un gen en comparación con la tasa de traducción endógena para ese gen. En la técnica se conocen bien métodos para someter a prueba la sobreexpresión. Por ejemplo, pueden evaluarse los niveles de ARN transcrito usando rtPCR y pueden evaluarse los niveles de proteína usando análisis en gel de SDS-PAGE.
30

35 Coeficiente de reparto: El coeficiente de reparto, 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 del sistema bifásico descrita en el presente documento, la fase orgánica se forma mediante el derivado de ácido graso 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, el coeficiente de reparto, P, se describe habitualmente como logP. Un compuesto con un logP de 1 se repartirá 10:1 en la fase orgánica. Un compuesto con un logP de -1
40 se repartirá 1:10 en la fase orgánica. Eligiendo un caldo de fermentación y una fase orgánica apropiados, un derivado de ácido graso con un valor de logP alto se separará en la fase orgánica incluso a concentraciones muy bajas en el recipiente de fermentación.

45 Huésped de producción: Un huésped de producción es una célula usada para producir los productos dados a conocer en el presente documento. Tal como se da a conocer en el presente documento, el huésped de producción se modifica para expresar o sobreexpresar genes seleccionados, o tener expresión atenuada, de genes seleccionados. Los ejemplos no limitativos de huéspedes de producción incluyen células vegetales, animales, humanas, de bacterias, levaduras u hongos filamentosos.

50 Promotores y potenciadores: Las señales de control transcripcional en eucariotas comprenden elementos "promotores" y "potenciadores". Los promotores y potenciadores consisten en series cortas de secuencias de ADN que interaccionan específicamente con proteínas celulares implicadas en la transcripción (Maniatis *et al.*, Science 236:1237, 1987). Se han aislado elementos promotores y potenciadores de una variedad de fuentes eucariotas incluyendo genes en células de levaduras, insectos, mamíferos y vegetales. Se han aislado elementos promotores y potenciadores de virus. También se encuentran elementos de control análogos, tales como promotores y potenciadores, en procariontes. La selección de un promotor y potenciador particular depende del tipo de célula
55 usado para expresar la proteína de interés. Algunos promotores y potenciadores eucariotas y procariontes tienen una amplia gama de células huésped de producción mientras que otros son funcionales en un subconjunto limitado de células huésped de producción (véase, por ejemplo, Voss *et al.*, Trends Biochem. Sci., 11:287, 1986; y Maniatis *et al.*, 1987 citado anteriormente).

Los términos "elemento promotor", "promotor" o "secuencia promotora" se refieren a una secuencia de ADN que

funciona como un interruptor que activa la expresión de un gen. Si el gen está activado, se dice que se transcribe o participa en la transcripción. La transcripción implica la síntesis de ARNm a partir del gen. Por tanto, el promotor sirve como elemento regulador transcripcional y también proporciona un sitio para el inicio de la transcripción del gen para dar ARNm.

- 5 Purificado: El término "purificado" se refiere a moléculas que se retiran de su entorno natural mediante, por ejemplo, asilamiento 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 de manera natural. Tal como se usa en el presente documento, el término "purificado" o "purificar" también se refiere a la eliminación de contaminantes de una muestra. Por ejemplo, la eliminación de contaminantes puede dar como resultado un aumento en el porcentaje de derivados de ácidos grasos de interés en una muestra. Por ejemplo, tras expresarse derivados de ácidos grasos en células huésped de producción vegetales, de bacterias, levaduras o mamíferos, se purifican los derivados de ácidos grasos mediante la eliminación de proteínas de la célula huésped de producción. Tras la purificación, aumenta el porcentaje de derivados de ácidos grasos en la muestra.
- 10
- 15 El término purificado no requiere pureza absoluta; en vez de eso, está previsto como un término relativo. Por tanto, por ejemplo, una preparación de derivados de ácidos grasos purificados es una en la que el producto está más concentrado que el producto en su entorno natural dentro de una célula. Por ejemplo, un éster graso purificado es uno que está sustancialmente separado de componentes celulares (por ejemplo, ácidos nucleicos, lípidos, hidratos de carbono y otros péptidos) que pueden acompañarlo. En otro ejemplo, una preparación de éster graso purificado es una en la que el éster graso está sustancialmente libre de contaminantes, tales como los que pueden estar presentes tras la fermentación.
- 20

Por ejemplo, un éster graso está purificado cuando al menos aproximadamente el 50% en peso de una muestra está compuesto por el éster graso. En otro ejemplo cuando al menos aproximadamente el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 92%, el 95%, el 98% o el 99% o más en peso de una muestra está compuesto por el éster graso.

- 25 Recombinante: Una molécula de ácido nucleico recombinante es una que tiene una secuencia que no se produce de manera natural, tiene una secuencia que se prepara mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otro modo, o ambos. Esta combinación artificial puede lograrse, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de moléculas de ácido nucleico, tales como técnicas de modificación por ingeniería genética. También se usa recombinante para describir moléculas de ácido nucleico que se han manipulado artificialmente, pero contienen las mismas secuencias reguladoras y regiones codificantes que se encuentran en el organismo del que se aisló el ácido nucleico. Una proteína recombinante es una proteína derivada de una molécula de ácido nucleico recombinante.
- 30

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

- Identidad de secuencia: La similitud entre dos secuencias de ácido nucleico o entre dos secuencias de aminoácidos se expresa como el nivel de identidad de secuencia compartida entre las secuencias. La identidad de secuencia se expresa normalmente como el porcentaje de identidad. Cuanto mayor es el porcentaje de identidad, más similares son las dos secuencias. Para los fines de esta solicitud, los términos "identidad" y "similitud" sin intercambiables.
- 40

- En la técnica se conocen bien métodos para alinear secuencias para su comparación. Se describen diversos programas y algoritmos de alineación en: Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; 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. Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990, presentan una consideración detallada de métodos de alineación de secuencias y cálculos de homología.
- 45

- La herramienta de búsqueda de alineación local básica del NCBI (BLAST™; Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990) está disponible de diversas fuentes, incluyendo el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD), para su uso en relación con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Puede accederse a BLAST™ en Internet en el sitio web de NCBI. Tal como se usa en el presente documento, la identidad de secuencia se determina comúnmente con el software BLAST™ fijado a los parámetros por defecto. Por ejemplo, puede usarse el software blastn (versión 2.0) para determinar la identidad de secuencia entre dos secuencias de ácido nucleico usando los parámetros por defecto (por ejemplo, esperado = 10, matriz = BLOSUM62, filtro = DUST (Tatusov y Lipmann, en preparación a fecha del 1 de diciembre de 1999; y Hancock y Armstrong, Comput. Appl. Biosci. 10:67-70, 1994), coste por existencia de hueco = 11, coste de hueco por residuo = 1 y razón lambda = 0,85). Para la comparación de dos polipéptidos, puede usarse el software blastp (versión 2.0)
- 50
- 55

con los parámetros por defecto (por ejemplo, esperado = 10, filtro = SEG (Wootton y Federhen, *Computers in Chemistry* 17:149-163, 1993), matriz = BLOSUM62, coste por existencia de hueco = 11, coste de hueco por residuo = 1, $\lambda = 0,85$).

5 Para comparaciones de secuencias de ácido nucleico, se emplea la función "Blast 2 sequences" del programa BLAST™ (Blastn) usando la matriz BLOSUM62 por defecto fijada a los parámetros por defecto (por ejemplo, coste por apertura de un hueco [defecto = 11]; coste por extensión de un hueco [defecto = 1]; valor esperado (E) [defecto = 10,0]; tamaño de palabra [defecto = 11]; número de descripciones de una línea (V) [defecto = 100]; número de alineaciones para mostrar (B) [defecto = 100]). Las secuencias de ácido nucleico con similitud incluso mayor con las secuencias de referencia mostrarán porcentajes de identidad crecientes cuando se evalúan mediante este método, tal como una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 45%, 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 95%, o al menos aproximadamente el 98% o al menos aproximadamente el 99%.

15 Para comparaciones de secuencias de aminoácidos de más de aproximadamente 30 aminoácidos, se emplea la función "Blast 2 sequences" del programa BLAST™ usando la matriz BLOSUM62 por defecto fijada a los parámetros por defecto (por ejemplo, coste por existencia de hueco de 11 y un coste de hueco por residuo de 1). Cuando se alinean péptidos cortos (por ejemplo, de menos de aproximadamente 30 aminoácidos), la alineación debe realizarse usando la función Blast 2 sequences, empleando la matriz PAM30 fijada a los parámetros por defecto (por ejemplo, penalizaciones por apertura de hueco de 9, por extensión de hueco de 1). Las proteínas con una similitud incluso mayor con las secuencias de referencia mostrarán porcentajes de identidad crecientes cuando se evalúan mediante este método, tal como una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 98% o al menos aproximadamente el 99% con las secuencias.

25 Tensioactivos: Sustancias que pueden reducir la tensión superficial de un líquido en el que se disuelven. Están normalmente compuestas por una cabeza soluble en agua y una cola o cadena de hidrocarburo. La cabeza soluble en agua es hidrófila y puede ser o bien iónica o bien no iónica. La cadena de hidrocarburo es hidrófoba. Los tensioactivos se usan en una variedad de productos, incluyendo detergentes y productos de limpieza, y también se usan como agentes adyuvantes para materiales textiles, cuero y papel, en procedimientos químicos, en productos cosméticos y farmacéuticos, en la industria alimentaria y en agricultura. Además, pueden usarse para ayudar en la extracción y el aislamiento de aceites crudos que se encuentran en entornos de difícil acceso o en emulsiones de agua.

30 Hay cuatro tipos de tensioactivos caracterizados por diversos usos. Los tensioactivos aniónicos tienen actividad de tipo detergente y se usan generalmente para aplicaciones de limpieza. Los tensioactivos catiónicos contienen hidrocarburos de cadena larga y con frecuencia se usan para tratar proteínas y polímeros sintéticos o son componentes de suavizantes de tejidos y acondicionadores para el cabello. Los tensioactivos anfóteros también contienen hidrocarburos de cadena larga y se usan normalmente en champús. Los tensioactivos no iónicos se usan generalmente en productos de limpieza.

40 Sintasa: Una sintasa es una enzima que cataliza un proceso de síntesis. Tal como se usa en el presente documento, el término sintasa incluye sintasas y sintetetasas.

45 Proteína transportadora: Una proteína que facilita el movimiento de uno o más compuestos al interior y/o al exterior de un organismo u orgánulo. En algunas realizaciones, una secuencia de ADN exógena que codifica para una proteína transportadora de casete de unión a ATP (ABC) se expresará funcionalmente por el huésped de producción de modo que el huésped de producción exporta el derivado de ácido graso al interior del medio de cultivo. Las proteínas transportadoras de ABC se encuentran en muchos organismos, tales como *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Alcaligenes eutrophus* (posteriormente denominado *Ralstonia eutropha*) o *Rhodococcus erythropolis*. Los ejemplos no limitativos de proteínas transportadoras de ABC incluyen CER5, AtMRP5, AmiS2 y AtPGP1. En una realización preferida, la proteína transportadora de ABC es CER5 (por ejemplo, AY734542).

50 En otras realizaciones, la proteína transportadora es una proteína de eflujo seleccionada de: AcrAB, TolC o AcrEF de *E. coli* o tll1618, tll1619 y tll0139 de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1.

En realizaciones adicionales, la proteína transportadora es una proteína transportadora de ácidos grasos (FATP) seleccionada de *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Mycobacterium tuberculosis* o *Saccharomyces cerevisiae* o cualquiera de las FATP de mamífero bien conocidas en la técnica.

55 En condiciones que permiten la producción de producto: Cualquier condición de fermentación que permite a un huésped de producción producir un producto deseado, tal como acil-CoA o derivados de ácidos grasos tales como 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 en combinación, permite que el huésped de producción crezca.

5 Los medios a modo de ejemplo incluyen caldos o geles. Generalmente, el medio incluye una fuente de carbono, tal como glucosa, fructosa, celulosa, o similares, que puede metabolizarse por el microorganismo directamente. 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.

10 Para determinar si las condiciones de cultivo 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 cultivo permiten 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. Cuando se somete a prueba para detectar la presencia de un producto, pueden usarse ensayos tales como, pero sin limitarse a, CCF, HPLC, CG/FID, CG/EM, CL/EM, EM, así como los proporcionados en los ejemplos a continuación.

15 Vector: Una molécula de ácido nucleico tal como se introduce en una célula, produciendo así una célula transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en la célula, tales como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes de marcadores seleccionables u otros elementos genéticos conocidos en la técnica.

Cera: La cera está compuesta por ésteres grasos. En una realización preferida, el éster graso contiene un lado A y un lado B compuestos por cadenas de carbono de medias a largas.

20 Además de ésteres grasos, una cera puede comprender otros componentes. Por ejemplo, una cera también puede comprender hidrocarburos, ésteres de esteroles, aldehídos alifáticos, alcoholes, cetonas, beta-dicetonas, triacilgliceroles, etc.

Descripción detallada

25 Muchos microorganismos celulares pueden utilizar ácidos grasos como fuentes de energía y, por tanto, contienen rutas de β -oxidación que metabolizan ácidos grasos para producir energía. Sorprendentemente, se encontró que sobreexpresar un péptido que tiene actividad acil-CoA sintasa (la primera actividad enzimática encontrada en la ruta de β -oxidación), y/o atenuar otros genes en la ruta de beta-oxidación, puede aumentar la cantidad de acil-CoA producida, al tiempo que se mantiene la viabilidad de la célula o el microorganismo. De manera similar, sobreexpresar un péptido que tiene actividad acil-CoA sintasa en combinación con la sobreexpresión de péptidos que forman derivados de ácidos grasos puede mejorar la producción de derivados de ácidos grasos.

30 Los derivados de ácidos grasos son útiles como biocombustibles y productos químicos especiales, que pueden usarse para preparar productos adicionales tales como complementos nutricionales, polímeros, sustitutos de parafina y productos para el cuidado personal. Además, las enseñanzas dadas a conocer en el presente documento permiten la producción de derivados de ácidos grasos con puntos de ramificación, niveles de saturación y longitud de la cadena de carbono particulares.

Los ejemplos no limitativos de microorganismos que pueden usarse como huéspedes de producción para producir derivados de ácidos grasos incluyen bacterias, levaduras u hongos filamentosos. Los ejemplos no limitativos adicionales de huéspedes de producción adecuados incluyen células vegetales, animales o humanas.

40 Pueden producirse alcoholes (de cadena corta, de cadena larga, ramificados o insaturados) por los huéspedes de producción descritos en el presente documento. Tales alcoholes pueden usarse como combustibles directamente o pueden usarse para crear un éster graso. Los ésteres grasos, solos o en combinación con otros derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento, son útiles como combustibles.

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

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

I. Producción de derivados de ácidos grasos y modificaciones para aumentar la producción

El huésped de producción usado para producir acil-CoA y/o derivados de ácidos grasos puede modificarse de

manera recombinante para incluir secuencias de ácido nucleico que sobreexpresan péptidos. Por ejemplo, el huésped de producción puede modificarse para aumentar la producción de acil-CoA y reducir el catabolismo de derivados de ácidos grasos y productos intermedios en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos, tales como acil-CoA, o para reducir la inhibición por retroalimentación en puntos específicos en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos.

5 Además de modificar los genes descritos en el presente documento, pueden desviarse recursos celulares adicionales para sobreproducir ácidos grasos, por ejemplo, pueden atenuarse las rutas de lactato, succinato y/o acetato, y puede sobreexpresarse la acetil-CoA carboxilasa (*acc*). Las modificaciones del huésped de producción descritas en el presente documento pueden realizarse mediante alteraciones genómicas, adición de sistemas de expresión recombinante, o combinaciones de los mismos.

10 En la figura 2 a la figura 6 se ilustran las rutas de biosíntesis de ácidos grasos implicadas. Las siguientes subsecciones A-G describen las etapas en estas rutas. Diferentes etapas en la ruta se catalizan por diferentes enzimas. Cada etapa es un posible sitio para la sobreexpresión del gen para producir más enzima y por tanto impulsar la producción de más ácidos grasos y derivados de ácidos grasos. También pueden añadirse de manera recombinante genes que codifican para enzimas requeridas para la ruta en un huésped de producción que carece de tales enzimas. Finalmente, pueden atenuarse o bloquearse etapas que competirían con la ruta que conduce a la producción de ácidos grasos y derivados de ácidos grasos con el fin de aumentar la producción de los productos deseados.

A. De acetil-CoA - malonil-CoA a acil-ACP

20 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 la biosíntesis de ácidos grasos (*fab*) y acetil-CoA carboxilasa (*acc*). Dependiendo del producto deseado, pueden atenuarse o sobreexpresarse uno o más de estos genes (véase la figura 1 para una descripción detallada de la actividad enzimática de cada enzima y su número de clasificación de enzimas).

1. Ruta de biosíntesis de ácidos grasos: de acetil-CoA o malonil-CoA a acil-ACP

30 La ruta de biosíntesis de ácidos grasos en el huésped de producción usa los precursores acetil-CoA y malonil-CoA (figura 1). Las etapas en esta ruta se catalizan por enzimas de las familias de genes de la biosíntesis de ácidos grasos (*fab*) y acetil-CoA carboxilasa (*acc*). Esta ruta se describe en Heath *et al.*, Prog. Lipid Res. 40(6):467-97 (2001).

35 La acetil-CoA se carboxila mediante acetil-CoA carboxilasa (*Acc*, una enzima de múltiples subunidades codificada por cuatro genes separados, *accABCD*), para formar malonil-CoA. El grupo malonato se transfiere a ACP mediante malonil-CoA:ACP transacilasa (*FabD*) para formar malonil-ACP. Entonces se produce una reacción de condensación, en la que malonil-ACP se fusiona con acetil-CoA, dando como resultado β -cetoacil-ACP. β -cetoacil-ACP sintasa III (*FabH*) inicia el ciclo de FAS, mientras que β -cetoacil-ACP sintasa I (*FabB*) y β -cetoacil-ACP sintasa II (*FabF*) están implicadas en ciclos posteriores.

40 A continuación, se repite un ciclo de etapas hasta que se prepara un ácido graso saturado de la longitud apropiada. En primer lugar, se reduce la β -cetoacil-ACP mediante NADPH para formar β -hidroxiacil-ACP. Esta etapa se cataliza por β -cetoacil-ACP reductasa (*FabG*). Entonces se deshidrata β -hidroxiacil-ACP para formar *trans*-2-enoil-ACP. β -hidroxiacil-ACP deshidratasa/isomerasa (*FabA*) o β -hidroxiacil-ACP deshidratasa (*FabZ*) catalizan esta etapa. *Trans*-2-enoil-ACP reductasa I, II o III dependiente de NADPH (*FabI*, *FabK* y *FabL*, respectivamente) reduce *trans*-2-enoil-ACP para formar acil-ACP. Se comienzan ciclos posteriores mediante la condensación de malonil-ACP con acil-ACP mediante β -cetoacil-ACP sintasa I o β -cetoacil-ACP sintasa II (*FabB* y *FabF*, respectivamente).

2. Modificaciones en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos para aumentar la producción de acil-ACP

45 Pueden modificarse por ingeniería genética organismos huésped de producción para sobreproducir acetil-CoA y malonil-CoA. Tales organismos huésped de producción incluyen células vegetales, animales o humanas. Pueden usarse microorganismos tales como bacterias, levaduras u hongos filamentosos como huéspedes de producción. Los ejemplos no limitativos de microorganismos que pueden usarse como huéspedes de producción incluyen *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica*, *E. coli*, *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula glutinins*, *Acinetobacter* sp. cepa M-1, *Candida lipolytica*, y otros microorganismos oleaginosos. Pueden realizarse diversas modificaciones diferentes, o bien en combinación o bien individualmente, en el huésped de producción para obtener producción aumentada de acetil-CoA/malonil-CoA/ácidos grasos y derivados de ácidos grasos.

55 Por ejemplo, para aumentar la producción de acetil-CoA, pueden expresarse uno o más de los siguientes genes en un huésped de producción: *pdh*, *panK*, *aceEF* (que codifica para el componente de deshidrogenasa E1p y el componente de dihidrolipoamida aciltransferasa E2p de los complejos de piruvato y 2-oxoglutarato deshidrogenasa), *fabH*, *fabD*, *fabG*, *acpP*, *fabF*. En otros ejemplos, puede expresarse una secuencia de ADN adicional que codifica para acil graso-CoA reductasas y aldehído descarboxilasas en el huésped de producción. En la técnica se conoce

bien que puede construirse un plásmido que contiene uno o más de los genes mencionados anteriormente, todos bajo el control de un promotor constitutivo, o controlable de otro modo. Números de registro de GenBank a modo de ejemplo para estos genes son: *pdh* (BAB34380, AAC73227, AAC73226), *panK* (también conocido como *coaA*, AAC76952), *aceEF* (AAC73227, AAC73226), *fabH* (AAC74175), *fabD* (AAC74176), *fabG* (AAC74177), *acpP* (AAC74178), *fabF* (AAC74179).

Adicionalmente, los niveles de expresión de *fadE*, *gpsA*, *ldhA*, *pflb*, *adhE*, *pta*, *poxB*, *ackA* y/o *ackB* pueden reducirse o desactivarse 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. Números de registro de GenBank a modo de ejemplo son: *fadE* (AAC73325), *gpsA* (AAC76632), *ldhA* (AAC74462), *pflb* (AAC73989), *adhE* (AAC74323), *pta* (AAC75357), *poxB* (AAC73958), *ackA* (AAC75356) y *ackB* (BAB81430). Los huéspedes de producción modificados por ingeniería genética resultantes tendrán niveles aumentados de producción de acetil-CoA cuando se hacen crecer en un entorno apropiado.

Además, puede afectarse a la sobreproducción de malonil-CoA modificando por ingeniería genética el huésped de producción tal como se describió anteriormente con *accABCD* (por ejemplo, número de registro AAC73296, 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 lipasa (por ejemplo, números de registro: CAA89087, CAA98876) en el plásmido sintetizado *de novo*.

Como resultado, en algunos ejemplos, se sobreexpresa acetil-CoA carboxilasa para aumentar la concentración intracelular de la misma en al menos aproximadamente 2 veces, preferiblemente al menos aproximadamente 5 veces o más preferiblemente al menos aproximadamente 10 veces, con respecto a niveles de expresión nativos.

Además, la mutación D311E de *plsB* (por ejemplo, número de registro AAC77011) puede usarse para aumentar la cantidad de acil-CoA disponible.

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

B. De acil-ACP a ácido graso

1. Ruta de biosíntesis de ácidos grasos: de acil-ACP a ácidos grasos

Tal como se describió anteriormente, se procesan acetil-CoA y malonil-CoA en varias etapas para formar cadenas de acil-ACP. La enzima *sn*-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (PlsB) cataliza la transferencia de un grupo acilo desde acil-ACP o acil-CoA hasta la posición *sn*-1 de glicerol-3-fosfato. Por tanto, PlsB es una enzima reguladora clave en la síntesis de fosfolípidos, que forma parte de la ruta de ácidos grasos. La inhibición de PlsB conduce a un aumento en los niveles de acil-ACP de cadena larga, retroalimentación que inhibirá etapas iniciales en la ruta (por ejemplo, *accABCD*, *fabH* y *fabI*). La separación de esta regulación, por ejemplo mediante sobreexpresión de tioesterasa, conduce a un aumento de la producción de ácidos grasos. Las familias de genes *tes* y *fat* expresan tioesterasa. *FabI* también se inhibe *in vitro* mediante acil-CoA de cadena larga.

2. Modificaciones en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos para producir ácidos grasos deseados

Para modificar por ingeniería genética un huésped de producción para la producción de una población homogénea de derivados de ácidos grasos, puede atenuarse o deleccionarse funcionalmente uno o más genes endógenos y, como resultado, puede expresarse una o más tioesterasas. Por ejemplo, pueden producirse derivados de ácidos grasos C₁₀ atenuando la tioesterasa C₁₈ (por ejemplo, números de registro AAC73596 y P0ADA1), que usa C_{18:1}-ACP, y expresando la tioesterasa C₁₀ (por ejemplo, número de registro Q39513), que usa C₁₀-ACP. Esto da como resultado una población de derivados de ácidos grasos relativamente homogénea que tienen una longitud de la cadena de carbono de 10. En otro ejemplo, pueden producirse derivados de ácidos grasos C₁₄ atenuando tioesterasas endógenas que producen ácidos grasos distintos de C₁₄ y expresando la tioesterasa con número de registro Q39473 (que usa C₁₄-ACP). En aún otro ejemplo, pueden producirse derivados de ácidos grasos C₁₂ expresando tioesterasas que usan C₁₂-ACP (por ejemplo, número de registro Q41635) y atenuando tioesterasas que producen ácidos grasos distintos de C₁₂. Puede verificarse la sobreproducción de acetil-CoA, malonil-CoA y ácido graso usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando precursores radiactivos, HPLC y CG-EM posteriormente a la lisis celular. En la tabla 1 se enumeran ejemplos no limitativos de tioesterasas útiles en los métodos reivindicados y los huéspedes de producción.

Tabla 1: Tioesterasas

Número de registro	Organismo fuente	Gen	Producto producido preferentemente
AAC73596	<i>E. coli</i>	<i>tesA</i> sin secuencia líder	C _{18:1}
AAC73555	<i>E. coli</i>	<i>tesB</i>	

Q41635, AAA34215	<i>Umbellularia californica</i>	<i>fatB</i>	C _{12:0}
Q39513; AAC49269	<i>Cuphea hookeriana</i>	<i>fatB2</i>	C _{8:0} - C _{10:0}
AAC49269; AAC72881	<i>Cuphea hookeriana</i>	<i>fatB3</i>	C _{14:0} - C _{16:0}
Q39473, AAC49151	<i>Cinnamomum camphorum</i>	<i>fatB</i>	C _{14:0}
CAA85388	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>fatB</i> [M141T]*	C _{16:1}
NP 189147; NP 193041	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>fatA</i>	C _{18:1}
CAC39106	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>fatA</i>	C _{18:1}
AAC72883	<i>Cuphea hookeriana</i>	<i>fatA</i>	C _{18:1}
AAL79361	<i>Helianthus annuus</i>	<i>fatA1</i>	

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

C. De ácido graso a acil-CoA

1. Conversión de ácidos grasos en acil-CoA

5 Acil-CoA sintasa (ACS) esterifica ácidos grasos libres para dar acil-CoA mediante un mecanismo de dos etapas. En primer lugar se convierte el ácido graso libre en un producto intermedio de acil-AMP (un adenilato) mediante la pirofosforólisis de ATP. Entonces se acopla el carbono de carbonilo activado del adenilato con el grupo tiol de CoA, liberando AMP y el producto final acil-CoA. Véase Shockey *et al.*, *Plant. Physiol.* 129:1710-1722, 2002.

10 La enzima ACS de *E. coli*, FadD, y la proteína transportadora de ácidos grasos, FadL, son componentes esenciales de un sistema de captación de ácidos grasos. FadL media en el transporte de ácidos grasos al interior de la célula bacteriana, y FadD media en la formación de ésteres de acil-CoA. Cuando no hay ninguna otra fuente de carbono disponible, se captan ácidos grasos exógenos por las bacterias y se convierten en ésteres de acil-CoA, que se unen al factor de transcripción, FadR, y desreprime la expresión de los genes *fad* que codifican para proteínas responsables del transporte (FadL), la activación (FadD) y la β-oxidación (FadA, FadB, FadE y FadH) de ácidos grasos. Cuando están disponibles fuentes de carbono alternativas, las bacterias sintetizan ácidos grasos como acil-ACP, que se usan para la síntesis de fosfolípidos, pero no son sustratos para la β-oxidación. Por tanto, tanto acil-CoA como acil-ACP son fuentes independientes de ácidos grasos que darán como resultado diferentes productos finales. Véase Caviglia *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(12):1163-1169, 2004.

2. Modificaciones para aumentar la conversión de ácidos grasos en acil-CoA

20 Pueden modificarse por ingeniería genética huéspedes de producción usando péptidos conocidos para producir ácidos grasos de diversas longitudes que pueden convertirse en acil-CoA. Un método de preparación de derivados de ácidos grasos implica aumentar la expresión, o expresar formas más activas, de uno o más péptidos de acil-CoA sintasa (EC 6.2.1.-).

25 En la tabla 2 se muestra una lista de acil-CoA sintasas que pueden expresarse para producir acil-CoA y derivados de ácidos grasos. Estas acil-CoA sintasas se examinaron para optimizar cualquier ruta que usa acil graso-CoA como sustratos. Usando bioinformática y genes sintéticos, se expresaron genes *fadD* heterólogos en cepas de producción y se evaluaron para determinar su capacidad para producir biodiésel y potencialmente biocruído.

Tabla 2: Acil-CoA sintasas

Nombre de gen/locus	Fuente	ID de NCBI	% de identidad con FadD de <i>E. coli</i>	% de similitud con FadD de <i>E. coli</i>
<i>fadD</i>	<i>E. coli</i>	NP_416319	-	-
<i>fadK</i>	<i>E. coli</i>	YP_416216	45	27
<i>fadD</i>	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	YP_045024	51	70
<i>fadD</i>	<i>Haemophilus influenzae RdKW20</i>	NP_438551	64	78
BH3103	<i>Bacillus halodurans C-125</i>	NP_243969	40	58
<i>yhfL</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	NP_388908	39	57
Pfl-4354	<i>Pseudomonas fluorescens Pfo-1</i>	YP_350082	52	71
EAV15023	<i>Comamonas testosterone KF-1</i>	ZP_01520072	55	72
<i>fadD1</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NP_251989	54	72
<i>fadD2</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa PAO1</i>	NP_251990	55	72
<i>fadD</i>	<i>Rhizobium etli CFN42</i>	YP_533919	55	72
RPC_4074	<i>Rhodopseudomonas palustris Bis B18</i>	YP_533919	56	72
<i>fadD1</i>	<i>Rasitonia Solanacearum GMI 1000</i>	NP_520978	56	72
<i>fadDD35</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	NP_217021	28	46
<i>fadDD22</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	NP_217464	23	42
PRK0059	<i>Stenotrophomonas Maltophilia R551-3</i>	ZP_01644857	59	75

Basándose en su grado de similitud con FadD de *E. coli*, se seleccionaron los siguientes genes homólogos para sintetizarse y evaluarse:

fadDD35 de *M. tuberculosis* HR7Rv [NP_217021]

yhfL de *B. subtilis* [NP_388908]. *fadD1* de *P. aeruginosa* PAO1 [NP_251989]

5 homólogo de *fadD*, Faa3p de *Saccharomyces cerevisiae* [NP_012257].

10 Ácido graso acil-CoA sintetas adicionales de organismos eucariotas que pueden usarse para producir acil-CoA, así como derivados de ácidos grasos, incluyen aquellas descritas en Shockey *et al.*, Plant. Physiol. 129: 1710-1722, 2002 (*Arabidopsis*), Caviglia *et al.*, J. Biol. Chem. 279: 1163-1169, 2004 (rata), y Knoll *et al.*, J. Biol. Chem. 269(23):16348-56, 1994 (levadura). En la técnica se conocen secuencias génicas que codifican para estas sintetas. Véase, por ejemplo, Johnson *et al.*, J. Biol. Chem. 269: 18037-18046, 1994; Shockey *et al.*, Plant. Physiol. 129: 1710-1722, 2002; Black *et al.*, J. Biol. Chem. 267: 25513-25520, 1992. Estas acil-CoA sintetas eucariotas, a pesar de su falta de alta homología con secuencias de *fadD* de *E. coli*, pueden complementar la actividad FadD en cepas deficientes para *fadD* de *E. coli*.

D. De acil-CoA a alcohol graso

15 1. Conversión de acil-CoA en alcohol graso

Se reduce acil-CoA para dar un aldehído graso mediante acil-CoA reductasa dependiente de NADH (por ejemplo, Acr1). Entonces se reduce el aldehído graso para dar un alcohol graso mediante alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH (por ejemplo, YqhD). Alternativamente, acil-CoA reductasa que forma alcohol graso (FAR) cataliza la reducción de una acil-CoA para dar un alcohol graso y CoASH. FAR usa NADH o NADPH como cofactor en esta reducción de cuatro electrones. Aunque las reacciones de FAR que generan alcohol avanzan a través de un producto intermedio de aldehído, no se libera un aldehído libre. Por tanto, las FAR que forman alcohol son distintas de las enzimas que llevan a cabo reducciones de dos electrones de acil-CoA y proporcionan aldehído graso libre como producto. (Véase Cheng y Russell, J. Biol. Chem., 279(36):37789-37797, 2004; Metz *et al.*, Plant Physiol., 122:635-644, 2000).

25 2. Modificaciones para aumentar la conversión de acil-CoA en alcohol graso

Pueden modificarse por ingeniería genética huéspedes de producción usando polipéptidos conocidos para producir alcoholes grasos a partir de acil-CoA. Un método de preparación de alcoholes grasos implica aumentar la expresión, o expresar formas más activas, de acil-CoA reductasas que forman alcohol graso (codificadas por un gen tal como *acr1* de FAR, EC 1.2.1.50/1.1.1) o acil-CoA reductasas (EC 1.2.1.50) y alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1). En la figura 1 se proporcionan números de registro de GenBank a modo de ejemplo.

Los alcoholes grasos pueden describirse como tensioactivos a base de hidrocarburos. Para la producción de tensioactivos, se modifica el huésped de producción de modo que produce un tensioactivo a partir de una fuente de carbono renovable. Un huésped de producción de este tipo incluye una primera secuencia de ADN exógena que codifica para una proteína que puede convertir un ácido graso en un aldehído graso y una segunda secuencia de ADN exógena que codifica para una proteína que puede convertir un aldehído graso en un alcohol. En algunos ejemplos, la primera secuencia de ADN exógena codifica para un ácido graso reductasa. En una realización, la segunda secuencia de ADN exógena codifica para aldehído reductasa microsomal de mamífero o aldehído deshidrogenasa de cadena larga. En un ejemplo adicional, las secuencias de ADN exógenas primera y segunda son de *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula glutinins*, *Acinetobacter* sp. cepa M-1 o *Candida lipolytica*. En una realización, las secuencias de ADN heterólogas primera y segunda son de un complejo multienzimático de *Acinetobacter* sp. cepa M-1 o *Candida lipolytica*.

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

En un ejemplo, el derivado de ácido graso es un producto de tensioactivo saturado o insaturado que tiene una longitud de la cadena de carbono de aproximadamente 6 a aproximadamente 36 átomos de carbono, de aproximadamente 8 a aproximadamente 30 átomos de carbono, de aproximadamente 10 a aproximadamente 26 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 20 átomos de carbono, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 16 átomos de carbono. En otro ejemplo, el producto de tensioactivo tiene una longitud de la cadena de carbono de aproximadamente 10 a aproximadamente 18 átomos de carbono, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 14 átomos de carbono.

Los huéspedes de producción apropiados para producir tensioactivos pueden ser microorganismos o bien eucariotas o bien procariotas. Los huéspedes de producción a modo de ejemplo incluyen *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula*

5 *glutinins*, *Acinetobacter sp cepa M-1*, *Arabidopsis thaliana*, *Candida lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* y *E. coli* modificados por ingeniería genética para expresar acetil-CoA carboxilasa. También pueden usarse huéspedes de producción que demuestran una capacidad innata para sintetizar altos niveles de precursores de tensioactivos en forma de lípidos y aceites, tales como *Rhodococcus opacus*, *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula glutinins* y *E. coli* modificados por ingeniería genética para expresar acetil-CoA carboxilasa, y otras bacterias oleaginosas, levadura y hongos.

E. De alcoholes grasos a ésteres grasos

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

15 Tal como se usan en el presente documento, los péptidos de alcohol O-acetiltransferasa incluyen péptidos con el número de clasificación de enzimas EC 2.3.1.84, así como cualquier otro péptido que puede catalizar la conversión de acetil-CoA y un alcohol para formar una CoA y un éster. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica apreciará que los péptidos de alcohol O-acetiltransferasa catalizarán otras reacciones.

20 Por ejemplo, algunos péptidos de alcohol O-acetiltransferasa aceptarán otros sustratos además de alcoholes grasos o acetil-CoA-tioéster, tales como otros alcoholes y otros acil-CoA-tioésteres. Por tanto, tales péptidos de alcohol O-acetiltransferasa no específicos o de especificidad divergente también se incluyen. Hay secuencias de péptidos de alcohol O-acetiltransferasa disponibles para el público. En la figura 1 se proporcionan números de registro de GenBank a modo de ejemplo. En la técnica se conocen bien ensayos para caracterizar la actividad de péptidos de alcohol O-acetiltransferasa particulares. Pueden modificarse por ingeniería genética O-acetiltransferasas para tener nuevas actividades y especificidades para el grupo acilo donador o el resto alcohol aceptor. Las enzimas modificadas por ingeniería genética pueden generarse mediante enfoques racionales y evolutivos bien documentados.

F. De acil-CoA a ésteres grasos

30 1. Producción de ésteres grasos

Se sintetizan ésteres grasos mediante acil-CoA:alcohol graso aciltransferasa (por ejemplo, éster sintasa), que conjuga un alcohol graso de cadena larga con una acil graso-CoA mediante una unión éster. Se conocen éster sintasas y genes codificantes a partir de la planta jojoba y la bacteria *Acinetobacter sp. cepa ADP1* (anteriormente *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1). La éster sintasa bacteriana es una enzima bifuncional, que muestra actividad éster sintasa y la capacidad para formar triacilgliceroles a partir de sustratos de diacilglicerol y acil graso-CoAs (actividad acil-CoA:diglicerol aciltransferasa (DGAT)). El gen *wax/dgat* codifica tanto para éster sintasa como para DGAT. Véase Cheng *et al.*, J. Biol. Chem. 279(36):37798-37807, 2004; Kalscheuer y Steinbuchel, J. Biol. Chem. 278:8075-8082, 2003. También pueden usarse éster sintasas para producir determinados ésteres grasos que pueden usarse como combustible, tal como biodiésel, tal como se describe en el presente documento.

40 2. Modificaciones para producir ésteres grasos

La producción de ésteres grasos, incluyendo ceras, a partir de acil-CoA y alcoholes, puede modificarse por ingeniería genética usando polipéptidos conocidos. Un método de preparación de ésteres grasos incluye aumentar la expresión, o expresar formas más activas, de una o más éster sintasas (EC 2.3.1.20, 2.3.1.75). Hay secuencias de péptidos de éster sintasa disponibles para el público. En la figura 1 se proporcionan números de registro de GenBank a modo de ejemplo. En la patente estadounidense n.º 7.118.896 se proporcionan métodos para identificar la actividad éster sintasa.

En ejemplos particulares, si el producto deseado es un biocombustible a base de éster, el huésped de producción se modifica para que produzca un éster generado a partir de una fuente de energía renovable. Un huésped de producción de este tipo incluye una secuencia de ADN exógena que codifica para una éster sintasa que se expresa para conferir a dicho huésped de producción la capacidad de sintetizar un éster graso saturado, insaturado o ramificado a partir de una fuente energía renovable. En algunas realizaciones, el organismo también puede expresar una secuencia de ADN que codifica para las siguientes proteínas a modo de ejemplo: ácido graso elongasas, acil-CoA reductasas, aciltransferasas, éster sintasas, acil graso transferasas, diacilglicerol aciltransferasas, acil-coA cera alcohol aciltransferasas. En una realización alternativa, el organismo expresa una secuencia de ADN que codifica para una éster sintasa/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa bifuncional. Por ejemplo, la éster sintasa/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa bifuncional puede seleccionarse de los complejos multienzimáticos de *Simmondsia chinensis*, *Acinetobacter sp. cepa ADP1* (anteriormente *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1), *Alcanivorax borkumensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fundibacter jadensis*, *Arabidopsis thaliana* o *Alcaligenes eutrophus*

(posteriormente renombrada *Ralstonia eutropha*). En una realización, las ácido graso elongasas, acil-CoA reductasas o cera sintasas son de un complejo multienzimático de *Alcaligenes eutrophus* (posteriormente renombrada *Ralstonia eutropha*) u otros organismos que se sabe en la bibliografía que producen ésteres, tales como cera o ésteres grasos.

5 Las fuentes adicionales de secuencia de ADN heteróloga que codifica para proteínas de síntesis de ésteres útiles en la producción de ésteres grasos incluyen, pero no se limitan a, *Mortierella alpina* (por ejemplo, ATCC 32222), *Cryptococcus curvatus* (también denominada *Apiotricum curvatum*), *Alcanivorax jadensis* (por ejemplo T9T =DSM 12718 =ATCC 700854), *Acinetobacter* sp. HO1-N, (por ejemplo, ATCC 14987) y *Rhodococcus opacus* (por ejemplo, PD630, DSMZ 44193).

10 Los huéspedes de producción útiles para producir ésteres grasos pueden ser microorganismos o bien eucariotas o bien procariotas. Los ejemplos no limitativos de huéspedes de producción para producir ésteres grasos incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica*, *E. coli*, *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula glutinins*, *Acinetobacter* sp. cepa M-1, *Candida lipolytica* y otros microorganismos oleaginosos.

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

Opcionalmente, puede usarse un exportador de ésteres tal como un miembro de la familia de FATP para facilitar la liberación de ésteres al entorno extracelular. Un ejemplo no limitativo de un exportador de ésteres que puede usarse es proteína transportadora de ácidos grasos (cadena larga) CG7400-PA, isoforma A, de *Drosophila melanogaster*, en el locus NP_524723.

G. De acil-ACP, acil-CoA a hidrocarburo

1. Hidrocarburos de microorganismos particulares

25 Se sabe que una diversidad de microorganismos producen hidrocarburos, tales como alcanos, olefinas e isoprenoides. Muchos de estos hidrocarburos se derivan de la biosíntesis de ácidos grasos. La producción de estos hidrocarburos puede controlarse controlando los genes asociados con la biosíntesis de ácidos grasos en los huéspedes de producción nativos.

30 Por ejemplo, la biosíntesis de hidrocarburos en las algas *Botryococcus braunii* se produce mediante la descarboxilación de aldehídos grasos. Los aldehídos grasos se producen mediante la reducción de acil graso-ésteres mediante acil graso-CoA reductasa. Por tanto, la estructura de los alcanos finales puede controlarse modificando por ingeniería genética *B. braunii* para expresar genes específicos, tales como tioesterasas, que controlan la longitud de la cadena de los ácidos grasos que están dirigiéndose a la biosíntesis de alcanos. Expresar las enzimas que dan como resultado la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada en *B. braunii* dará como resultado la producción de alcanos de cadena ramificada. La introducción de genes que afectan a la producción de desaturación de ácidos grasos dará como resultado la producción de olefinas. Combinaciones adicionales de estos genes pueden proporcionar un control adicional sobre la estructura final de los hidrocarburos producidos.

35 Para producir niveles superiores de los hidrocarburos nativos o modificados por ingeniería genética, pueden expresarse, sobreexpresarse o atenuarse los genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos y sus precursores o la degradación para dar otros productos. Cada uno de estos enfoques puede aplicarse a la producción de alcanos en *Vibrio furnissii* M1 y otras cepas de *Vibrio furnissii*, que producen alcanos mediante la reducción de alcoholes grasos. Además de *Vibrio furnissii*, pueden usarse otros organismos productores de alcanos que utilizan la ruta de ácidos grasos.

40 También puede aplicarse cada uno de estos enfoques a la producción de las olefinas producidas por muchas cepas de *Micrococcus leuteus*, *Stenotrophomonas maltophilia* y microorganismos relacionados. Estos microorganismos producen olefinas de cadena larga que se derivan de la condensación cabeza con cabeza de precursores de ácidos grasos. El control de la estructura y el nivel de precursores de ácidos grasos usando los métodos descritos en el presente documento dará como resultado la formación de olefinas de longitud de la cadena, ramificación y niveles de saturación diferentes.

45 También pueden usarse cianobacterias como huéspedes de producción para la producción de derivados de ácidos grasos tales como alcoholes grasos, ésteres grasos e hidrocarburos. Por ejemplo, *Synechocystis* sp. PCC6803 y *Synechococcus elongatus* PCC7942 pueden servir como huéspedes de producción y pueden modificarse por ingeniería genética usando técnicas de biología molecular convencionales (Thiel, Genetic analysis of cyanobacteria, en 1 THE MOLECULAR BIOLOGY OF CYANOBACTERIA, ADVANCES IN PHOTOSYNTHESIS AND RESPIRATION 581-611 (Kluwer Academic Publishers 1994); Koksharova & Wolk, Appl. Microbiol. Biotechnol., 58: 123-137, 2002). Pueden identificarse fácilmente genes de la biosíntesis de ácidos grasos y aislarse en estos organismos (véase la tabla 18).

Además, muchas cianobacterias son productores naturales de hidrocarburos, tales como heptadecano, y por tanto

contienen genes de la biosíntesis de hidrocarburos que pueden desregularse y sobreexpresarse junto con la manipulación de sus genes de la biosíntesis de ácidos grasos para aumentar la producción de hidrocarburos.

Al contrario que otras bacterias, algunas cianobacterias (por ejemplo, *Synechocystis* sp. PCC6803) contienen ácidos grasos poliinsaturados en sus lípidos (Murata, *Plant Cell Physiol.*, 33: 933-941, 1992), y por tanto tienen la capacidad inherente de producir derivados de ácidos grasos poliinsaturados. Lo más importante, las cianobacterias son organismos fotosintéticos que sintetizan todo su carbono celular recogiendo luz solar y fijando dióxido de carbono. Por tanto, los derivados de ácidos grasos producidos en cianobacterias se derivan directamente de CO₂.

2. Hidrocarburos a partir de la reducción de alcoholes primarios

También pueden producirse hidrocarburos usando oxidorreductasas evolucionadas para la reducción de alcoholes primarios. Se conoce usar los alcoholes grasos primarios para producir alcanos en microorganismos, tales como *Vibrio furnissii* M1 (Park, *J. Bacteriol.*, 187:1426-1429, 2005). Un ejemplo de una oxidorreductasa que puede usarse para producir hidrocarburos a partir de alcoholes grasos es oxidorreductasa dependiente de NAD(P)H. Pueden producirse oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H sintéticas mediante el uso de ingeniería genética evolutiva y pueden expresarse en huéspedes de producción para producir derivados de ácidos grasos.

El procedimiento de “hacer evolucionar” una alcohol graso reductasa para que tenga la actividad deseada se conoce bien (Kolkman y Stemmer, *Nat. Biotechnol.* 19:423-8, 2001; Ness *et al.*, *Adv Protein Chem.* 55:261-92, 2000; Minshull y Stemmer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:284-90, 1999; Huisman y Gray, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:352-8, 2002; publicación de patente estadounidense n.º 2006/0195947).

Se genera una biblioteca de oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H mediante métodos convencionales, tales como PCR propensa a errores, mutagénesis al azar específica de sitio, mutagénesis por saturación específica de sitio o mutagénesis específica dirigida al sitio. Adicionalmente, puede crearse una biblioteca mediante el “intercambio” de secuencias que codifican para oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H que se producen de manera natural. Se expresa la biblioteca en un huésped de producción adecuado, tal como *E. coli*. Entonces se analizan colonias individuales que expresan un miembro diferente de la biblioteca de oxidorreductasas para determinar la expresión de una oxidorreductasa que puede catalizar la reducción de un alcohol graso.

Por ejemplo, puede someterse a ensayo cada célula como una bioconversión de células completas, un extracto celular o una célula permeabilizada. También pueden analizarse enzimas purificadas a partir de la célula. Se identifican alcohol graso reductasas mediante monitorización espectrofotométrica o fluorométrica de la oxidación de NAD(P)H dependiente de alcohol graso. Se monitoriza la producción de alcanos mediante CG-EM, CCF u otros métodos.

Se usa una oxidorreductasa identificada de esta manera para producir alcanos, alquenos e hidrocarburos ramificados relacionados. Esto se logra o bien *in vitro* o bien *in vivo*. Esto último se logra expresando el gen de alcohol graso reductasa evolucionado en un organismo que produce alcoholes grasos, tal como los descritos en el presente documento. Los alcoholes grasos actúan como sustratos para la alcohol reductasa, que produce alcanos. También pueden modificarse por ingeniería genética otras oxidorreductasas para catalizar esta reacción, tales como las que usan hidrógeno molecular, glutatión, FADH u otras coenzimas reductoras.

H. Liberación de derivados de ácidos grasos – proteínas transportadoras

Las proteínas transportadoras exportan derivados de ácidos grasos fuera del huésped de producción. Muchas proteínas transportadoras y de eflujo sirven para excretar una gran variedad de compuestos, y naturalmente pueden modificarse para ser selectivas para tipos particulares de derivados de ácidos grasos. Ejemplos no limitativos de proteínas transportadoras adecuadas son proteínas transportadoras de casete de unión a ATP (ABC), proteínas de eflujo y proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP). Los ejemplos no limitativos adicionales de proteínas transportadoras adecuadas incluyen las proteínas transportadoras de ABC de organismos tales como *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Alkaligenes eutrophus*, *Rhodococcus erythropolis*. Proteínas transportadoras de ABC a modo de ejemplo que pueden usarse son CER5, AtMRP5, AmiS2 o AtPGP1. En una realización preferida, la proteína transportadora de ABC es CER5 (por ejemplo, AY734542). Véanse también las proteínas transportadoras identificadas en la figura 1. Pueden insertarse vectores que contienen genes que expresan proteínas transportadoras adecuadas en el huésped de producción de proteínas para aumentar la liberación de derivados de ácidos grasos.

También pueden elegirse huéspedes de producción por su capacidad endógena para liberar derivados de ácidos grasos. La eficacia de la producción y liberación de producto en el 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.

II. Selección de características de la cadena de carbono de derivados de ácidos grasos

Pueden producirse según se desee derivados de ácidos grasos con puntos de ramificación, niveles de saturación, longitud de la cadena de carbono y características de ésteres particulares. Pueden elegirse microorganismos que

producen de manera natural derivados particulares. Alternativamente, pueden insertarse genes que expresan enzimas que producirán derivados de ácidos grasos particulares en el microorganismo huésped de producción. La figura 1 proporciona ejemplos no limitativos de enzimas que pueden usarse solas o en combinación para preparar derivados de ácidos grasos con características deseadas.

5 En algunos ejemplos, puede introducirse la expresión de genes de FAS exógenos que se originan de diferentes especies o variantes modificadas por ingeniería genética en el huésped de producción para dar como resultado la biosíntesis de ácidos grasos que son estructuralmente diferentes (en cuanto a la longitud, ramificación, grado de insaturación, etc.) de los del huésped de producción nativo. Estos productos génicos heterólogos también pueden elegirse o modificarse por ingeniería genética para no verse afectados por los mecanismos reguladores naturales en la célula huésped de producción, y por tanto permitir el control de la producción del producto comercial deseado. Por ejemplo, pueden expresarse las enzimas FAS de *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces* spp., *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Corynebacteria*, *Brevibacteria*, *Mycobacteria*, levadura oleaginosas, y similares, en el huésped de producción. La expresión de tales enzimas exógenas alterará la estructura del ácido graso producido.

15 Cuando se modifica por ingeniería genética un huésped de producción para producir un ácido graso con un nivel de insaturación, ramificación o longitud de la cadena de carbono específicos, el ácido graso modificado por ingeniería genética resultante puede usarse en la producción de derivados de ácidos grasos. Los derivados de ácidos grasos generados a partir de tales huéspedes de producción pueden presentar las características del ácido graso modificado por ingeniería genética.

20 Por ejemplo, puede modificarse por ingeniería genética un huésped de producción para preparar ácidos grasos de cadena corta, ramificados, que entonces pueden usarse por el huésped de producción para producir alcoholes grasos de cadena corta, ramificados. De manera similar, puede producirse un hidrocarburo modificando por ingeniería genética un huésped de producción para producir un ácido graso que tiene un nivel de ramificación, insaturación y/o longitud de la cadena de carbono definidos, produciendo por tanto una población de hidrocarburos homogénea. Pueden emplearse etapas adicionales para mejorar la homogeneidad del producto resultante. Por ejemplo, cuando se desea un alcohol, éster graso o hidrocarburo insaturados, puede modificarse por ingeniería genética el organismo huésped de producción para producir bajos niveles de ácidos grasos saturados y además puede modificarse para expresar una desaturasa adicional y por lo tanto reducir la producción de producto saturado.

A. Restos ramificados y cíclicos

1. Modificación por ingeniería genética de derivados de ácidos grasos ramificados y cíclicos

30 Los ácidos grasos son un producto intermedio clave en la producción de derivados de ácidos grasos. Pueden producirse derivados de ácidos grasos que contienen puntos de ramificación, restos cíclicos y combinaciones de los mismos, usando ácidos grasos ramificados o cíclicos para preparar los derivados de ácidos grasos.

35 Por ejemplo, *E. coli* produce de manera natural ácidos grasos de cadena lineal (sFA). Para modificar por ingeniería genética *E. coli* para producir ácidos grasos de cadena ramificada (brFA), pueden introducirse varios genes que proporcionan precursores ramificados (por ejemplo, operón de *bkd*) en el huésped de producción y expresarse para permitir el inicio de la biosíntesis de ácidos grasos a partir de precursores ramificados (por ejemplo, *fabH*). Las familias de genes de *bkd*, *ilv*, *icm* y *fab* pueden expresarse o sobreexpresarse para producir derivados de ácidos grasos de cadena ramificada. De manera similar, para producir ácidos grasos cíclicos, pueden introducirse genes que proporcionan precursores cíclicos en el huésped de producción y expresarse para permitir el inicio de la biosíntesis de ácidos grasos a partir de precursores cíclicos. Las familias de genes de *ans*, *chc* y *plm* pueden expresarse o sobreexpresarse para producir ácidos grasos cíclicos. La figura 1 menciona ejemplos no limitativos de genes en estas familias de genes que pueden usarse en los presentes métodos y huéspedes de producción.

40 Adicionalmente, puede modificarse por ingeniería genética el huésped de producción para expresar genes que codifican para proteínas para la elongación de brFA (por ejemplo, ACP, FabF, etc.) y/o para delecionar o atenuar los genes de *E. coli* correspondientes que conducen normalmente a sFA. Con respecto a esto, se delecionan o atenúan genes endógenos que competirían con los genes introducidos (por ejemplo, *fabH*, *fabF*).

45 Las acil ramificado-CoA (por ejemplo, 2-metil-butiril-CoA, isovaleril-CoA, isobutiril-CoA, etc.) son los precursores de brFA. En la mayoría de los microorganismos que contienen brFA, los brFA se sintetizan en dos etapas a partir de aminoácidos ramificados (por ejemplo, isoleucina, leucina y valina) (Kadena, Microbiol. Rev. 55:288, 1991). Puede modificarse por ingeniería genética un huésped de producción para expresar o sobreexpresar una o más de las enzimas implicadas en estas dos etapas para producir brFA, o para sobreproducir brFA. Por ejemplo, el huésped de producción puede tener una enzima endógena que puede lograr una etapa que conduce a brFA, por tanto sólo es necesario introducir de manera recombinante genes que codifican para enzimas implicadas en la segunda etapa.

2. Formación de ácidos grasos ramificados y derivados de ácidos grasos ramificados

55 La primera etapa en la formación de brFA es la producción de los α -cetoácidos correspondientes mediante una aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa. Los huéspedes de producción pueden incluir de manera endógena genes que codifican para tales enzimas o tales genes pueden introducirse de manera recombinante. *E.*

coli, por ejemplo, expresa de manera endógena una enzima de este tipo, IlvE (EC 2.6.1.42; registro de GenBank YP_026247). En algunos huéspedes de producción, puede no expresarse una aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa heteróloga. Sin embargo, IlvE de *E. coli* o cualquier otra aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa (por ejemplo, IlvE de *Lactococcus lactis* (registro de GenBank AAF34406), IlvE de *Pseudomonas putida* (registro de GenBank NP_745648) o IlvE de *Streptomyces coelicolor* (registro de GenBank NP_629657)), si no es endógena, puede introducirse. Si la reacción de aminotransferasa es limitadora de la velocidad en la biosíntesis de brFA en el organismo huésped de producción elegido, entonces puede sobreexpresarse la aminotransferasa.

La segunda etapa es la descarboxilación oxidativa de los α -cetoácidos para dar la correspondiente acil de cadena ramificada-CoA. Esta reacción puede catalizarse por un complejo de α -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 α / β (descarboxilasa), E2 (dihidrolipoil transacilasa) y E3 (dihidrolipoil deshidrogenasa). Estos complejos de α -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa son similares a complejos de piruvato y α -cetoglutarato deshidrogenasa. Puede usarse cualquier microorganismo que presente brFA y/o crezca sobre aminoácidos de cadena ramificada como fuente para aislar genes *bkd* para su expresión en huéspedes de producción tales como, por ejemplo, *E. coli*. Además, *E. coli* tiene el componente E3 como parte de su complejo de piruvato deshidrogenasa (*lpd*, EC 1.8.1.4, registro de GenBank NP_414658), por tanto, puede ser suficiente expresar sólo los genes E1 α / β y E2 *bkd*. La tabla 3 menciona ejemplos no limitativos de genes *bkd* de varios microorganismos que pueden introducirse y expresarse de manera recombinante en un huésped de producción para proporcionar precursores de acil de cadena ramificada-CoA. También pueden usarse como huéspedes de producción microorganismos que tienen tales genes *bkd*.

Tabla 3: Genes *bkd* de microorganismos seleccionados

Organismo	Gen	N.º de registro de GenBank
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>bkdA1</i> (E1 α)	NP_628006
	<i>bkdB1</i> (E1 β)	NP_628005
	<i>bkdC1</i> (E2)	NP_638004
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>bkdA2</i> (E1 α)	NP_733618
	<i>bkdB2</i> (E1 β)	NP_628019
	<i>bkdC2</i> (E2)	NP_628018
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>bkdA</i> (E1a)	BAC72074
	<i>bkdB</i> (E1b)	BAC72075
	<i>bkdC</i> (E2)	BAC72076
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>bkdF</i> (E1 α)	BAC72088
	<i>bkdG</i> (E1 β)	BAC72089
	<i>bkdH</i> (E2)	BAC72090
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>bkdAA</i> (E1 α)	NP_390288
	<i>bkdAB</i> (E1 β)	NP_390288
	<i>bkdB</i> (E2)	NP_390288
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>bkdA1</i> (E1 α)	AAA65614
	<i>bkdA2</i> (E1 β)	AAA65615
	<i>bkdC</i> (E2)	AAA65617

En otro ejemplo, puede prepararse isobutiril-CoA en un huésped de producción, por ejemplo en *E. coli*, a través de la coexpresión de una crotonil-CoA reductasa (*ccr*, EC 1.6.5.5, 1.1.1.1) e isobutiril-CoA mutasa (subunidad grande *lcmA*, EC 5.4.99.2; subunidad pequeña *lcmB*, 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 4 se facilitan ejemplos no limitativos de genes *ccr* e *lcm* de microorganismos seleccionados.

Tabla 4: Genes *ccr* e *lcm* de microorganismos seleccionados

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

Además de la expresión de los genes *bkd*, el inicio de la biosíntesis de brFA usa proteína portadora de β -cetoacil-acilo sintasa III (*FabH*, EC 2.3.1.41) con especificidad por acil de cadena ramificada-CoA (Li *et al.*, J. Bacteriol. 187:3795-3799, 2005). En la tabla 5 se enumeran ejemplos no limitativos de enzimas *FabH*. Pueden expresarse en un huésped de producción genes *fabH* que están implicados en la biosíntesis de ácidos grasos de cualquier

microorganismo que contiene brFA. Las enzimas Bkd y FabH de huéspedes de producción que no preparan de manera natural brFA no pueden respaldar la producción de brFA, por tanto, Bkd y FabH pueden expresarse de manera recombinante. Pueden insertarse vectores que contienen los genes *bkd* y *fabH* en un huésped de producción de este tipo. De manera similar, el nivel endógeno de la producción de Bkd y FabH puede no ser suficiente para producir brFA, por tanto, pueden sobreexpresarse. 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 β -cetoacil-acilo sintasa II (*fabF*, EC 2.3.1.41) (en la tabla 5 se enumeran ejemplos no limitativos de candidatos). Además de expresar estos genes, algunos genes en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos endógena pueden atenuarse en el huésped de producción. Pueden atenuarse genes que codifican para enzimas que competirán por el sustrato con las enzimas de la ruta que da como resultado la producción de brFA para aumentar la producción de brFA. Por ejemplo, en *E. coli* los candidatos más probables para interferir con la biosíntesis de brFA son los genes *fabH* (n.º de registro de GenBank NP_415609) y/o *fabF* (n.º de registro de GenBank NP_415613).

Tabla 5: 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>	SmaIDRAFT_0818 (<i>FabH</i>)	ZP_01643059
	SmaIDRAFT_0821 (<i>ACP</i>)	ZP_01643063
	SmaIDRAFT_0822 (<i>FabF</i>)	ZP_01643064
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>fabH</i>	YP_123672
	<i>ACP</i>	YP_123675
	<i>fabF</i>	YP_123676

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

3. Formación de ácidos grasos cíclicos y derivados de ácidos grasos cíclicos

Para convertir un huésped de producción tal como *E. coli* en un organismo que puede sintetizar ácidos grasos ω -cíclicos (cyFA), se introduce un gen que proporciona el precursor cíclico ciclohexilcarbonil-CoA (CHC-CoA) (Cropp *et al.*, Nature Biotech. 18:980-983, 2000) y se expresa en el huésped de producción. Es posible una conversión similar para otros huéspedes de producción, por ejemplo, bacterias, levadura y hongos filamentosos.

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 6 para números de registro de GenBank). Los genes enumerados anteriormente en la tabla 5 pueden expresarse entonces para permitir el inicio y la elongación de ácidos grasos ω -cíclicos. Alternativamente, pueden aislarse los genes homólogos de microorganismos que fabrican cyFA y expresarse en *E. coli*.

Tabla 6: 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>pmlJK</i> <i>pmlL</i> <i>chcA</i> <i>pmlM</i>	AAQ84158 AAQ84159 AAQ84160 AAQ84161
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>chcB/caiD</i>	NP_629292
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>chcB/caiD</i>	NP_629292

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

- Los genes enumerados en la tabla 5 (*fabH*, *ACP* y *fabF*) son suficientes para permitir el inicio y la elongación de ácidos grasos ω -cíclicos porque tienen una amplia especificidad de sustrato. Si la coexpresión de cualquiera de estos genes con los genes *ansJKLM/chcAB* o *pmlJKLM/chcAB* de la tabla 5 no proporciona cyFA, entonces pueden aislarse homólogos de *fabH*, *ACP* y/o *fabF* de microorganismos que fabrican cyFA (por ejemplo, usando cebadores de PCR degenerados o sondas de secuencias de ADN heterólogas) y coexpresarse. La tabla 7 enumera ejemplos no limitativos de microorganismos que contienen ácidos grasos ω -cíclicos.

Tabla 7: Ejemplos no limitativos de microorganismos que contienen ácidos grasos ω -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.

B. Saturación

- Los ácidos grasos son un producto intermedio clave en la producción de derivados de ácidos grasos. El grado de saturación en derivados de ácidos grasos puede controlarse regulando el grado de saturación de los productos intermedios de ácidos grasos. Las familias de genes *sfa*, *gns* y *fab* pueden expresarse o sobreexpresarse para controlar la saturación de ácidos grasos. La figura 1 menciona ejemplos no limitativos de genes en estas familias de genes que pueden usarse en los presentes métodos y huéspedes de producción.
- Pueden modificarse por ingeniería genética huéspedes de producción para producir 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 $\text{cis-}\delta^3$ -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 insaturados (de Mendoza *et al.*, J. Biol. Chem. 258:2098-101, 1983). *fabB* puede insertarse y expresarse en huéspedes de producción que no tienen de manera natural el gen. Estos ácidos grasos insaturados pueden usarse entonces como productos intermedios en huéspedes de producción que se modifican por ingeniería genética para producir derivados de ácidos grasos, tales como alcoholes grasos, ésteres grasos, ceras, olefinas, alcanos, y similares.

- Alternativamente, puede deleccionarse el represor de la biosíntesis de ácidos grasos, por ejemplo, *fabR* (registro de GenBank NP_418398), lo que también dará como resultado un aumento de la producción de ácidos grasos insaturados en *E. coli* (Zhang *et al.*, J. Biol. Chem. 277:15558, 2002). Pueden hacerse delecciones similares en otros huéspedes de producción. Puede lograrse un aumento adicional en ácidos grasos insaturados, por ejemplo, mediante la sobreexpresión de *fabM* (trans-2, cis-3-decenoil-ACP isomerasa, registro de GenBank DAA05501) y la expresión controlada de *fabK* (trans-2-enoil-ACP reductasa II, registro de GenBank NP_357969) a partir de *Streptococcus pneumoniae* (Marrakchi *et al.*, J. Biol. Chem. 277: 44809, 2002), al mismo tiempo que se delecciona *fabI* de *E. coli* (trans-2-enoil-ACP reductasa, registro de GenBank NP_415804). Adicionalmente, para aumentar el porcentaje de ésteres grasos insaturados, el huésped de producción también puede sobreexpresar *fabB* (que codifica para β -cetoacil-ACP sintasa I, registros: BAA16180, EC:2.3.1.41), *sfa* (que codifica para un supresor de *fabA*, registro: AAC44390), y *gnsA* y *gnsB* (que codifican ambos para supresores de mutante nulo de *secG*, (es decir, proteínas de choque frío), registro: ABD18647.1, AAC74076.1). En algunos ejemplos, el gen *fabF* endógeno puede atenuarse, aumentando así el porcentaje de palmitoato ($C_{16:1}$) producido.

C. Longitud de la cadena y características de ésteres

1. Longitud de la cadena y producción de cadenas de número impar

- Los métodos descritos en el presente documento permiten la producción de ésteres grasos y derivados de ácidos grasos de diversas longitudes. La longitud de la cadena se controla mediante tioesterasa, que se produce mediante la expresión de las familias de genes *tes* y *fat*. Expresando tioesterasas específicas, pueden producirse ácidos grasos y derivados de ácidos grasos que tienen una longitud de la cadena de carbono deseada. En la figura 1 se enumeran ejemplos no limitativos de tioesterasas adecuadas. Puede introducirse un gen que codifica para una tioesterasa particular en un huésped de producción de modo que se produce un ácido graso o derivado de ácido

graso con una longitud de la cadena de carbono particular. Entonces debe suprimirse la expresión de tioesterasas endógenas.

5 En una realización, el derivado de ácido graso contiene una cadena de carbono de aproximadamente 4 a 36 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a 32 átomos de carbono, de aproximadamente 10 a 30 átomos de carbono, de aproximadamente 10 a 18 átomos de carbono, de aproximadamente 24 a 32 átomos de carbono, de aproximadamente 26 a 30 átomos de carbono, de aproximadamente 26 a 32 átomos de carbono, de aproximadamente 5 a 10 átomos de carbono, de aproximadamente 10 a 16 átomos de carbono o de aproximadamente 12 a 18 átomos de carbono. En una realización alternativa, el derivado de ácido graso contiene una cadena de carbono de menos de aproximadamente 20 átomos de carbono, menos de aproximadamente 18 átomos de carbono o menos de aproximadamente 16 átomos de carbono. En otra realización, el producto de éster graso es un producto de éster graso saturado o insaturado que tiene un contenido en átomos de carbono de entre 24 y 46 átomos de carbono. En una realización, el producto de éster graso tiene un contenido en átomos de carbono de entre 24 y 32 átomos de carbono. En otra realización, el producto de éster graso tiene un contenido en carbono de 14 y 20 carbonos. En otra realización, el éster graso es el éster metílico de C_{18:1}. En otra realización, el éster graso es el éster etílico de C_{16:1}. En otra realización, el éster graso es el éster metílico de C_{16:1}. En aún otra realización, el éster graso es éster octadecílico de octanol.

Algunos microorganismos producen de manera preferible ácidos grasos y derivados de ácidos grasos con cadenas de carbono en número par o impar. Por ejemplo, *E. coli* produce normalmente ácidos grasos y ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) con cadenas de carbono en número par. Sorprendentemente, los métodos dados a conocer en el presente documento pueden usarse para alterar esa producción. Por ejemplo, puede hacerse que *E. coli* produzca ácidos grasos y FAEE con cadenas de carbono en número impar.

2. Características de ésteres

Un éster incluye lo que puede denominarse un lado "A" y un lado "B". Al lado B puede contribuir un ácido graso producido a partir de síntesis *de novo* en el organismo huésped de producción. En algunas realizaciones en las que el huésped de producción se modifica adicionalmente por ingeniería genética para preparar alcoholes, incluyendo alcoholes grasos, el lado A también lo produce el organismo huésped de producción. En aún otras realizaciones, el lado A puede proporcionarse en el medio. Seleccionando los genes de tioesterasa deseados, el lado B (y el lado A cuando están preparándose alcoholes grasos) puede diseñarse para tener determinadas características de la cadena de carbono. Estas características incluyen puntos de ramificación, insaturación y longitudes de la cadena de carbono deseadas.

Cuando se seleccionan genes de tioesterasa particulares, los lados A y B tendrán características de la cadena de carbono similares cuando el huésped de producción contribuye a ambos usando productos intermedios de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. Por ejemplo, al menos aproximadamente el 50%, el 60%, el 70% o el 80% de los ésteres grasos producidos tendrán lados A y lados B que varían en aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 12 ó 14 carbonos de longitud. El lado A y el lado B también pueden presentar niveles de ramificación y saturación similares.

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

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

Pueden introducirse de manera estable o transitoria secuencias de ADN heterólogas implicadas en una ruta de biosíntesis para la producción de derivados de ácidos grasos en una célula huésped de producción usando técnicas bien conocidas en la técnica (los ejemplos no limitativos incluyen electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas, conjugación, transducción e integración genómica). Para la transformación estable, una secuencia de ADN puede incluir además un marcador seleccionable, incluyendo ejemplos no limitativos tales como resistencia a antibióticos y genes que complementan deficiencias auxotróficas.

Diversas realizaciones de esta divulgación usan un vector de expresión que incluye una secuencia de ADN heteróloga que codifica para una proteína implicada en una ruta metabólica o de biosíntesis. Los vectores de

expresión adecuados incluyen, pero no se limitan a, vectores virales (tales como vectores de baculovirus), vectores de fago (tales como vectores de bacteriófago), plásmidos, fagémidos, cósmidos, fósmodos, cromosomas artificiales bacterianos, vectores virales (por ejemplo, vectores virales basados en virus vaccinia, poliovirus, adenovirus, virus adenoasociado, VS40, virus del herpes simple, y similares), cromosomas artificiales basados en P1, plásmidos de levadura, cromosomas artificiales de levadura, y cualquier otro vector para huéspedes de producción específicos de interés (tales como *E. coli*, *Pseudomonas pisum* y *Saccharomyces cerevisiae*).

Los vectores de expresión útiles pueden incluir uno o más genes de marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped de producción transformadas. El gen de marcador seleccionable codifica para una proteína necesaria para la supervivencia o el crecimiento de células huésped de producción transformadas que se hacen crecer en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped de producción no transformadas con el vector que contiene el gen de marcador seleccionable no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican para proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas (por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina); (b) complementan deficiencias auxotróficas; o (c) suplementan nutrientes críticos no disponibles a partir de los medios complejos (por ejemplo, el gen que codifica para racemato de D-alanina para *Bacilli*). En realizaciones alternativas, el gen de marcador seleccionable es uno que codifica para dihidrofolato reductasa o confiere resistencia a neomicina (para su uso en cultivo de células eucariotas), o uno que confiere resistencia a tetraciclina o ampicilina (para su uso en una célula huésped de producción procarionta, tal como *E. coli*).

En el vector de expresión, la secuencia de ADN que codifica para el gen en la ruta de biosíntesis está operativamente unida a una secuencia de control de la expresión apropiada (promotores, potenciadores, y similares) para dirigir la síntesis del producto génico codificado. Tales promotores pueden derivarse de fuentes microbianas o virales, incluyendo CMV y VS40. Dependiendo del sistema de huésped de producción/vector utilizado, puede usarse cualquiera de varios elementos adecuados de control de la transcripción y traducción en el vector de expresión, incluyendo promotores constitutivos e inducibles, elementos potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, etc. (véase, por ejemplo, Bitter *et al.*, *Methods in Enzymology*, 153:516-544, 1987).

Los promotores adecuados para su uso en células huésped de producción procariontas incluyen; pero no se limitan a, promotores que pueden reconocer las polimerasas de T4, T3, Sp6 y T7, los promotores de P_R y P_L de bacteriófago lambda, los promotores de *trp*, *recA*, choque térmico y *lacZ* de *E. coli*, los promotores específicos de alfa-amilasa y sigma de *B. subtilis*, los promotores de los bacteriófagos de *Bacillus*, promotores de *Streptomyces*, el promotor de *int* de bacteriófago lambda, el promotor de *bla* del gen de beta-lactamasa de pBR322, y el promotor de CAT del gen de cloranfenicol acetil transferasa. Se revisan promotores procariontas por Glick, *J. Ind. Microbiol.* 1:277, 1987; Watson *et al.*, *MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE*, 4^a Ed. (1987), Benjamin Cummins (1987); y Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2^a Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989). Ejemplos no limitativos de promotores eucariotas adecuados para su uso dentro de un huésped de producción eucariota son de origen viral e incluyen el promotor del gen de metalotioneína I de ratón (Hamer *et al.*, *J. Mol. Appl. Gen.* 1:273, 1982); el promotor de TK del virus del herpes (McKnight, *Cell* 31:355, 1982); el promotor temprano de VS40 (Benoist *et al.*, *Nature* (Londres) 290:304, 1981); el promotor de citomegalovirus (Foecking *et al.*, *Gene* 45:101, 1980); el promotor del gen *gal4* de levadura (Johnston *et al.*, *PNAS* (EE.UU.) 79:6971, 1982; Silver *et al.*, *PNAS* (EE.UU.) 81:5951, 1984); y el promotor de IgG (Orlandi *et al.*, *PNAS* (EE.UU.) 86:3833, 1989).

El huésped de producción puede modificarse genéticamente con una secuencia de ADN heteróloga que codifica para un producto génico de la ruta de biosíntesis que está operativamente unido a un promotor inducible. En la técnica se conocen bien los promotores inducibles. Los ejemplos no limitativos de promotores inducibles adecuados incluyen promotores que se ven afectados por proteínas, metabolitos o productos químicos. Estos incluyen, pero no se limitan a: promotor del virus de la leucemia bovina, un promotor de metalotioneína, un promotor de VTMR inducible por dexametasona, un promotor de VS40, un promotor de *poIII* de MRP, un promotor de CMV inducible por tetraciclina (tal como el promotor de CMV inmediato-temprano humano) así como los de operones de *trp* y *lac*.

En algunos ejemplos, se modifica genéticamente un huésped de producción con una secuencia de ADN heteróloga que codifica para un producto génico de la ruta de biosíntesis que está operativamente unido a un promotor constitutivo. En la técnica se conocen promotores constitutivos adecuados e incluyen promotor tardío principal de adenovirus constitutivo, un promotor de VSMP constitutivo o un promotor de CMV constitutivo.

En algunos ejemplos, un huésped de producción modificado es uno que se modifica genéticamente con una secuencia de ADN exógena que codifica para una única proteína implicada en una ruta de biosíntesis. En otras realizaciones, un huésped de producción modificado es uno que se modifica genéticamente con secuencias de ADN exógenas que codifican para dos o más proteínas implicadas en una ruta de biosíntesis, por ejemplo, las enzimas primera y segunda en una ruta de biosíntesis.

Cuando el huésped de producción se modifica genéticamente para expresar dos o más proteínas implicadas en una ruta de biosíntesis, esas secuencias de ADN pueden estar contenidas cada una en un vector de expresión individual o en vectores de expresión separados. Cuando esas secuencias de ADN están contenidas en un vector de expresión individual, en algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos estarán operativamente unidas a un elemento de control común en el que el elemento de control común controla la expresión de todas las secuencias de

ADN que codifican para proteínas de la ruta de biosíntesis en el vector de expresión individual (por ejemplo, un promotor).

5 Cuando se modifica genéticamente un huésped de producción modificado con secuencias de ADN heterólogas que codifican para dos o más proteínas implicadas en una ruta de biosíntesis, una de las secuencias de ADN puede estar operativamente unida a un promotor inducible, y una o más de las secuencias de ADN puede estar operativamente unida a un promotor constitutivo.

10 En algunas realizaciones, la concentración intracelular (por ejemplo, la concentración del producto intermedio en el huésped de producción modificado genéticamente) del producto intermedio de la ruta de biosíntesis puede aumentarse para impulsar adicionalmente el rendimiento del producto final. La concentración intracelular del producto intermedio puede aumentarse de varias maneras, incluyendo, pero sin limitarse a, aumentando la concentración en el medio de cultivo de un sustrato para una ruta de biosíntesis; aumentando la actividad catalítica de una enzima que es activa en la ruta de biosíntesis; aumentando la cantidad intracelular de un sustrato (por ejemplo, un sustrato primario) para una enzima que es activa en la ruta de biosíntesis; y similares.

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

20 Pueden introducirse o alterarse secuencias reguladoras, secuencias codificantes, y combinaciones de las mismas, en el cromosoma del huésped de producción. En algunos ejemplos, la integración de la secuencia recombinante deseada en la secuencia genómica del huésped de producción no requiere el uso de un marcador seleccionable tal como un antibiótico. En algunos ejemplos, las alteraciones genómicas incluyen cambiar la secuencia de control de los genes diana sustituyendo el/los promotor(es) nativo(s) por un promotor que es insensible a la regulación. Hay numerosos enfoques para hacer esto. Por ejemplo, Valle y Flores, *Methods Mol. Biol.* 267:113-122, 2006, describen un método basado en PCR para sobreexpresar genes cromosómicos en *E. coli*. Otro enfoque se basa en el uso de oligonucleótidos monocatenarios para crear mutaciones específicas directamente en el cromosoma, usando la tecnología desarrollada por Court *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100:15748-15753, 2003. Esta tecnología se basa en el uso de la sobreexpresión de la proteína Beta del bacteriófago lambda para potenciar la recombinación genética. Las ventajas de este enfoque son que pueden usarse oligonucleótidos sintéticos de 70 bases de longitud (o más) para crear mutaciones puntuales, inserciones y deleciones, eliminando por tanto cualquier etapa de clonación. Además, el sistema es lo suficientemente eficaz como para que no sean necesarios marcadores para aislar las mutaciones deseadas.

35 Con este enfoque puede cambiarse la región reguladora de un gen para crear un promotor más fuerte y/o eliminar el sitio de unión de un represor. De tal manera, puede sobreexpresarse un gen deseado en el organismo huésped de producción.

IV. Fermentación

A. Maximizar la eficacia de producción

40 La producción y el aislamiento de derivados de ácidos grasos pueden potenciarse empleando técnicas de fermentación específicas. 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 de hidrocarburos.

45 Durante ciclos de vida celulares normales, se usa carbono en funciones celulares, incluyendo 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 productos. Esto puede lograrse haciendo crecer en primer lugar microorganismos hasta una densidad deseada, tal como 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 y Bassler, *Science* 311:1113, 2006; Venturi *FEMS Microbio. Rev.* 30:274-291, 2006; y Reading y Sperandio *FEMS Microbiol. Lett.* 254:1-11, 2006) para activar genes tales como *p53*, *p21* u otros genes de punto de control.

55 Los genes que pueden activarse para detener la replicación y el crecimiento celulares en *E. coli* incluyen genes *umuDC*, cuya sobreexpresión 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* se usan para 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'₂C, UmuD'₂ y UmuD₂. Simultáneamente, pueden activarse genes que producen productos, minimizando así la necesidad de usar rutas de replicación y mantenimiento mientras se prepara el derivado de ácido graso. También

pueden modificarse por ingeniería genética microorganismos huésped de producción 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.

5 El porcentaje de carbonos introducidos convertidos en ésteres grasos o productos de hidrocarburos es un impulsor de coste. Cuanto más eficaz es el proceso (es decir, mayor es el porcentaje de carbonos introducidos convertidos en ésteres grasos o productos de hidrocarburos), 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 ~34% (p/p) (para productos derivados de ácidos grasos). Sin embargo, esta cifra cambia para otros productos de hidrocarburos y fuentes de carbono. Las eficacias típicas en la bibliografía son de aproximadamente <5%. Los huéspedes de producción modificados por ingeniería genética para producir productos de hidrocarburo pueden tener una eficacia de más del 1, el 3, el 5, el 10, el 15, el 20, el 25 y el 30%. En un ejemplo, los huéspedes de producción mostrarán una eficacia de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 25%. En otros ejemplos, tales huéspedes de producción mostrarán una eficacia de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 30%. En otros ejemplos, tales huéspedes de producción mostrarán una eficacia de >30%.

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

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

25 En un ejemplo, la cámara de fermentación encerrará una fermentación que está experimentando una reducción continua. En este caso, se creará un entorno reductor estable. El equilibrio electrónico se mantendrá 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 el huésped de producción 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 potencia la producción de derivados de ácidos grasos.

B. Producción de hidrocarburos a pequeña escala

35 Para la producción de hidrocarburos a pequeña escala, se incuban durante la noche células BL21(DE3) de *E. coli* que albergan pBAD24 (con resistencia a ampicilina y la ruta de síntesis del producto final) así como pUMVC1 (con resistencia a kanamicina y el sistema de sobreexpresión de acetil-CoA/malonil-CoA) en frascos de 2 l a 37°C agitados a > 200 rpm en 500 ml de medio LB complementado con ampicilina 75 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml hasta que los cultivos alcanzan una DO₆₀₀ de > 0,8. Tras lograr una DO₆₀₀ de > 0,8, se complementan las células con propionato de sodio 25 mM (pH 8,0) para activar los sistemas de genes modificados por ingeniería genética para la producción y para detener la proliferación celular activando las proteínas UmuC y UmuD. Se realiza la inducción durante 6 horas a 30°C. Tras la incubación, se examinan los medios para detectar producto de hidrocarburos usando CG-EM.

C. Producción de hidrocarburos a gran escala

45 Para la producción de producto a gran escala, se hacen crecer los huéspedes de producción modificados por ingeniería genética en lotes de 10 l, 100 l o más; se fermentan; y se inducen para expresar productos deseados basándose en los genes específicos codificados en los plásmidos apropiados.

Por ejemplo, se incuban células BL21(DE3) de *E. coli* que albergan pBAD24 (con resistencia a ampicilina y la ruta de síntesis de producto final) así como pUMVC1 (con resistencia a kanamicina y el sistema de sobreexpresión de acetil-CoA/malonil-CoA) a partir de un cultivo simiente de 500 ml para fermentaciones de 10 l (5 l para fermentaciones de 100 l) en medios LB (libres de glicerol) con kanamicina 50 µg/ml y ampicilina 75 µg/ml a 37°C, se agitan a > 200 rpm hasta que los cultivos alcanzan una DO₆₀₀ de > 0,8 (normalmente 16 h). Se complementan de manera continua los medios para mantener propionato de sodio 25 mM (pH 8,0) para activar los sistemas de genes modificados por ingeniería genética para la producción, y para detener la proliferación celular activando las proteínas de *umuC* y *umuD*. Los medios se complementan de manera continua con glucosa para mantener una concentración de 25 g/100 ml.

Tras la primera hora de inducción, se retiran alícuotas de no más del 10% del volumen celular total cada hora y se permite que se asienten sin agitación para permitir que el producto de hidrocarburos suba a la superficie y

experimente una separación de fases espontánea. Entonces se recoge el componente de hidrocarburos, y se devuelve la fase acuosa a la cámara de reacción. La cámara de reacción se hace funcionar de manera continua. Cuando la DO_{600} desciende por debajo de 0,6, se reemplazan las células por un nuevo lote hecho crecer a partir de un cultivo simiente.

- 5 Para la producción de ésteres de cera, se aíslan ésteres de cera, se lavan brevemente en HCl 1 M para dividir el enlace éster, y se devuelven a pH 7 con lavado extenso con agua destilada.

V. Procesamiento tras la producción

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

15 La separación bifásica usa la relativa inmiscibilidad de 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 derivado de ácido graso que está produciéndose tiene un valor de logP alto, el derivado de ácido graso se separará en la fase orgánica, incluso a concentraciones muy bajas en el recipiente de fermentación.

20 Los derivados de ácidos grasos producidos mediante los métodos descritos en el presente documento serán relativamente inmiscibles en el caldo de fermentación, así como en el citoplasma. Por tanto, el derivado de ácido graso se acumulará en una fase orgánica de manera o bien intracelular o bien extracelular. La acumulación de los productos en la fase orgánica reducirá el impacto del derivado de ácido graso sobre la función celular y permitirá que el huésped de producción produzca más producto.

30 Los alcoholes grasos, ésteres grasos, ceras e hidrocarburos producidos tal como se describe en el presente documento permiten la producción de compuestos homogéneos en los que al menos aproximadamente el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 95% de los alcoholes grasos, ésteres grasos y ceras producidos tendrán longitudes de la cadena de carbono que varían en menos de aproximadamente 6, menos de aproximadamente 4 carbonos o menos de aproximadamente 2 carbonos. Estos compuestos también pueden producirse de modo que tengan un grado de saturación relativamente uniforme, por ejemplo al menos aproximadamente el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 95% de los alcoholes grasos, ésteres grasos, hidrocarburos y ceras serán monoinsaturados, diinsaturados o triinsaturados. Estos compuestos pueden usarse directamente como combustibles, aditivos de productos para el cuidado personal o complementos nutricionales. Estos compuestos también pueden usarse como materia prima para reacciones posteriores, por ejemplo, reacciones de transesterificación, hidrogenación, craqueo catalítico (mediante hidrogenación, pirólisis o ambas) o epoxidación para preparar otros productos.

40 Los alcoholes grasos, ésteres grasos, ceras e hidrocarburos producidos tal como se describe en el presente documento contienen bajos niveles de elementos no requeridos o no deseados, incluyendo, pero sin limitarse a, metales pesados. En algunas realizaciones, los alcoholes grasos, ésteres grasos, ceras e hidrocarburos producidos tal como se describe en el presente documento contendrán menos de aproximadamente 50 ppm de arsénico; menos de aproximadamente 300 ppm de calcio; menos de aproximadamente 200 ppm de cloro; menos de aproximadamente 50 ppm de cobalto; menos de aproximadamente 50 ppm de cobre; menos de aproximadamente 300 ppm de hierro; menos de aproximadamente el 2% en peso de agua; menos de aproximadamente 50 ppm de plomo; menos de aproximadamente 50 ppm de manganeso; menos de aproximadamente 0,2 ppm de mercurio; menos de aproximadamente 50 ppm de molibdeno; menos de aproximadamente el 1% en peso de nitrógeno; menos de aproximadamente 200 ppm de potasio; menos de aproximadamente 300 ppm de sodio; menos de aproximadamente el 3% en peso de azufre; menos de 50 ppm de zinc; o menos de 700 ppm de fósforo.

50 En algunas realizaciones, los alcoholes grasos, ésteres grasos, ceras e hidrocarburos producidos tal como se describe en el presente documento contendrán entre aproximadamente el 50% y aproximadamente el 90% de carbono; entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 25% de hidrógeno; o entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 25% de oxígeno. En otras realizaciones, los alcoholes grasos, ésteres grasos, ceras e hidrocarburos producidos tal como se describe en el presente documento contendrán entre aproximadamente el 65% y aproximadamente el 85% de carbono; entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 15% de hidrógeno; o entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 20% de oxígeno.

VI. Composiciones de combustible

55 Los derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento pueden usarse como combustible. Un experto habitual en la técnica apreciará que, dependiendo del propósito previsto del combustible, pueden producirse y usarse diferentes derivados de ácidos grasos. Por ejemplo, un derivado de ácido graso ramificado puede ser

deseable como combustible para automóviles que está previsto usarse en climas fríos.

Usando los métodos descritos en el presente documento, pueden producirse combustibles que comprenden derivados de ácidos grasos relativamente homogéneos que tienen cualidades para combustible deseadas. Tales combustibles a base de derivados de ácidos grasos pueden caracterizarse por la huella de carbono, y su falta de impurezas en comparación con combustibles derivados de petróleo o biodiésel derivado de triglicérido. Los combustibles a base de derivados de ácidos grasos también pueden combinarse con otros combustibles o aditivos para combustibles para producir combustibles que tienen propiedades deseadas.

Los huéspedes y métodos de producción dados a conocer en el presente documento pueden usarse para producir ácidos grasos libres y ésteres grasos. En algunas realizaciones, el porcentaje de ácidos grasos libres en el producto producido por el huésped de producción es de al menos aproximadamente el 1%, 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%. En algunas realizaciones, el porcentaje de ésteres grasos en el producto producido por el huésped de producción es de al menos aproximadamente el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85% o el 90%. En algunas realizaciones, la razón de ésteres grasos con respecto a ácidos grasos libres en el producto producido por el huésped de producción es de aproximadamente 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 5:1, 2:1 ó 1:1. En otras realizaciones, el éster graso producido por el huésped de producción es 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, octadecanoato de etilo o combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el ácido graso libre producido por el huésped de producción es ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico, ácido pentadecanoico, ácido *cis*-9-hexadecenoico, ácido hexadecanoico, ácido *cis*-11-octadecenoico, o combinaciones de los mismos.

A. Huella de carbono

Los derivados de ácidos grasos producidos biológicamente representan una nueva fuente de combustibles, tales como alcoholes, diésel y gasolina. Algunos biocombustibles preparados usando derivados de ácidos grasos no se han producido a partir de fuentes renovables y son composiciones de materia nuevas. Estos combustibles nuevos pueden distinguirse de 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, en particular, véase de la columna 4, línea 31 a la columna 6, línea 8).

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

Los derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento tienen utilidad en la producción de biocombustibles y productos químicos. Los nuevos productos basados en derivados de ácidos grasos proporcionados por la presente invención pueden distinguirse adicionalmente 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 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.

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 azúcares y materiales celulósicos) en la composición. En otros ejemplos, la composición de biocombustible incluye un derivado de ácido graso que tiene la fórmula:



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

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

n es un número entero de desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 34, preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 24; y

R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se seleccionan independientemente de H o un alquilo inferior.

Normalmente, cuando R es un grupo alifático inferior, R representa un resto alqueno inferior o alquilo inferior ramificado, no ramificado o cíclico. Los grupos R a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, ciclopentenilo y similares. El derivado de ácido graso se caracteriza adicionalmente por tener

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 ó 1,5.

5 B. Impurezas

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

Los biocombustibles de derivados de ácidos grasos crudos descritos en el presente documento (antes de mezclar el derivado de ácido graso con otros combustibles tales como combustibles a base de petróleo) contendrán menos catalizador de transesterificación que el diésel petroquímico o el biodiésel. Por ejemplo, el derivado de ácido graso puede contener menos de aproximadamente el 2%, el 1,5%, el 1,0%, el 0,5%, el 0,3%, el 0,1%, el 0,05% o el 0% de un catalizador de transesterificación o una impureza que resulta de un catalizador de transesterificación.

Los ejemplos no limitativos de catalizadores de transesterificación incluyen catalizadores de hidróxido, tales como NaOH, KOH y LiOH; y catalizadores ácidos, tales como catalizadores de ácido mineral y catalizadores de ácido de Lewis. Los ejemplos no limitativos de catalizadores e impurezas que resultan de catalizadores de transesterificación incluyen estaño, plomo, mercurio, cadmio, zinc, titanio, zirconio, hafnio, boro, aluminio, fósforo, arsénico, antimonio, bismuto, calcio, magnesio, estroncio, uranio, potasio, sodio, litio y combinaciones de los mismos.

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

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

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

35 C. Aditivos

Se usan aditivos para combustibles para potenciar el rendimiento de un combustible o motor. Por ejemplo, pueden usarse aditivos para combustibles para alterar el punto de congelación/gelificación, el punto de turbidez, la lubricidad, la viscosidad, la estabilidad oxidativa, la calidad de ignición, el nivel de octanos y el punto 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 para el público poniéndose en contacto con la EPA o consultando el sitio web de la agencia. Un experto habitual en la técnica apreciará que los derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento pueden mezclarse con uno o más aditivos para combustibles para conferir una calidad deseada.

Los derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento pueden mezclarse con otros combustibles tales como biodiésel derivado de triglicéridos, diversos alcoholes tales como etanol y butanol, y productos derivados de petróleo tales como gasolina o diésel.

En algunos ejemplos, se produce un derivado de ácido graso con un punto de gelificación bajo, tal como éster etílico $\text{C}_{16:1}$ o un éster etílico $\text{C}_{18:1}$. Este derivado de ácido graso con punto gelificación bajo puede mezclarse con biodiésel preparado a partir de triglicéridos para reducir el punto de gelificación del combustible resultante en comparación con el biodiésel preparado a partir de triglicéridos. De manera similar, puede mezclarse un derivado de ácido graso, tal como éster etílico $\text{C}_{16:1}$ o éster etílico $\text{C}_{18:1}$, con diésel derivado de petróleo para proporcionar una mezcla que contiene al menos aproximadamente el, y con frecuencia más del, 5% en peso de biodiésel. En algunos ejemplos, la mezcla incluye al menos aproximadamente el 10%, el 15%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60% en peso del derivado de ácido graso.

Por ejemplo, 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 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% o 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.

Ejemplos

Los ejemplos que siguen ilustran la modificación por ingeniería genética de huéspedes de producción para producir derivados de ácidos grasos específicos. La ruta de biosíntesis implicada en la producción de derivados de ácidos grasos se ilustra en las figuras.

Por ejemplo, la figura 1 es un diagrama de la ruta de FAS que muestra las enzimas implicadas directamente en la síntesis de acil-ACP. Para aumentar la producción de derivados de ácidos grasos, tales como ceras, ésteres grasos, alcoholes grasos e hidrocarburos, pueden sobreexpresarse o mutarse una o más de las enzimas en la figura 1 para reducir la inhibición por retroalimentación para aumentar la cantidad de acil-ACP producida. Adicionalmente, las enzimas que metabolizan los productos intermedios para preparar productos no a base de ácidos grasos (reacciones secundarias) pueden deleccionarse o atenuarse funcionalmente para aumentar el flujo de carbono a través de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. En los ejemplos a continuación, se describen muchos huéspedes de producción que se han modificado para aumentar la producción de ácidos grasos.

La figura 4, la figura 5 y la figura 6 muestran rutas de biosíntesis que pueden modificarse por ingeniería genética para preparar alcoholes grasos y ésteres grasos, respectivamente. Tal como se ilustra en la figura 5, la conversión de cada sustrato (por ejemplo, acetil-CoA, malonil-CoA, acil-ACP, ácido graso y acil-CoA) en cada producto (por ejemplo, acetil-CoA, malonil-CoA, acil-ACP, ácido graso y acil-CoA) puede lograrse usando varios polipéptidos diferentes que son miembros de las clases de enzimas indicadas.

Los ejemplos a continuación describen microorganismos que se han modificado por ingeniería genética o pueden modificarse por ingeniería genética para producir alcoholes grasos, ceras, ésteres grasos e hidrocarburos específicos.

Ejemplo 1. Construcción de huéspedes de construcción

Un huésped de producción a modo de ejemplo es LS9001. LS9001 se produjo modificando C41(DE3) de Over-express.com (Saint Beausine, Francia) para desactivar el gen *fadE* (acil-CoA deshidrogenasa).

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

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

Las modificaciones adicionales que se incluyeron en un huésped de producción incluyen las siguientes: sobreexpresión de *aceEF* (que codifica para el componente de deshidrogenasa E1p y el componente de dihidrolipoamida aciltransferasa E2p de los complejos de piruvato y 2-oxoglutarato deshidrogenasa); y *fabH/fabD/fabG/acpP/fabF* (que codifica para FAS) de *E. coli*, *Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718), *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces spp*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Corynebacteria*, *Brevibacteria*, *Mycobacteria* y levadura oleaginosas. De manera similar, se modificaron por ingeniería genética huéspedes de producción para expresar *accABCD* (que codifica para acetil co-A carboxilasa) de *Pisum sativum*. Sin embargo, cuando el huésped de producción también produce butanol, es menos deseable que se exprese el homólogo de *Pisum sativum*.

En algunos huéspedes de producción, se desactivaron o atenuaron genes usando el método de Link, *et al.*, J. Bacteriol. 179:6228-6237, 1997. Los genes que se desactivaron o atenuaron incluyen *gpsA* (que codifica para sn-glicerol 3-fosfato deshidrogenasa biosintética, registro NP_418065, EC: 1.1.1.94); *ldhA* (que codifica para lactato deshidrogenasa, registro NP_415898, EC: 1.1.1.28); *pflb* (que codifica para formiato acetiltransferasa 1, registros: P09373, EC: 2.3.1.54); *adhE* (que codifica para alcohol deshidrogenasa, registros: CAA47743, EC: 1.1.1.1, 1.2.1.10); *pta* (que codifica para fosfotransacetilasa, registros: NP_416800, EC: 2.3.1.8); *poxB* (que codifica para

piruvato oxidasa, registros: NP_415392, EC: 1.2.2.2); *ackA* (que codifica para acetato cinasa, registros: NP_416799, EC: 2.7.2.1) y combinaciones de los mismos.

De manera similar, se introdujo la mutación PlsB[D311E] en LS9001 para atenuar *plsB* usando el método descrito en el ejemplo 1 para la delección de *fadE*. Esta mutación disminuyó la cantidad de carbono desviada a la producción de fosfolípidos (véase la figura 1). Se preparó un alelo que codifica para PlsB[D311E] reemplazando el codón GAC para aspartato 311 por un codón GAA para glutamato. Se preparó el alelo alterado mediante síntesis génica y se intercambié el alelo silvestre *plsB* cromosómico por el alelo *plsB*[D311E] mutante usando el método de *Link et al.* (véase anteriormente).

Para la producción comercial de derivados de ácidos grasos por medio de fermentación, se optimizaron las rutas reguladoras internas de huéspedes de producción para producir más de los productos deseados. En muchos casos, esta regulación se disminuyó sobreexpresando determinadas enzimas. Se muestran algunos ejemplos en la tabla 8.

Tabla 8: Genes adicionales que pueden optimizarse para la producción de derivados de ácidos grasos

Actividad enzimática	Número EC	Ejemplo de gen(es) de <i>E. coli</i> (u otro microorganismo)
Panteteína-fosfato adenililtransferasa	2.7.7.3	<i>coaD</i>
Defosfo-CoA cinasa	2.7.1.24	<i>coaE</i>
Biotina-[acetil-CoA-carboxilasa] ligasa	6.3.4.15	<i>birA</i>
Anhidrasa carbónica	4.2.1.1	<i>cynT</i> , <i>can(yadF)</i>
Apo-[proteína portadora de acilo]	Ninguno	<i>acpP</i>
Holo-[proteína portadora de acilo] sintasa	2.7.8.7	<i>acpS</i> , <i>acpT</i>
Complejo de piruvato deshidrogenasa	1.2.4.1.	<i>aceF</i>
	2.3.1.12	<i>aceE</i>
	1.8.1.4	<i>lpd</i>
NAD cinasa	2.7.1.23	<i>nadK (yfbB)</i>
Piruvato-ferredoxina oxidorreductasa	1.2.7.1	<i>porA (Desulfovobrio vulgaris DP4)</i>

Ejemplo 2. Modificaciones de huéspedes de producción

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

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

Tabla 9: Resumen de plásmidos usados en huéspedes de producción

Plásmido	Organismo fuente Producto génico	N.º de registro, número EC
pETDuet-1-tesA	<i>E. coli</i> TesA	registros: NP_415027, EC: 3.1.1.5, 3.1.2.-
pETDuet-1-TEuc pBluescript-TEuc pMAL-c2X-TEuc	<i>Umbellularia californica</i> UcFatB1	Q41635 AAA34215
pETDuet-1-TEch pBluescript-TEch pMAL-c2X-TEch	<i>Cuphea hookeriana</i> ChFatB2 ChFatB3	ABB71581 AAC49269 AAC72881
pETDuet-1-TEcc pBluescript-TEcc TEci	<i>Cinnamomum camphorum</i> CcFabB	AAC49151

pETDuet-1-atFatA3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_189147
pETDuet-1-HaFatA1	<i>Helianthus annuus</i>	AAL769361
pCDFDuet-1-fadD-acr1	<i>E. coli</i>	fadD:registros NP_416319, EC 6.2.1.3 acr1:registros YP_047869
pETDuet-1-tesA	<i>E. coli</i> TesA	registros: NP_415027, EC: 3.1.1.5, 3.1.2.-
pETDuet-1-TEuc pBluescript-TEuc pMAL-c2X-TEuc	<i>Umbellularia californica</i> UcFatB1	Q41635 AAA34215
pETDuet-1-TEch pBluescript-TEch pMAL-c2X-TEch	<i>Cuphea hookeriana</i> ChFatB2 ChFatB3	ABB71581 AAC49269 AAC72881
pETDuet-1-TEcc pBluescript-TEcc TEci	<i>Cinnamomum camphorum</i> CcFatB	AAC49151
pCDFDuet-1-fadD-acr1	<i>E. coli</i>	fadD:registros NP_416319, EC 6.2.1.3 acr1:registros YP_047869

Los plásmidos de expresión elegidos contienen marcadores de resistencia a antibióticos y replicones compatibles para producir un sistema de expresión de cuatro plásmidos. Por tanto, LS9001 puede cotransformarse con: (i) cualquiera de los plásmidos que expresan TE; (ii) el plásmido que expresa FadD, que también expresa Acr1; y (iii) plásmido de expresión de éster sintasa. Cuando se induce con IPTG, la cepa resultante producirá concentraciones aumentadas de alcoholes grasos a partir de fuentes de carbono tales como glucosa.

Ejemplo 3. Producción de alcohol graso en la cepa de *E. coli* recombinante

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

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

Ejemplo 4. Producción de ácidos grasos (FA) y ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) que contienen cadenas con un número impar de carbonos sin metales pesados

1. Producción de la muestra de biodiésel n.º 23-30

Se produjo la muestra de biodiésel n.º 23-30 ("muestra n.º 23-30") mediante el cultivo en biorreactor de una cepa de *E. coli* (C41 DE3 Δ fadE Δ fabR TesA fadD adp1ws) modificada por ingeniería genética para producir ésteres grasos. Se utilizó un protocolo de inóculo de dos fases para la expansión del cultivo. La primera fase consistía en la inoculación de 50 ml de medios LB (complementados con carbenicilina 100 µg/l y espectinomicina 100 µg/l) en un matraz de agitación con deflectores de 250 ml con un vial de disolución madre congelada de 1 ml de la cepa de producción de éster de *E. coli*. Se incubó este matraz de siembra a 37°C durante siete horas (DO₆₀₀ final = 4,5 UA, pH 6,7), tras lo cual se transfirieron 3 ml del cultivo primario a cada uno de tres matraces con deflectores de 2 l que contenían 350 ml de medio mínimo F1 tamponado, que también contenía carbenicilina 100 µg/l y espectinomicina 100 µg/l. El tampón de matraz de agitación usado fue Bis-Tris propano a una concentración final de 200 mM (pH 7,2). Se incubaron estos matraces de siembra secundarios a 37°C durante dieciocho horas (DO₆₀₀ final = 12 UA, pH 5,5) y se usó el contenido para inocular tres biorreactores de 14 l con un volumen de partida de 6,5 litros de medio

mínimo F1 tamponado tras la inoculación. Estos biorreactores también contenían carbenicilina 100 µg/l y espectinomicina 100 g/l.

- 5 Se cultivaron inicialmente estos biorreactores de 14 l a 37°C y se mantuvo el nivel de oxígeno disuelto al 30% de saturación, usando los circuitos en cascada de agitación y enriquecimiento en oxígeno. Se mantuvo el pH del cultivo a 7,2, usando H₂SO₄ 1 M y gas de amoníaco anhidro. Se inició una alimentación de nutrientes que consistía principalmente en glucosa al 43% (p/v) cuando se agotó la carga de 5 g/l original en el medio basal. Entonces se ajustó manualmente la tasa de alimentación de disolución de glucosa durante la duración de la serie para mantener la glucosa residual a un valor bajo (pero distinto de cero) durante la duración de la fermentación. Se indujeron los cultivos con IPTG 1 mM (concentración final) cuando la densidad óptica del cultivo alcanzó un valor de 30 UA.
- 10 En este punto de inducción, se redujo la temperatura de cultivo en biorreactor hasta 30°C y se añadieron aproximadamente 15 ml/l (basándose en un volumen de 6,5 a 7 litros) de etanol al cultivo y se monitorizó mediante HPLC de principio a fin. Se añadió periódicamente etanol adicional a los biorreactores para mantener la concentración residual a aproximadamente 20 ml/l. Se hizo la recogida de los biorreactores tras aproximadamente 60 horas de cultivo, recogiendo aproximadamente 10 l del caldo de cada uno de los tres biorreactores.
- 15 Se combinaron y se extrajeron estos caldos recogidos con un volumen equivalente de acetato de etilo con agitación a temperatura ambiente durante dos horas. Entonces se centrifugó el extracto de caldo (3500 rpm, 30 minutos) para separar las fases líquidas, seguido por la retirada de la fase orgánica para su procesamiento adicional. Se eliminó casi completamente el acetato de etilo (<0,3% residual, mediante CG/FID) de esta fase orgánica mediante evaporación rotatoria (Büchi, R-200), dejando aproximadamente 90 ml de un líquido aceitoso oscuro. Este líquido se denominó muestra n.º 23-30.
- 20

2. Cuantificación de FA y FAEE en la muestra n.º 23-30

- 25 Se realizó CG-EM usando un sistema Agilent 5975B MSD equipado con una columna DB-5 de 30 m x 0,25 mm (película de 0,10 µm). La temperatura de la columna fue isotérmica durante 3 min a 100°C. Se programó que la columna aumentase de desde 100°C hasta 320°C a una velocidad de 20°C/min. Cuando se alcanzó la temperatura final, la columna permaneció isotérmica durante 5 minutos a 320°C. El volumen de inyección era de 1 µl. Se liberó el gas portador, helio, a 1,3 ml/min. El espectrómetro de masas estaba equipado con una fuente de ionización por impacto electrónico. Se fijó la temperatura de la fuente de ionización a 300°C. Se adquirieron patrones de FAEE (por ejemplo, dodecanoato de etilo, tetradecanoato de etilo, cis-9-hexadecanoato de etilo, hexadecanoato de etilo, octadecanoato de etilo, todos >99%); patrones de éster metílico de ácido graso (FAME) (por ejemplo, dodecanoato de metilo, tetradecanoato de metilo, pentadecanoato de metilo, cis-9-hexadecanoato de metilo, hexadecanoato de metilo, cis-11-octadecanoato de metilo, todos >99%); diazometano de trimetilsililo (TMSD, 2 M en hexano); ácido clorhídrico (37%); metanol (>99,9%); y acetato de etilo (>99,9%) de Sigma-Aldrich y se usaron sin purificación adicional.
- 30

- 35 Se derivatizó la muestra n.º 23-30 añadiendo 50 µl de trimetilsilildiazometano (TMSD), 8 µl de HCl y 36 µl de metanol a 1 ml de la muestra (1 mg/ml en acetato de etilo). Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora.

- Antes de la cuantificación, se identificaron el FAEE y el FAME en la muestra n.º 23-30 usando dos métodos. En primer lugar, se comparó el tiempo de retención en CG de cada compuesto con el tiempo de retención de un patrón conocido. En segundo lugar, se confirmó la identificación de cada compuesto haciendo coincidir el espectro de masas del compuesto con un espectro de masas patrón en la biblioteca de espectros de masas.

- 40 Cuando estaba disponible un patrón para un FAEE o FAME, se determinó la cuantificación del FAEE o FAME generando una curva de calibración (concentración frente a respuesta de instrumento). Se obtuvo entonces una relación lineal entre la respuesta de instrumento y la concentración de analito. Se determinó la concentración del compuesto en la muestra tomando su respuesta de instrumento y haciendo referencia a la curva de calibración.

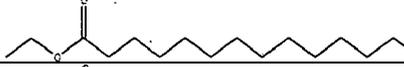
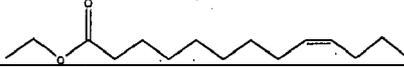
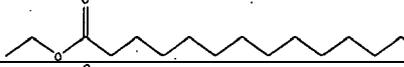
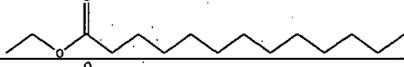
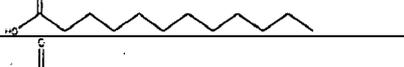
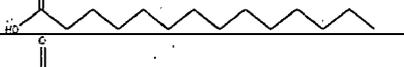
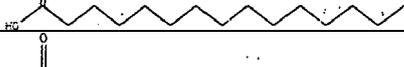
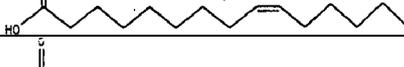
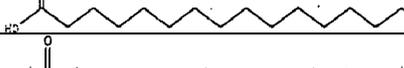
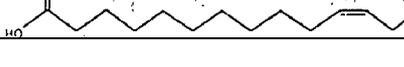
- 45 Cuando no estaba disponible un patrón para un FAEE, se usó una respuesta de instrumento promedio para determinar las concentraciones del compuesto. Se promediaron la pendiente y la intersección para todas las curvas de calibración existentes. A partir de estos promedios, se determinó una relación lineal entre la concentración y la respuesta de instrumento. Entonces se determinó la concentración de compuestos desconocidos estableciendo una referencia para su respuesta de instrumento con la relación lineal entre la respuesta de instrumento y la concentración usando la ecuación 1.

- 50 Ecuación 1: concentración = (respuesta de instrumento – intersección promedio) / pendiente promedio

Tras identificar y cuantificar el FAME, se determinó la concentración de los ácidos grasos libres asociados basándose en la concentración de FAME y la razón de peso molecular de FA con respecto a FAME. Finalmente, se convirtió la concentración de FAEE y FA en mg/l en un porcentaje en la muestra de biodiésel (% p/p).

- 55 En la tabla 10 se enumeran las concentraciones de FAEE y FA en la muestra n.º 23-30. La concentración total de FAEE y FA era del 80,7%. Pueden analizarse el resto de los compuestos desconocidos mediante el método de CL/EM/EM. Pentadecanoato de etilo, cis-9-hexadecanoato de etilo, hexadecanoato de etilo y cis-11-octadecanoato de etilo eran los componentes principales de la muestra n.º 23-30.

Tabla 10: Porcentaje de FAEE y FA en la muestra n.º 23-30

Nombre	Estructura	PM	Porcentaje, %
Dodecanoato de etilo		228,2	1,82 ± 0,03
Tridecanoato de etilo		242,2	0,16 ± 0,01
Tetradecanoato de etilo		256,2	12,88 ± 0,16
Pentadecanoato de etilo		270,3	0,62 ± 0,02
Cis-9-hexadecenoato de etilo		282,3	24,12 ± 0,20
Hexadecanoato de etilo		284,3	9,04 ± 0,11
Heptadecanoato de etilo		298,3	0,11 ± 0,01
Cis-11-octadecenoato de etilo		310,3	23,09 ± 0,33
Octadecanoato de etilo		312,3	0,19 ± 0,03
Ácido dodecanoico		200,2	0,94 ± 0,02
Ácido tetradecanoico		228,2	2,63 ± 0,03
Ácido pentadecanoico		242,2	0,10 ± 0,01
Ácido cis-9-hexadecenoico		254,2	1,97 ± 0,01
Ácido hexadecanoico		256,2	1,01 ± 0,01
Ácido cis-11-octadecenoico		282,3	2,00 ± 0,02

* El porcentaje es % p/p.

Sorprendentemente, la muestra n.º 23-30 contenía FA y FAEE de número impar. Puede realizarse un análisis adicional, tal como CL/EM/EM, para confirmar que estos ácidos grasos de cadena con un número impar de carbonos se producían por *E. coli* y no procedían de los propios lípidos de *E. coli*.

5 3. Análisis elemental cuantitativo de la muestra n.º 23-30

Se sabe que los metales pesados contaminan los catalizadores usados en el craqueo catalítico. Para medir los niveles de metales pesados en la muestra n.º 23-30, se envió la muestra n.º 23-30 a Galbraith Laboratories, Inc. para el análisis elemental cuantitativo de arsénico, calcio, carbono, cloro, cobalto, cobre, hidrógeno, hierro, agua según Karl Fischer, plomo, manganeso, magnesio, mercurio, molibdeno, nítrógeno, potasio, sodio, azufre, zinc, oxígeno y fósforo. A continuación se describen los métodos preparatorios y analíticos. Se muestran los resultados en la tabla 11. Todas las cantidades en la tabla 11 estaban por debajo del nivel de cuantificación (LOQ) excepto para el carbono (73,38%), cloro (91 ppm), hidrógeno (12,1%), agua según Karl Fischer (0,998%), mercurio (0,057 ppm), oxígeno (14,53%) y fósforo (343 ppm). Por tanto, la muestra n.º 23-30 no contenía niveles elevados de los metales pesados que se midieron.

15 Método G-52, rev. 6: Digestión por microondas de muestras para análisis de metales

Se pesó una cantidad apropiada de la muestra en un recipiente para microondas hasta los 0,001 g más próximos. Entonces se añadieron los reactivos apropiados al recipiente para microondas. Si se observaba una reacción visible, se dejó que la reacción cesara antes de tapar el recipiente. Entonces se selló el recipiente y se colocó en el microondas según las instrucciones del fabricante. La temperatura de cada recipiente alcanzó un mínimo de 180 ± 10°C en 5 minutos. Permaneció a un mínimo de 180 ± 10°C durante 10 minutos. Al final del programa de microondas se dejó que los recipientes se enfriaran durante un mínimo de 5 minutos antes de su retirada. Entonces se

destaparon los recipientes y se transfirieron a matraces volumétricos para su análisis mediante la técnica apropiada.

Método G-55, rev. 3: Combustión en bomba de oxígeno Parr para la determinación de halógenos

5 Se pesaron muestras en una cubeta de combustión y se añadió aceite mineral como adyuvante de combustión. Para las mediciones de cloro (Cl) y bromo (Br) se añadió una disolución de peróxido de hidrógeno al 1% a la bomba. Para las mediciones de azufre (S) se añadió una disolución de hidróxido de sodio 0,01 N. Se sellaron la muestra y la cubeta en una bomba de combustión de oxígeno Parr junto con una disolución absorbente adecuada. Se purgó la bomba con oxígeno, luego se presurizó hasta una presión de 25-30 atm de oxígeno y se encendió. Después de eso, se mezcló bien el contenido de la bomba y se transfirió a un vaso de precipitados para su posterior análisis.

10 Método G-30B, rev. 7: Digestión de cenizas en húmedo de compuestos inorgánicos y orgánicos para análisis de metales

15 Se carbonizó la muestra usando H₂SO₄. Si se analiza para determinar metales que forman sulfatos insolubles, se usaron HClO₄ y HNO₃ para carbonizar el material orgánico. Tras carbonizar la muestra se añadió HNO₃ y se sometió a reflujo la muestra para solubilizar los metales presentes. Si la disolución se volvía turbia, se añadió HCl para ayudar a una digestión completa. Puede usarse HF si estaba presente silicio en la muestra, pero sólo si el silicio no era un analito de interés. Todo el HF usado se confinó en recipientes de teflón. Se transfirió cuantitativamente el producto de digestión claro a un matraz volumétrico de clase A y se llevó hasta el volumen final. Entonces se analizó la muestra.

Método ME-4A, rev. 2: Determinación de aniones suprimidos mediante cromatografía iónica

Instrumento	Dionex modelo DX500
Columna de cromatografía	Dionex IonPac AS9-SC 4 x 250 mm
Eluyente Na ₂ CO ₃ 2,4 mM	NaHCO ₃ 1,8 mM
Preparación	Pueden analizarse muestras acuosas tal cual. Las muestras solubles en agua se transfieren normalmente en peso hasta un volumen conocido. Pueden extraerse otros materiales sólidos que no son solubles en agua para determinar las cantidades extraíbles de diversos aniones o quemarse para determinar las cantidades totales de un elemento tal como Cl o Br.
Calibración	Patrones para delimitar la concentración de la muestra. 0,2 mg/l - 4,0 mg/l
Introducción de la muestra	Inyección automática (Hitachi modelo AS7200)
Determinación	Detección de la conductividad/regresión lineal
Límite de cuantificación	Normalmente 0,2 mg/l en disolución.
Interferencias	Aniones con tiempos de retención similares; picos solapantes de los aniones constituyentes principales.

Método S-300, rev. 7: Determinación de agua mediante valoración coulombimétrica (Karl Fischer)

20 Este método combinaba la coulombimetría con la valoración de Karl Fischer. Se mezcló la muestra con una mezcla de amina-metanol que contenía predominantemente ion yoduro (I-) y dióxido de azufre. Se permitió que el yodo producido en el ánodo a través de la electrolisis reaccionase con agua. En tales casos, se produjo yodo en proporción directa a la cantidad de electricidad según la ley de Faraday. Además, dado que 1 mol de agua reacciona estequiométricamente con 1 mol de yodo, 1 mg de agua era equivalente a 10,71 coulombios de electricidad.

25 Utilizando este principio, el medidor de humedad determinó la cantidad de agua directamente a partir del número de coulombios requeridos para la electrolisis. Este procedimiento incluía tanto la introducción directa como una técnica de pretratamiento con vaporizador.

Preparación	Pesar para obtener de 100 µg a 3 mg de H ₂ O; proteger las muestras de la humedad atmosférica durante el pesaje y la transferencia.
Instrumento	Medidor de humedad MCl de Mitsubishi modelo CA-06 (inst. n.º 569), vaporizador de humedad de Mitsubishi, modelo CA/VA-06 (inst. n.º 568)
Control	Tartrato de sodio monohidratado (15,66%); frecuencia: cada 10 muestras, una cada día como mínimo, recuperación del 95-105%
Introducción de la muestra	A. orificio de entrada, transferencia directa; capilar, jeringa o cuchara B. Horno, cápsulas de estaño (vaporizador de agua VA-06); la temperatura varía, 200°C es el valor por defecto usado para los patrones. La mayoría de las muestras analizadas a 160°C. Otras temperaturas previa petición.
Determinación	Valoración coulombimétrica de reactivo de Karl Fischer por medio de valorador automático
Límite de cuantificación	100 µg de H ₂ O

ES 2 536 405 T3

Precisión y exactitud Tartrato de sodio monohidratado	DER 1,35% 1,34%	ER 0,54% -2,13%	INSTR. n.º 569 568
Ecuaciones	(2I ⁻ - 2e ⁻ → I ₂); (I ₂ + SO ₂ + 3C ₅ H ₅ N + H ₂ O → 2C ₅ H ₅ N HI + C ₅ H ₅ N SO ₃) µg de H ₂ O / peso de la muestra (g) = ppm de H ₂ O µg de H ₂ O x 0,1 / peso de la muestra (mg) = % de H ₂		
Interferencias	(sólo transferencia directa) álcali libre; agente reductor, oxidante; mercaptanos		

Método E16-2, rev. 9 (perfil E16-2A): Determinación de azufre usando el instrumento SC-432DR de LECO

5 El analizador de azufre SC-432DR es un instrumento controlado digitalmente, de infrarrojo no dispersivo, diseñado para medir el contenido en azufre en una variedad de materiales orgánicos e inorgánicos. Se quemó la muestra a 1350 + 50°C en una atmósfera de oxígeno puro. Se oxidó el azufre para dar dióxido de azufre y se cuantificó mediante absorción de infrarrojo. El instrumento SC-432DR estaba equipado con dos detectores, una célula infrarroja de alto alcance y una de bajo alcance.

Instrumento	Analizador de azufre SC-432DR de LECO	
Introducción de la muestra	Pesar la muestra hasta los 0,01 mg más próximos. Pesar las muestras directamente en una cápsula de muestra tarada en una balanza electrónica. Peso transferido automáticamente a la base de datos SC432. Cubrir la muestra con el acelerador de combustión Com-Cat de LECO como requiera el tipo de muestra.	
Calibración	Tres acondicionadores de 5-10 mg de cistina. Siete patrones de calibración de 30-175 mg de huevo completo en polvo NIST SRM 8415 (0,512% de S). Calibración interna usando una curva de regresión cuadrática.	
Control	Leche en polvo NIST SRM 1549 (0,351%); otros para hacer coincidir el tipo de muestra. Frecuencia: una cada diez muestras.	
Determinación	Combustión en atmósfera de O ₂ a 1350°C. Determinación del SO ₂ resultante mediante detector infrarrojo.	
Límite de cuantificación	0,08 mg de S	
Cálculos	Internos	
Precisión y exactitud (leche en polvo)	DER (%) 2,60	Recuperación media (%) 97,97

Método ME-2, rev. 14: Determinación de carbono, hidrógeno y nitrógeno

10 Este instrumento quema la muestra en oxígeno puro a 950°C en condiciones estáticas para producir productos de combustión de CO₂, H₂O y N₂. El instrumento PE-240 analiza automáticamente estos productos en un analizador de conductividad térmica en estado estacionario, de integración automática. Puede añadirse anhídrido tungstíco para ayudar a la combustión. Puede emplearse un tiempo de combustión prolongado (por ejemplo, modo de combustión intensa) para muestras difíciles de quemar.

Instrumento	Analizador elemental PerkinElmer 240 (instrumento n.º 409, 410)					
Introducción de la muestra	Pesar 1,0-2,5 mg en una cápsula de Al; sellar (véase procedimiento G-6 de GLI) para líquidos; lavada con disolvente antes del pesaje previa petición					
Descomposición	Combustión a ≥ 950°C, reducción a ≥ 675°C = CO ₂ , H ₂ O, N ₂					
Calibración	Ciclohexanona-2,4-dinitrofenilhidrazona (1-2,5 mg)					
Control	s-1409, 2-1410: Ciclohexanona-2,4-dinitrofenilhidrazona (51,79% de C, 5,07% de H, 20,14% de N)					
Determinación	CO ₂ , H ₂ O, N ₂ mediante analizador de conductividad térmica					
Cuantificación	0,5% de C, 0,5% de H, 0,5% de N					
Precisión y exactitud	Instrumento n.º 409			Instrumento n.º 410		
	C	H	N	C	H	N
	0,28	1026	0,39	0,35	1,12	0,41
Recuperación media (%)	99,94	101,25	99,86	100,13	100,40	100,04
Interferencias	Los metales y algunos halógenos provocan una combustión incompleta. Pueden usarse adyuvantes de combustión y/o un tiempo de combustión prolongado para aliviar este problema.					
Cálculos	El instrumento calcula e imprime los resultados en p/p para % de C, % de H y % de N. Para las muestras selladas en una cápsula de aluminio, se corrige el % de N con un factor; (µV/µg de muestra/K) x 100 = % de elemento, donde K = calibración = µV/µg de C o H o N					

Método ME-70, rev. 4: Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente

Este método describe determinaciones multielementales mediante ICP-AES usando sistemas ópticos simultáneos y observación axial o radial del plasma. El instrumento mide espectros de emisión característicos mediante espectrometría óptica. Se nebulizan las muestras y se transporta el aerosol resultante a la antorcha de plasma. Se producen espectros de emisión específicos de elemento mediante plasma acoplado inductivamente mediante radiofrecuencia. Se dispersan los espectros mediante un espectrómetro de red y se monitorizan las intensidades de las líneas de emisión mediante dispositivos fotosensibles. Se requiere una corrección de fondo para la determinación de elementos traza. El fondo debe medirse adyacente a las líneas de analito en las muestras durante el análisis. La posición seleccionada para la medición de la intensidad de fondo, en cualquiera de o en ambos lados de la línea analítica, se determinará por la complejidad del espectro adyacente a la línea de analito. En un modo de análisis, la posición usada debe estar tan libre como sea posible de interferencia espectral y debe reflejar el mismo cambio en la intensidad de fondo que el producido al medir la longitud de onda del analito. No se requiere corrección de fondo en los casos de ensanchamiento de línea, en el que una medición de corrección de fondo degradaría en realidad el resultado analítico.

Instrumento	Instrumento ICP-OES Optima 5300, 3300DV y 4300DV, o equivalente
Descomposición	Antes del análisis, deben acidificarse o digerirse las muestras usando métodos de preparación de muestras apropiados.
Calibración	0,01 ppm - 60 ppm más calibraciones específicas de matriz
Introducción de la muestra	Bomba peristáltica, nebulizador de flujo cruzado, nebulizador Gemcone, cámara de pulverización Scott Ryton y cámara de pulverización ciclónica de cuarzo
Determinación	Emisión atómica mediante plasma acoplado inductivamente mediante radiofrecuencia de espectros de emisión específicos de elemento a través de un espectrómetro de red monitorizado mediante dispositivos fotosensibles.
Límite de cuantificación	Específico de elemento y calibración que oscila entre 0,01-2 ppm
Precisión y exactitud	± 10% DER
Interferencias	Espectrales, químicas, físicas, de memoria
Cálculos	$\% \text{ en peso} = (fc \times v/10 \times D)/spl$ $\text{ppm} = (fc \times v \times D)/SPL$ donde fc = concentración final en $\mu\text{g/ml}$; v = volumen de la muestra en ml; D = factor de dilución; spl = masa de la muestra en mg; SPL = masa de la muestra en g

15 Método E80-2, rev. 4: Determinación de mercurio (técnica de vapor frío automatizada)

Este procedimiento se basa en el método EPA SW846 7471A. La absorción atómica de vapor frío se basa en la teoría general de absorción atómica, que sostiene que los átomos libres del analito absorben energía de una fuente de lámpara que es proporcionar la concentración de analito. Usando una lámpara que contiene el metal que va a medirse, se produce la longitud de onda exacta necesaria para la absorción y se reducen en gran medida las interferencias. La absorción atómica de vapor frío usa este principio, y los átomos de mercurio se liberan reduciendo iones mercurio con cloruro de estaño (II) (SnCl_2). El gas nitrógeno porta los átomos a través de una célula óptica, con la lámpara de Hg en un extremo y el detector en el otro extremo. Debido a que se emplea el método de vapor frío, en vez de un método de llama, los compuestos orgánicos no digeridos provocan un problema de interferencias, debido a su ancha banda de longitudes de onda de absorción.

Instrumento	Analizador de mercurio automatizado PerkinElmer FIMS 400 o equivalente	
Descomposición	Variable, habitualmente digestión por microondas o digestión por baño de agua caliente con permanganato	
Calibración	0,1 - 5,0 $\mu\text{g/l}$	
Introducción de la muestra	Inyector automático, bomba peristáltica	
Determinación	Longitud de onda primaria de 253,7 nm, usando un detector de estado sólido	
Límite de detección	Varía con el método de preparación y la matriz de muestra	
Precisión y exactitud	Para la digestión por microondas:	Para la digestión por MnO_4^- :
ER	-2,47%	4,90%
DER	7,48%	5,20%
Interferencias	Compuestos orgánicos no digeridos	
Cálculos	$\text{ppb de Hg} = \frac{\mu\text{g/l en disolución} \times \text{volumen (ml)} \times \text{factor de dilución}}{\text{peso de la muestra (g)}}$	

25 Tabla 11: Análisis elemental cuantitativo de la muestra n.º 23-30

Elemento	Método de preparación	Método analítico	Resultado
Arsénico	G-52	ME-70	<25 ppm
Calcio	G-30B	ME-70	<119 ppm

Carbono	N/A	ME-2	73,38%
Cloro	G-55	ME-4A	91 ppm
Cobalto	G-30B	ME-70	<23ppm
Cobre	G-30B	ME-70	<23ppm
Hidrógeno	N/A	ME-2	12,1%
Hierro	G-30B	ME-70	<136 ppm
Agua según Karl Fischer	N/A	S-300	0,998%
Plomo	G-52	ME-70	<25 ppm
Manganeso	G-30B	ME-70	<23 ppm
Magnesio	G-30B	ME-70	<23 ppm
Mercurio	G-52	E80-2	0,057 ppm
Molibdeno	G-30B	ME-70	<23 ppm
Nitrógeno	N/A	ME-2	<0,5%
Potasio	G-30B	ME-70	<103 ppm
Sodio	G-30B	ME-70	<140 ppm
Azufre	N/A	E16-2A	<0,140%
Zinc	G-30B	M-70	<23 ppm
Oxígeno	N/A	Resta*	14,53%
Fósforo	G-30B	ME-70	343 ppm

Los resultados presentados como “<” están por debajo del LOQ. * El contenido en oxígeno se determinó restando los resultados observados para todos los demás elementos del 100%.

Ejemplo 5. Producción y liberación de alcohol graso a partir del huésped de producción

5 Se expresó Acr1 (acil-CoA reductasa) en *E. coli* hecha crecer sobre glucosa como la única fuente de carbono y de energía. La *E. coli* produjo pequeñas cantidades de alcoholes grasos tales como dodecanol (C_{12:0}-OH), tetradecanol (C_{14:0}-OH) y hexadecanol (C_{16:0}-OH). En otras muestras, se expresó *FadD* (acil-CoA sintasa) junto con *acr1* en *E. coli*. Se observó un aumento de cinco veces en la producción de alcoholes grasos.

10 En otras muestras, se expresaron *acr1*, *fadD* y *accABCD* (acetil-CoA carboxilasa) (plásmido que porta *accABCD* construido tal como se describió en el ejemplo 1) junto con diversas tioesterasas (TE) individuales en *E. coli* C41(DE3) silvestre y una *E. coli* C41 (DE3 Δ *fadE*, una cepa que carece de acil-CoA deshidrogenasa). Esto dio como resultado aumentos adicionales en la producción y modulación de alcoholes grasos de los perfiles de alcoholes grasos (véase la figura 7). Por ejemplo, la sobreexpresión de *tesA* de *E. coli* (pETDuet-1-*tesA*) en este sistema logró un aumento de aproximadamente 60 veces en C_{12:0}-OH, C_{14:0}-OH y C_{16:0}-OH, siendo C_{14:0}-OH el principal alcohol graso. Se obtuvo un resultado muy similar cuando se expresó la enzima ChFatB3 (FatB3 de *Cuphea hookeriana* en pMAL-c2X-TEcu). Cuando se expresó la enzima UcfatB1 (FatB1 de *Umbellularia californica* en pMAL-c2X-TEuc), la producción de alcoholes grasos aumento aproximadamente 20 veces y C_{12:0}-OH fue el alcohol graso predominante.

20 La expresión de ChFatB3 y UcfatB1 también condujo a la producción de cantidades significativas de los alcoholes grasos insaturados C_{16:1}-OH y C_{14:1}-OH, respectivamente. También se encontró la presencia de alcoholes grasos en el sobrenadante de muestras generadas a partir de la expresión de *tesA* (figura 8). A 37°C, se encontraron cantidades aproximadamente iguales de alcoholes grasos en el sobrenadante y en el sedimento celular. Mientras que a 25°C, aproximadamente el 25% de los alcoholes grasos se encontraron en el sobrenadante.

Ejemplo 6. Producción de alcohol graso usando una variedad de acil-CoA reductasas

25 Este ejemplo describe la producción de alcoholes grasos usando una variedad de acil-CoA reductasas. Los alcoholes grasos pueden ser el producto final. Alternativamente, las células huésped de producción pueden expresar/sobreexpresar adicionalmente éster sintasas para producir ésteres grasos.

30 Se optimizaron los codones de cada uno de cuatro genes que codifican para acil graso-CoA reductasas (tabla 12) de diversas fuentes para su expresión en *E. coli* y se sintetizaron por Codon Devices, Inc. (Cambridge, MA). Se clonó cada uno de los genes sintetizados como un fragmento de *NdeI-AvrII* en pCDFDuet-1-*fadD* (descrito en el ejemplo 3). Se transformó cada uno de los plásmidos que portaban estos genes de acil-CoA reductasa con el gen *fadD* de *E. coli* en la cepa de *E. coli* C41 (DE), que se adquirió de Over-expression.com.

35 Se hicieron crecer las cepas recombinantes en 3 ml de caldo LB (complementado con 100 mg/l de espectinomicina) a 37°C durante la noche. Se transfirieron 0,3 ml del cultivo durante la noche a 30 ml de medio M9 nuevo (con 100 mg/l de espectinomicina) y se hicieron crecer a 25°C. Cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,5, se añadió IPTG para obtener una concentración final de 1 mM. Se alimentó a cada cultivo un 0,1% de uno de tres ácidos grasos disueltos en H₂O a pH 7,0. Los tres ácidos grasos alimentados fueron dodecanato de sodio, miristato de sodio o palmitato de sodio. También se incluyó como control un cultivo sin la adición de ácido graso. Tras la inducción se hicieron crecer los cultivos a la misma temperatura durante 40 horas adicionales a 25°C.

La cuantificación del rendimiento de alcoholes grasos al final de la fermentación se realizó usando CG-EM tal como se describió anteriormente en el ejemplo 3 y el ejemplo 4. En la tabla 13 se muestra el alcohol graso resultante producido a partir del ácido graso correspondiente. Los resultados mostraron que tres acil-CoA reductasas (Acr1, AcrM y BmFAR) podían convertir los tres ácidos grasos en los correspondientes alcoholes grasos. Los resultados también mostraron que hFAR y JjFAR tenían actividad cuando los sustratos eran miristato y palmitato. Sin embargo, hubo de poca a ninguna actividad cuando el sustrato era dodecanoato. mFAR1 y mFAR2 sólo mostraron baja actividad con miristato y no mostraron actividad con los otros dos ácidos grasos.

Tabla 12: Acil-CoA reductasas

Acil-coA reductasa	Número de registro de ID de proteína	Fuentes de proteína
mFAR1	AAH07178	<i>Mus musculus</i>
mFAR2	AAH55759	<i>Mus musculus</i>
JjFAR	AAD38039	<i>Simmondsia chinensis</i>
BmFAR	BAC79425	<i>Bombyx mori</i>
Acr1	AAC45217	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1
AcrM	BAB85476	<i>Acinetobacter</i> sp. M1
hFAR	AAT42129	<i>Homo sapiens</i>

Tabla 13: Producción de alcoholes grasos

<i>E. coli</i> C41(DE3)	Genes de acil-CoA reductasa	Área de pico ^c			
		Dodecanoato /dodecanol ^b	Miristato / tetradecanol ^b	Palmitato / hexadecanol ^b	Sin alimentación de ácido graso ^a / hexadecanol
	<i>mFAR1</i>	7.400	85.700	8.465	70,900
	<i>mFAR2</i>	2.900	14.100	32.500	25,800
	<i>JjFAR</i>	5.200	8.500	53.112	33,800
	<i>BmFAR</i>	35.800	409.000	407.000	48,770
	<i>acr1</i>	202.000	495.000	1.123.700	58,515
	<i>acrM</i>	42.500	189.000	112.448	36,854
	<i>hFAR1</i>	5.050	59.500	109.400	94,400
	Control de vector	4,000	1.483	32.700	27.500
	Control de medios	10,700	1.500	25.700	25.000

Nota: ^a Sólo se cuantificó hexadecanol en este caso. ^b Alimentación de ácido graso/alcohol graso producido. ^c El área de pico del alcohol graso producido.

10 Ejemplo 7. Ésteres grasos de cadena media

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

15 Ejemplo 8. Ésteres grasos de cadena media

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

Se sintetizó un gen SAAT recombinante mediante DNA 2.0 (Menlo Park, CA 94025). La secuencia de ADN sintetizada se basó en la secuencia génica publicada (número de registro AF193789), pero modificada para eliminar el sitio *NcoI*. Se clonó el gen SAAT sintetizado (como fragmento de *Bam*HI-*Hind*III) en pRSET B (Invitrogen, Calsbad, California), linealizado con *Bam*HI y *Hind*III. Se cotransformó el plásmido resultante, pHZ1.63A, en un huésped de producción *E. coli* con pAS004.114B, que porta un gen *fadD* de *E. coli* y un gen *acr1* de *A. baylyi* ADP1. Se hicieron crecer los transformantes en 3 ml de medio M9 con glucosa al 2%. Tras la inducción con IPTG y la adición de ácido octanoico al 0,02%, se continuó el cultivo a 25°C durante 40 horas. Entonces se añadieron 3 ml de acetato de acetilo al cultivo completo y se mezclaron varias veces con una mezcladora. Se analizó la fase de acetato de acetilo mediante CG/EM.

Sorprendentemente, no se observó acetato de acilo en el extracto de acetato de acetilo. Sin embargo, se observó octanoato de octilo. Sin embargo, la cepa control sin el gen SAAT (C41(DE3, Δ *fadE*)/pRSET B+pAS004.114B) no

produjo octanoato de octilo. Además, la cepa (C41(DE3, Δ *fadE*)/pHZ1.43 B+pAS004.114B) en la que se portaba el gen de éster sintasa de *A. baylyi* ADP1 por pHZ1.43 produjo octanoato de octilo (véase la figura 9A-D).

5 El hallazgo de que la actividad de SAAT produce octanoato de octilo hace posible producir ésteres grasos de cadena media, tales como octanoato de octilo y decanoato de octilo, que tienen un bajo punto de fusión y son buenos candidatos para su uso como biocombustibles para reemplazar biodiésel a base de triglicéridos.

Ejemplo 9. Producción de ésteres grasos en la cepa de *E. coli* LS9001

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

Se amplificó la éster sintasa de *A. baylyi* ADP1 (denominada WSadp1, registros AA017391, EC 2.3.175) con los siguientes cebadores usando la secuencia de ADN genómica de *A. baylyi* ADP1 como molde: (1) WSadp1_Ndel, 5'-TCATATGCGCCCATTACATCCG-3' y (2) WSadp1_Avr, 5'-TCCTAGGAGGGCTAATTTAGCCCTTTAGTT-3'.

15 Se digirió el producto de PCR con *NdeI* y *AvrII* y se clonó en pCOALDeut-1 para dar pHZ 1.43. Entonces se cotransformó el plásmido que portaba WSadp1 en la cepa de *E. coli* LS9001 con tanto pETDuet-1^{tesA} como pCDFDuet-1-*fadD* y se seleccionaron los transformantes en placas de LB complementadas con 50 mg/l de kanamicina, 50 mg/l de carbenicilina y 100 mg/l de espectinomicina.

20 Se inocularon tres transformantes en 3 ml de LBKCS (caldo LB complementado con kanamicina 50 mg/l, carbenicilina 50 mg/l, espectinomicina 100 mg/l y glucosa 10 g/l) y se incubaron a 37°C en un agitador (250 rpm). Cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,5, se transfirieron 1,5 ml de cada cultivo a matraces de 250 ml que contenían 50 ml de LBKCS. Entonces se incubaron los matraces en un agitador (250 rpm) a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,5-1,0. Entonces se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Se incubaron los cultivos inducidos a 37°C en un agitador (250 rpm) durante otras 40-48 horas.

25 Entonces se colocó el cultivo en tubos cónicos de 50 ml y se centrifugaron las células a 3500 X g durante 10 minutos. Entonces se mezcló el sedimento celular con 5 ml de acetato de etilo. Se analizó el extracto de acetato de etilo con CG/EM. El rendimiento de ésteres grasos (incluyendo C₁₆C₁₆, C_{14:1}C₁₆, C_{18:1}C_{18:1}, C₂C₁₄, C₂C₁₆, C₂C_{16:1}, C₁₆C_{16:1} y C₂C_{18:1}) fue de aproximadamente 10 mg/l. Cuando se cultivó de la misma forma una cepa de *E. coli* que sólo portaba vectores vacíos, sólo se encontraron 0,2 mg/l de ésteres grasos en el extracto de acetato de etilo.

Ejemplo 10. Producción y liberación de éster etílico graso a partir del huésped de producción

30 Se transformó la cepa LS9001 con plásmidos que portaban un gen de éster sintasa de *A. baylyi* (plásmido pHZ1.43), un gen de tioesterasa de *Cuphea hookeriana* (plásmido pMAL-c2X-TEcu) y un gen *fadD* de *E. coli* (plásmido pCDFDuet-1-*fadD*).

35 Se hizo crecer esta cepa recombinante a 25°C en 3 ml de medio M9 con kanamicina 50 mg/l, carbenicilina 100 mg/l y 100 mg/l de espectinomicina. Tras la inducción con IPTG, se ajustaron los medios hasta una concentración final de etanol al 1% y glucosa al 2%.

Se permitió que el cultivo creciera durante 40 horas tras la inducción con IPTG. Se separaron las células del medio gastado mediante centrifugación a 3500 X g durante 10 minutos. Se resuspendió el sedimento celular con 3 ml de medio M9. Entonces se extrajeron la suspensión celular y el medio gastado con 1 volumen de acetato de etilo. Se sometieron las fases de acetato de etilo resultantes de la suspensión celular y el sobrenadante a análisis de CG-EM.

40 El éster etílico C₁₆ era la especie de éster más prominente (tal como se esperaba para esta tioesterasa, véase la tabla 1), y el 20% del éster graso producido se liberó de la célula (véase la figura 10). Una cepa de *E. coli* C41 control (DE3, Δ *fadE*) que contenía pCOLADuet-1 (vector vacío para el gen de éster sintasa), pMAL-c2X-TEuc (que contenía *fatB* de *U. californica*) y pCDFDuet-1-*fadD* (gen *fadD* de *E. coli*) no pudo producir cantidades detectables de ésteres etílicos grasos. Se cuantificaron los ésteres grasos usando éster etílico del ácido palmítico comercial como referencia.

También se prepararon ésteres grasos usando los métodos descritos en el presente documento excepto porque se añadió metanol o isopropanol al caldo de fermentación. Se produjeron los ésteres grasos esperados.

Ejemplo 11. La influencia de diversas tioesterasas sobre la composición de ésteres etílicos grasos producidos en cepas de *E. coli* recombinantes.

50 Se expresaron simultáneamente las tioesterasas FatB3 (*C. hookeriana*), TesA (*E. coli*) y FatB (*U. californica*) con éster sintasa (*A. baylyi*). Se construyó un plásmido, pHZ1.61, reemplazando el fragmento de *NotI*-*AvrII* (que portaba el gen *acr1*) por el fragmento de *NotI*-*AvrII* de pHZ1.43 de modo que *fadD* y la éster sintasa *ADP1* estaban en un plásmido y ambas secuencias codificantes estaban bajo el control de un promotor de T7 separado. La construcción

de pHZ1.61 hizo posible usar un sistema de dos plásmidos en lugar del sistema de tres plásmidos tal como se describió en el ejemplo 8. Entonces se cotransformó pHZ1.61 en *E. coli* C41 (DE3, Δ *fadE*) con uno de los diversos plásmidos que portaban los diferentes genes de tioesterasa mencionados anteriormente.

- 5 Se evaluaron los ésteres etílicos de ácidos grasos totales (tanto en el sobrenadante como en el fluido de etilo de ácido graso intracelular) producidos por estos transformantes usando la técnica descrita en el presente documento. En la tabla 14 se resumen los rendimientos y la composición de ésteres etílicos de ácidos grasos.

Tabla 14: Rendimientos (mg/l) y composición de ésteres etílicos de ácidos grasos por *E. coli* C41 (DE3, Δ *fadE*) recombinante/pHZ1.61 y plásmidos que portan diversos genes de tioesterasa.

Tioesterasas	C ₂ C ₁₀	C ₂ C _{12:1}	C ₂ C ₁₂	C ₂ C _{14:1}	C ₂ C ₁₄	C ₂ C _{16:1}	C ₂ C ₁₆	C ₂ C _{18:1}	Total
'TesA	0,0	0,0	6,5	0,0	17,5	6,9	21,6	18,1	70,5
ChFatB3	0,0	0,0	0,0	0,0	10,8	12,5	11,7	13,8	48,8
ucFatB	6,4	8,5	25,3	14,7	0,0	4,5	3,7	6,7	69,8
pMAL	0,0	0,0	0,0	0,0	5,6	0,0	12,8	7,6	26,0

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

Ejemplo 12. Uso de diversas éster sintasas para producir biocombustible

- 10 Se sintetizaron cuatro genes que codificaban para éster sintasas basándose en secuencias de ADN correspondientes notificadas en NCBI GenBank con modificaciones menores. Estas modificaciones incluyen la eliminación de sitios *NcoI*, *NdeI*, *HindIII* y *AvrII* internos presentes sin introducir cambios en la secuencia de aminoácidos correspondiente. Se sintetizaron los cuatro genes de interés con un sitio *NdeI* en el extremo 5' y uno *AvrII* en el extremo 3'. Entonces se clonaron las secuencias en el sitio *NdeI* y *AvrII* de pCOLADuet-1 (Novagene)
- 15 para producir pHZ1.97-376, pHZ1.97-377, pHZ1.97-atfA1 y pHZ1.97-atfA2. En la tabla 15 a continuación se enumeran los plásmidos que portaban cada uno de los cuatro genes de interés junto con los respectivos números de registro de GenBank y números de registro de GenPeptide.

Tabla 15: Éster sintasas

Plásmidos	ID de LS9	Fuentes originales de la secuencia de ADN	N.º de GenBank	N.º de registro de GenPeptide
pHZ1.97-376	FES376(376)	<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8	CP000514.1	ABM17275
pHZ1.97-377	FES377(377)	<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8	CP000514.1	ABM20141
pHZ1.97-atfA1	FESA1 (AtfA1)	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	NC008260.1	YP_694462
pHZ1.97-atfA2	FESA2(AtfA2)	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	NC008260.1	YP_693524

- 20 Se transformó cada uno de los cuatro plásmidos en *E. coli* C41 (DE3, Δ *fadE* Δ *fabR*) pETDuet-1-tesA + pCDFDuet-1-fadD. Se recogieron tres transformantes de cada transformación para la fermentación para someter a prueba su capacidad para sintetizar ésteres etílicos de ácidos grasos. Se realizó la fermentación tal como se describe en el ejemplo 9, pero con dos temperaturas diferentes, o bien a 25°C o bien a 37°C. Se usó la cepa C41 (DE3, Δ *fadE* Δ *fabR*) pETDuet-1-tesA + pCDFDuet-1-fadD+pHZ1.43 (que expresa éster sintasa de ADP1) como control positivo y C41 (DE3, Δ *fadE* Δ *fabR*) pETDuet-1-tesA +pCDFDuet-1-fadD como control negativo.

- 25 La expresión de cada uno de los cuatro genes de éster sintasa en la cepa de *E. coli* con actividad de *fadE* y *fabR* atenuada y que sobreexpresaba 'tesA y *fadD* permitió que cada cepa produjera alrededor de 250 mg/l de FAEE a 25°C. Esta es la misma cantidad producida por el control positivo que expresaba ADP1. En cambio, la cepa control negativo produjo menos de 50 mg/l de FAEE en la misma condición (figura 11) a 25°C. La composición de acilos grasos de FAEE producidos a partir de estas cuatro éster sintasas es similar a la de éster sintasas de ADP1 (figura 12).
- 30

- Los resultados de fermentaciones realizadas a 37°C indicaron que las cepas que portaban pHZ1.97_376 producían más FAEE que el control positivo que portaba pHZ1.43 (figura 13). Las cepas que portaban pHZ1.97_376 también produjeron una gran cantidad de ácido graso libre. Mientras tanto la cepa que portaba pHZ1.43 no acumuló ácido graso libre (figura 14). Los resultados mostraron que estas cuatro éster sintasas pueden aceptar etanol y una amplia gama de acil-CoA como sustratos.
- 35

Ejemplo 13. Uso de éster sintasa eucariota para producir biocombustible

Este ejemplo describe la clonación y expresión de una éster sintasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Se generaron

plásmidos usando técnicas de biología molecular convencionales.

Tabla 16: Plásmidos con *eeb1*

Nombre dado	Estructura principal de vector	Construcción
pGL10.59	pCOLADuet-1 (Novagen)	gen <i>eeb1</i> * insertado entre los sitios BamHI y HindIII (KanR)
pGL10.104	pMAL c2x (NEB)	gen <i>eeb1</i> * insertado entre los sitios BamHI y HindIII (AmpR)
pMAL-c2X-TEuc	pMAL c2x (NEB)	Véase la tabla 8 anterior
pCDFDuet-1-acr1	pCDFDuet-1 (Novagen)	Véase la tabla 8 anterior

* Se amplificó por PCR el gen *eeb1* de *Saccharomyces cerevisiae* (número de registro de GenBank YPL095C) a partir de la secuencia de ADN genómica de *S. cerevisiae* usando cebadores que introducen sitios BamHI en 5' e HindIII en 3'.

5 Se usó un huésped de producción *E. coli* C41 (DE3 Δ *fadE*) para expresar los diversos plásmidos. Se hicieron crecer las células de *E. coli* en medios mínimos M9 (Na₂HPO₄ 6 g/l, KH₂PO₄ 3 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH₄Cl 1 g/l, tiamina (vit. B1) 1 mg/l, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 0,1 mM, glucosa al 0,4% (p/v) o al 2% (p/v), según se indique). Se prepararon todas las disoluciones madre de ácidos grasos disolviendo la sal de sodio o potasio del ácido graso en agua desionizada destilada a pH 7,0. Se adquirió la disolución madre de ácido octanoico de Sigma, St. Louis, MO.

10 Se realizaron fermentaciones usando la cepa C41 (DE3 Δ *fadE*) que contenía los plásmidos pCDFDuet-1-acr1, pMALc2X-TEuc (ucFatB) y pGL10.59 (*eeb1*). La cepa control fue la cepa C41 (DE3 Δ *fadE*) que portaba pCDFDuet-1-acr1, pMAL-c2X-TEuc y el vector vacío pCOLADuet-1. Se usaron tres colonias de cada transformación para inocular cultivos iniciadores de M9 + glucosa al 0,4% complementados con carbenicilina (100 µg/ml), espectinomicina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). Se permitió que los cultivos crecieran a 37°C durante la noche. Se establecieron cultivos de producción preparando una dilución 1:100 de cultivo iniciador para inocular 3 ml de medios M9 + glucosa al 0,4%. Se permitió que los cultivos de producción crecieran a 37°C hasta DO₆₀₀ = 0,6 antes de inducirse con IPTG 1 mM, alimentarse con etanol al 1% y cultivarse durante 40 horas adicionales a 25°C. Se extrajeron cultivos de células completas con un volumen igual de acetato de etilo agitando con vórtex vigorosamente durante 30 segundos. Se tomó la fase orgánica y se ejecutó sobre la CG/EM usando el método `alkane_1_splitless_ctc.m` para la detección de FAEE, que se describió anteriormente en el ejemplo 4, parte 2, "Cuantificación de FA y FAEE en la muestra n.º 23-30".

20 No pudo observarse ningún pico de FAEE en ninguna de las muestras. Con el fin de determinar si Eeb1 estaba expresándose apropiadamente, se analizaron cultivos inducidos y no inducidos con IPTG mediante SDS-PAGE. No pudo detectarse ninguna banda correspondiente al tamaño de Eeb1 (~52 kDa). Esto sugiere que para este sistema de plásmidos particular, Eeb1 no se expresa bien.

25 Se realizaron experimentos de expresión adicionales usando un vector de expresión diferente. Se clonó el gen en el vector pMALc2x, que expresa la proteína diana como una fusión con proteína de unión a maltosa (MBP). El análisis de SDS-PAGE de lisados de células completas reveló que los cultivos inducidos con IPTG 1 mM producían una banda de tamaño apropiado correspondiente a la fusión Eeb1-MBP (~92 kDa). La banda no estaba presente en células no inducidas.

30 Se evaluó la actividad enzimática de Eeb1 usando la cepa de *E. coli* C41 (DE3 Δ *fadE*) que portaba los plásmidos pCDFDuet-1-acr1 y pGL10.104 (*eeb1*). Una C41 (DE3 Δ *fadE*) con pCDFDuet-1-acr1 y pMALc2x sirvió como cepa control. Se recogieron tres colonias de cada transformación y se usaron para inocular cultivos iniciadores durante la noche de M9 + glucosa al 0,4% complementados con carbenicilina (100 µg/ml) y espectinomicina (100 µg/ml). Se usó una dilución 1:100 de los cultivos iniciadores para inocular 10 ml de cultivos de producción de M9 + glucosa al 0,4%. Se permitió que los cultivos de producción crecieran a 37°C hasta DO₆₀₀ = 0,4 - 0,5 antes de inducir con IPTG 1 mM, alimentar con etanol al 1% y alimentar con ácido octanoico (volumen final del 0,01% o el 0,02%) o ácido decanoico (volumen final del 0,02%). Se permitió que las fermentaciones continuaran durante 24 horas a 25°C. Se llevaron a cabo extracciones añadiendo un volumen 1/10 de HCl 12 M y un volumen igual de acetato de etilo al cultivo y agitando con vórtex durante 30 segundos. Se analizaron las muestras mediante CG/EM tal como se describió anteriormente.

40 Los datos de CG/EM revelaron que podía detectarse un pico correspondiente al éster etílico del ácido octanoico para células que expresan Eeb1 y alimentadas con ácido octanoico y etanol. La cepa control de vector también mostró un pico de C₂C₈, aunque un pico más pequeño que el de las células que expresaban Eeb1.

45 Las células alimentadas con ácido decanoico al 0,02% no crecieron bien, por tanto se realizaron los siguientes estudios usando ácido decanoico al 0,01% o al 0,005%. Para someter a prueba la capacidad de Eeb1 para utilizar alcoholes distintos de etanol en la síntesis de ésteres de ácidos grasos, se llevaron a cabo fermentaciones usando la misma cepa: C41 (DE3 Δ *fadE*) con pCDFDuet-1-acr1 y pGL10.104. Se cultivaron las células tal como se describió anteriormente. En la inducción, se alimentaron las células con ácido octanoico al 0,02% junto con o bien metanol al

1%, etanol, propanol o bien isopropanol. También se alimentaron las células con ácido decanoico al 0,01% o al 0,005% y etanol al 1%. Se continuaron las fermentaciones tras la inducción durante 24 horas a 25°C. Para CG/EM, se centrifugaron los cultivos para separar el sedimento y el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en un volumen igual de medios M9 + glucosa al 0,4% nuevos. Se extrajeron tanto el sedimento resuspendido como las muestras de sobrenadante tal como se describió anteriormente y se analizaron mediante CG/EM.

Todas las muestras de sobrenadante contenían grandes cantidades de ácido graso y no se detectaron ésteres de ácidos grasos. De manera similar, las muestras de sedimento de control de vector no contenían picos. Sin embargo, las células alimentadas con ácido graso C₁₀ mostraron picos identificados como ácido decanoico.

Las muestras de sedimento derivadas de las células que expresaban Eeb1 y alimentadas con ácido graso C₈ y propanol o etanol mostraron picos pequeños correspondientes a los ésteres propílicos o etílicos. No se detectaron picos para las células alimentadas con metanol o isopropanol. Los cultivos alimentados con ácido graso C₁₀ al 0,01% o al 0,005% y etanol también produjeron el FAEE C₂C₁₀, que estaba presente en las muestras de sedimento.

Los resultados indicaron que Eeb1 podía sintetizar FAEE usando ácidos decanoico u octanoico y también podía usar metanol para generar éster metílico octanoico. Sin embargo, estos compuestos son altamente volátiles y los datos de CG/EM pueden no reflejar con precisión los títulos verdaderos. Para medir con más precisión la formación de productos se usó un recubrimiento con hexadecano para facilitar la captura de estos FAEE más volátiles.

Se evaluó la actividad de Eeb1 usando diversos sustratos de ácido graso usando la cepa C41 (DE3 Δ fadE) con pCDFDuet-1-*acr1* y pGL10.104 mientras se alimentaba con ácidos grasos de diferente longitud de cadena. Se cultivaron las células como anteriormente, pero se indujeron a DO₆₀₀ = 0,8 - 0,9 para promover un mejor crecimiento celular tras la inducción. En este punto, se alimentaron las células con etanol al 1% y ácido graso C₈ al 0,02% o el 0,01% de los siguientes ácidos grasos: C₁₀, C₁₂, C₁₄ y C₁₆. Se recubrieron los cultivos alimentados con ácidos grasos C₈ o C₁₀ con un volumen total de hexadecano del 20%. Se llevaron a cabo fermentaciones durante 24 horas adicionales a 25°C. Para el análisis de productos, se extrajeron cultivos completos (sin separar el sobrenadante del sedimento) como anteriormente, con un volumen 1/10 de HCl y un volumen de acetato de etilo igual al cultivo. Se inyectaron muestras de hexadecano directamente en la CG/EM usando el programa hex_1_splitless_ctc.m, que se describió anteriormente en el ejemplo 4, parte 2, "Cuantificación de FA y FAEE en la muestra n.º 23-30".

Ninguno de los controles de vector mostró ningún pico de FAEE. Para las células alimentadas con C₈ y C₁₀, pudieron detectarse picos de C₂C₈ y C₂C₁₀ grandes en las muestras de hexadecano, pero no en las muestras de acetato de etilo. Esto demostró que el hexadecano podía atrapar satisfactoriamente los FAEE volátiles. Para el resto de las muestras de acetato de etilo, pudieron detectarse picos pequeños para FAEE C₂C₁₂ y C₂C₁₄, pero ninguno para C₂C₁₆. Por tanto, Eeb1 generó ésteres etílicos usando ácidos grasos con longitudes de cadena de desde C₈ hasta C₁₄. Eeb1 favorecía C₈ y C₁₀ con respecto a los ácidos grasos de cadena más larga.

Ejemplo 14. Integración genómica de secuencias recombinantes para preparar una cepa huésped que sobreexpresa genes *fabA* y/o *fabB* de *E. coli*.

Se sabe que el producto del gen *fabR* actúa como represor de la expresión de los genes *fabA* y *fabB*. También se sabe que FadR funciona como activador de los mismos genes. El FabR y las secuencias de unión consenso predichas se publicaron anteriormente por Zhang *et al.*, J. Biol. Chem. 277: 13558-15565, 2002. En la figura 15 se muestran las secuencias de unión consenso y su ubicación en lo que se refiere a los genes *fabA* y *fabB* de *E. coli*.

Se creó una cepa de *E. coli* deficiente en *fabR*. Se usaron los cebadores TrmA_R_NotI y FabR_FOP para amplificar aproximadamente 1000 pb en el sentido de 5' de *fabR* y se usaron los cebadores SthA_F_Bam y FabR_ROP para amplificar aproximadamente 1000 pb en el sentido de 3' de *fabR* (véase la tabla D). Se aplicó PCR por solapamiento para crear un constructo para la delección en marco del gen *fabR* completo. Se clonó el constructo de delección de *fabR* en el plásmido sensible a la temperatura pKOV3, que contenía SacB para contraselección, y se realizó una delección cromosómica de *fabR* según el método de Church y colaboradores (Link *et al.*, J. Bact. 179:6228-6237, 1997).

Tabla 17: Cebadores de desactivación de *fabR*

Nombre del cebador	Secuencia del cebador (de 5' a 3')
TrmA_R- Not	ATAGTTTAGCGGCCGCAAATCGAGCTGGATCAGGATTA
FabR_FOP	AGGATTCAGATCGTGATGTAATGAAACAAGCAAATCAAGATAGA
SthA_F_Bam	GGCGGATCCGAATCACTACGCCACTGTTCC
FabR_ROP	TTGATTTGCTTGTTTCATTACATCACGATGTCTGAATCCTTG

Ejemplo 15. Construcción de huéspedes de producción

La tabla 18 identifica los homólogos de muchos de los genes descritos en el presente documento que se sabe que se expresan en microorganismos que producen biodiésel, alcoholes grasos e hidrocarburos. Para aumentar la producción de ácidos grasos y, por tanto, la producción de hidrocarburos en huéspedes de producción tales como los identificados en la tabla 18, pueden expresarse genes heterólogos, tales como los de *E. coli*. Un experto habitual

5 en la técnica también apreciará que también pueden expresarse, sobreexpresarse o atenuarse genes que son endógenos para los microorganismos proporcionados en la tabla 18 usando los métodos descritos en el presente documento. Además, los genes que se describen en la tabla 18 pueden expresarse, sobreexpresarse o atenuarse en huéspedes de producción que producen de manera endógena hidrocarburos para permitir la producción de hidrocarburos específicos con longitud de cadena de carbono, puntos de saturación y puntos de ramificación definidos.

Tabla 18: Huéspedes de producción de hidrocarburos

Organismo	Nombre del gen	N.º de registro/Seq ID/Loci	N.º EC
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	<i>accA</i>	YP_388034	6.4:1.2
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G22	<i>accC</i>	YP_388573/YP_388033	6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G23	<i>accD</i>	YP_388034	6.4.1.2
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G28	<i>fabH</i>	YP_388920	2.3.1.180
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G29	<i>fabD</i>	YP_388786	2.3.1.39
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G30	<i>fabG</i>	YP_388921	1.1:1.100
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G31	<i>acpP</i>	YP_388922/YP_389150	3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G32	<i>fabF</i>	YP_388923	2.3.1.179
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G33	<i>gpsA</i>	YP_389667	1.1.1.94
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G34	<i>ldhA</i>	YP_388173/YP_390177	1.1.1.27, 1.1.1.28
<i>Erwinia (micrococcus) amilovora</i>	<i>accA</i>	942060 – 943016	6.4.1.2
<i>Erwinia (micrococcus) amilovora</i>	<i>accB</i>	3440869 – 3441336	6.4.1.2
<i>Erwinia (micrococcus) amilovora</i>	<i>accC</i>	3441351 – 3442697	6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Erwinia (micrococcus) amilovora</i>	<i>accD</i>	2517571 – 2516696	6.4.1.2
<i>Erwinia (micrococcus) amilovora</i>	<i>fade</i>	1003232 – 1000791	1.3.99.-
<i>Erwinia (micrococcus) amilovora</i>	<i>plsB(D311E)</i>	333843 – 331423	2.3.1.15
<i>Erwinia (micrococcus) amilovora</i>	<i>aceE</i>	840558 – 843218	1.2.4.1
<i>Erwinia (micrococcus) amilovora</i>	<i>aceF</i>	843248 – 844828	2.3.1.12
<i>Erwinia (micrococcus) amilovora</i>	<i>fabH</i>	1579839 – 1580789	2.3.1.180
<i>Erwinia (micrococcus) amilovora</i>	<i>fabD</i>	1580826 – 1581749	2.3.1.39
<i>Erwinia (micrococcus) amilovora</i>	<i>fabG</i>	CAA74944	1.1.1.100
<i>Erwinia (micrococcus) amilovora</i>	<i>acpP</i>	1582658 – 1582891	3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Erwinia (micrococcus) amilovora</i>	<i>fabF</i>	1582983 – 1584221	2.3.1.179
<i>Erwinia (micrococcus) amilovora</i>	<i>gpsA</i>	124800 – 125810	1.1.1.94
<i>Erwinia (micrococcus) amilovora</i>	<i>ldhA</i>	1956806 – 1957789	1.1.1.27, 1.1.1.28
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	<i>accA</i>	ZP_00618306	6.4.1.2
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	<i>accB</i>	ZP_00618387	6.4.1.2
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	<i>accC</i>	ZP_00618040/ZP_0618387	6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	<i>accD</i>	ZP_00618306	6.4.1.2
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	<i>fade</i>	ZP_00617773	1.3.99.-
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	<i>plsB(D311E)</i>	ZP_00617279	2.3.1.15
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	<i>aceE</i>	ZP_00617600	1.2.4.1
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	<i>aceF</i>	ZP_00619307	2.3.1.12
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	<i>fabH</i>	ZP_00618003	2.3.1.180
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	<i>fabD</i>	ZP_00617602	2.3.1.39
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	<i>fabG</i>	ZP_00615651	1.1.1.100
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	<i>acpP</i>	ZP_00617604	3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	<i>fabF</i>	ZP_00617605	2.3.1.179
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	<i>gpsA</i>	ZP_00618825	1.1.1.94
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	<i>ldhA</i>	ZP_00618879	1.1.1.28
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>accA</i>	YP_425310	6.4.1.2
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>accB</i>	YP_427521	6.4.1.2
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>accC</i>	YP_427522/YP_425144 / YP_427028/YP_426209 / YP_427404	6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>accD</i>	YP_428511	6.4.1.2
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>fadE</i>	YP_427035	1.3.99.-
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>aceE</i>	YP_427492	1.2.4.1
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>aceF</i>	YP_426966	2.3.1.12
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>fabH</i>	YP_426754	2.3.1.180
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>fabD</i>	YP_425507	2.3.1.39

ES 2 536 405 T3

<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>fabG</i>	YP_425508/YP_425365	1.1.1.100
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>acpP</i>	YP_425509	3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>fabF</i>	YP_425510/YP_425510 / YP_425285	2.3.1.179
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>gpsA</i>	YP_428652	1.1.1.94 1.1.1.27
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>ldhA</i>	YP_426902/YP_428871	1.1.1.28
<i>Vibrio furnissii</i>	<i>accA</i>		1, 16 6.4.1.2
<i>Vibrio furnissii</i>	<i>accB</i>		2, 17 6.4.1.2
<i>Vibrio furnissii</i>	<i>accC</i>		3, 18 6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Vibrio furnissii</i>	<i>accD</i>		4, 19 6.4.1.2
<i>Vibrio furnissii</i>	<i>fade</i>		5, 20 1.3.99.-
<i>Vibrio furnissii</i>	<i>plsB(D3311E)</i>		6, 21 2.3.1.15
<i>Vibrio furnissii</i>	<i>aceE</i>		7, 22 1.2.4.1
<i>Vibrio furnissii</i>	<i>aceF</i>		8, 23 2.3.1.12
<i>Vibrio furnissii</i>	<i>fabH</i>		9, 24 2.3.1.180
<i>Vibrio furnissii</i>	<i>fabD</i>		10, 25 2.3.1.39
<i>Vibrio furnissii</i>	<i>fabG</i>		11, 26 1.1.1.100
<i>Vibrio furnissii</i>	<i>acpP</i>		12, 27 3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Vibrio furnissii</i>	<i>fabF</i>		13, 28 2.3.1.179
<i>Vibrio furnissii</i>	<i>gpsA</i>		14, 29 1.1.1.94
<i>Vibrio furnissii</i>	<i>ldhA</i>		15, 30 1.1.1.27, 1.1.1.28
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	<i>accA</i>	ZP_01643799	6.4.1.2
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	<i>accB</i>	ZP_01644036	6.4.1.2
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	<i>accC</i>	ZP_01644037	6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	<i>accD</i>	ZP_01644801	6.4.1.2
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	<i>fade</i>	ZP_01645823	1.3.99.-
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	<i>plsB(D311E)</i>	ZP_01644152	2.3.1.15
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	<i>aceE</i>	ZP_01644724	1.2.4.1
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	<i>aceF</i>	ZP_01645795	2.3.1.12
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	<i>fabH</i>	ZP_01643247	2.3.1.180
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	<i>fabD</i>	ZP_01643535	2.3.1.39
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	<i>fabG</i>	ZP_01643062	1.1.1.100
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	<i>acpP</i>	ZP_01643063	3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	<i>fabF</i>	ZP_01643064	2.3.1.179
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	<i>gpsA</i>	ZP_01643216	1.1.1.94
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	<i>ldhA</i>	ZP_01645395	1.1.1.28
<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	<i>accA</i>	NP_442942	6.4.1.2
<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	<i>accB</i>	NP_442182	6.4.1.2
<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	<i>accC</i>	NP_442228	6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	<i>accD</i>	NP_442022	6.4.1.2
<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	<i>fabD</i>	NP_440589	2.3.1.39
<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	<i>fabH</i>	NP_441338	2.3.1.180
<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	<i>fabF</i>	NP_440631	2.3.1.179
<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	<i>fabG</i>	NP_440934	1.1.1.100, 3.1.26.3
<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	<i>fabZ</i>	NP_441227	4.2.1.60
<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	<i>FabI</i>	NP_440356	1.3.1.9
<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	<i>acp</i>	NP_440632	
<i>Synechocystis sp. PCR6803</i>	<i>fadD</i>	NP_440344	6.2.1.3
<i>Synechococcus elongates PCC7942</i>	<i>accA</i>	YP_400612	6.4.1.2
<i>Synechococcus elongates PCC7942</i>	<i>accB</i>	YP_401581	6.4.1.2
<i>Synechococcus elongates PCC7942</i>	<i>accC</i>	YP_400396	6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Synechococcus elongates PCC7942</i>	<i>accD</i>	YP_400973	6.4.1.2
<i>Synechococcus elongates PCC7942</i>	<i>fabD</i>	YP_400473	2.3.1.39
<i>Synechococcus elongates PCC7942</i>	<i>fabH</i>	YP_400472	2.3.1.180
<i>Synechococcus elongates PCC7942</i>	<i>fabF</i>	NP_399556	2.3.1.179
<i>Synechococcus elongates PCC7942</i>	<i>fabG</i>	YP_399703	1.1.1.100, 3.126.3
<i>Synechococcus elongates PCC7942</i>	<i>fabZ</i>	YP_399947	4.2.1.60
<i>Synechococcus elongates PCC7942</i>	<i>fabI</i>	YP_399145	1.3.1.9
<i>Synechococcus elongates PCC7942</i>	<i>Acp</i>	YP_399555	

<i>Synechococcus elongates PCC7942</i>	<i>fadD</i>	YP_399935	6.2.1.3
--	-------------	-----------	---------

Para la tabla 18, los números de registro son de GenBank, versión 159.0 del 15 de abril de 2007, los números EC son de KEGG, versión 42.0 de abril de 2007 (más actualizaciones diarias hasta e incluyendo el 09/05/07), los resultados para la cepa de *Erwinia amilovor* Ea273 se toman del centro de secuenciación de Sanger, secuencia aleatoria completada el 9/5/07, las posiciones para *Erwinia* representan ubicaciones en elseudocromosoma de Sanger, las secuencias de *Vibrio furnisii* M1 son delseudocromosoma LS9 VFM1, versión v2, del 28/9/06, e incluyen el gen completo, y también pueden incluir la secuencia flanqueante.

Ejemplo 16. Cepas de producción a modo de ejemplo adicionales

La tabla 19 proporciona cepas de producción a modo de ejemplo adicionales. Se describen dos rutas de biosíntesis de ejemplo para producir ácidos grasos, alcoholes grasos y ésteres de cera. Por ejemplo, la tabla 19 proporciona los ejemplos 1 y 2 que producen ácidos grasos. La cepa huésped de producción usada para producir ácidos grasos en el ejemplo 1 es una célula huésped de producción que se modifica por ingeniería genética para tener las actividades enzimáticas de síntesis indicadas mediante las marcas "x" en las filas que identifican los genes (véase "x" que identifica actividad acetil-CoA carboxilasa, tio-esterasa y acil-CoA sintasa). Las células huésped de producción pueden seleccionarse de bacterias, levaduras y hongos. Estos genes también pueden transformarse en una célula huésped de producción que se modifica para contener una o más de las manipulaciones genéticas descritas en la figura 1. Tal como se proporciona en la tabla 19, pueden crearse huéspedes de producción adicionales usando los genes exógenos indicados.

Tabla 19: Combinación de genes útiles para preparar cepas de producción modificadas por ingeniería genética

Péptido	Fuentes de genes	Genes	Ácidos grasos		Alcoholes grasos		cera/ésteres grasos	
			ejemplo 1	ejemplo 2	ejemplo 1	ejemplo 2	ejemplo 1	ejemplo 2
acetil-CoA carboxilasa	<i>E. coli</i>	accABCD	X	X	X	X	X	X
tio-esterasa	<i>E. coli</i>	tesA	X		X		X	X
	<i>Cinnamomum camphora</i>	ccFatB						
	<i>Umbellularia californica</i>	umFatB		X		X		
	<i>Cuphea hookeriana</i>	chFatB2						
	<i>Cuphea hookeriana</i>	chFatB3						
	<i>Cuphea hookerian</i>	chFatA						
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtFatA1						
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtFatB1 [M141T]						
acil-CoA sintasa	<i>E. coli</i>	fadD	X	X	X	X	X	X
acil-CoA reductasa	<i>Bombyx mori</i>	bFAR						
	<i>Acinetobacter baylyi ADP1</i>	acr 1			X		X	
	<i>Simmondsia chinensis</i>	jjFAR				X		X
	<i>Triticum aestivum</i>	TTA1						
	<i>Mus musculus</i>	mFAR1						
	<i>Mus musculus</i>	FAR2						
	<i>Acinetpbacter sp M1</i>	acr M1						
	<i>Homo sapiens</i>	hFAR						
Éster sintasa / alcohol acil-transferasa	<i>Fundibacter jadensis</i> DSM 12178	WST9						
	<i>Acinetobacter sp. HO1-N</i>	WSHN					X	

	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	WSadp1						X
	<i>Mus musculus</i>	mWS						
	<i>Homo sapiens</i>	hWS						
	<i>Fragaria ananassa</i> x	SAAT						
	<i>Malus domestica</i> x	MpAAT						
	<i>Simmondsia chinensis</i>	JjWS (AAD38041)						
Descarbonilasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	cer1						
	<i>Oryzasativa</i>	cer1						
Proteína transportadora	<i>Acinetobacter sp. HO1-N</i>	desconocido					X	X
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cer5						

Ejemplo 17. Uso de acil-CoA sintasas adicionales para sobreproducir acil-CoA

Pueden expresarse homólogos de *fadD* de *E. coli* en *E. coli* sintetizando genes con codones optimizados de la secuencia deseada de *M. tuberculosis* HR7Rv (NP_217021, FadD35), *B. subtilis* (NP_388908, YhfL), *Saccharomyces cerevisiae* (NP_012257, Faa3p) y *P. aeruginosa* PAO1 (NP_251989). Los genes sintéticos pueden diseñarse para incluir proyecciones compatibles con *NcoI* e *HindIII*. Entonces pueden clonarse las acil-CoA sintasas en el vector pTrcHis2 digerido con *NcoI/HindIII* (Invitrogen Corp., Carlsbad, California) tal como se describió anteriormente y expresarse en *E. coli* cepa MG1655 Δ *fadE*. Tras la expresión en *E. coli*, se aumentará la producción de acil-CoA.

También pueden producirse derivados de ácidos grasos tales como FAEE mediante cotransformación de *E. coli* cepa MG1655 Δ *fadE* con diversas acil-CoA sintasas en el vector pTrcHis2 con un plásmido compatible derivado de pCL1920, que contiene la éster sintasa de *A. baylyi* o el gen de tioesterasa de *Cuphea hookeriana*. El huésped de producción resultante producirá FAEE cuando se cultive en medios que contienen etanol tal como se describió anteriormente.

Ejemplo 18. Uso de acil-CoA sintasas adicionales para sobreproducir acil-CoA

Se conocen las secuencias de ADN o secuencias de proteína de numerosos homólogos de *FadD* de *E. coli*. Sin embargo, sólo se han descrito las propiedades bioquímicas de unos pocos. Véase, por ejemplo, Knoll *et al.*, J. Biol. Chem. 269(23):16348-56, 1994; Shockey *et al.*, Plant Physiol. 132: 1065-1076, 2003. Además, se desconoce su capacidad para expresarse en una forma activa a niveles significativos para fines comerciales. Para explorar la posibilidad de usar acil-CoA sintasas heterólogas para la producción de ésteres, se clonaron varios genes de acil-CoA sintasas y se expresaron de la siguiente manera. Aunque este ejemplo describe la transformación del huésped de producción con plásmidos separados para los genes de tioesterasa, éster sintasa y acil-CoA sintasa, estos genes pueden incorporarse alternativamente juntos en un plásmido para transformar el huésped de producción.

1) Construcción del plásmido pOP-80

Para sobreexpresar los genes, se construyó un plásmido de bajo número de copias basado en el vector comercial pCL1920 (Lerner e Inouye, (1990) NAR 18: 4631) que porta un promotor transcripcional fuerte mediante digestión de pCL1920 con las enzimas de restricción *AflIII* y *SfoI* (New England BioLabs Inc. Ipswich, MA). Se produjeron tres fragmentos de secuencia de ADN mediante esta digestión. Se purificó en gel el fragmento de 3737 pb usando un kit de purificación en gel (Qiagen, Inc. Valencia, CA). En paralelo, se amplificó un fragmento de secuencia de ADN que contenía el promotor de *trc* y la región de *lacI* del plásmido comercial pTrcHis2 (Invitrogen, Carlsbad, CA) mediante PCR usando los cebadores LF302 (5'-atatgacgtcGGCATCCGCTTACAGACA-3') y LF303 (5'-aattcttaagTCAGGAGAGCGTTCACCGACAA-3'). Estos dos cebadores también introdujeron sitios de reconocimiento para las enzimas *ZraI*(gacgtc) y *AflIII*(cttaag), respectivamente, al final de los productos de PCR. Tras la amplificación, se purificaron los productos de PCR usando un kit de purificación de PCR (Qiagen, Inc. Valencia, CA) y se digirieron con *ZraI* y *AflIII* siguiendo las recomendaciones del proveedor (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA). Tras la digestión, se purificó en gel el producto de PCR y se ligó con el fragmento de secuencia de ADN de 3737 pb derivado de pCL1920. Tras la transformación con la mezcla de ligación en células químicamente competentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA), se seleccionaron los transformantes en placas de agar Luria que contenían espectinomicina 100 μ g/ml. Muchas colonias eran visibles tras la incubación durante la noche a 37°C. Se purificaron los plásmidos presentes en estas colonias, se analizaron con enzimas de restricción y entonces se secuenciaron. Se conservó un plásmido producido de esta manera, se denominó pOP-80 y se usó para

experimentos de expresión adicionales. En la figura 17 se muestra un mapa de pOP-80.

Se corroboró la secuencia de ADN de regiones relevantes del plásmido pOP-80. Se encontró que en las uniones en las que se ligaron los 2 fragmentos, faltaban 3-4 bases en cada extremo, esto se provocó probablemente por una actividad exonucleasa que contaminaba una de las enzimas de restricción. Es probable que estas pequeñas 5 deleciones no afecten a ninguna función del plásmido relevante. Se usó el plásmido resultante para todos los experimentos de expresión descritos en este ejemplo. La secuencia completa del plásmido se da a conocer como SEQ ID NO: 1 (figura 18).

2) Clonación de *fadD35* a partir de *Mycobacterium tuberculosis* HR7Rv

Se sintetizó un gen con codones optimizados de *E. coli* mediante DNA 2.0 Inc. (Menlo Park, CA), usando la 10 secuencia de proteína del gen *fadD35* depositada en el NCBI con el código de registro NP_217021. El gen sintético contenía un sitio NcoI único en el extremo 5' y un sitio EcoRI único en el extremo 3'. El gen sintético lo proporcionó DNA 2.0 Inc. clonado en el plásmido pJ201:16084. Se liberó el gen *fad35* de este plásmido mediante digestión con NcoI y EcoRI. En SEQ ID NO: 1 se muestra la secuencia de este fragmento. Se ligó el fragmento de secuencia de ADN resultante (SEQ ID NO: 2, figura 19) con pOP-80, que se digirió previamente con NcoI y EcoRI. Se transformó 15 la mezcla de ligación en células químicamente competentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA), que entonces se sembraron en placas de agar Luria que contenían espectinomicina 100 µg/ml y se incubaron a 37°C durante la noche. Se examinaron las colonias que aparecieron al día siguiente y se identificó una cepa que contenía el plásmido correcto. El plásmido se denominó pDS9.

3) Clonación de *fadD1* a partir de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Se sintetizó un gen con codones optimizados de *E. coli* mediante DNA 2.0 Inc. (Menlo Park, CA) usando la 20 secuencia de proteína del gen *fadD1* depositada en el NCBI con el código de registro NP_251989. El gen sintético contenía un sitio BspHI único en el extremo 5' y un sitio EcoRI único en el extremo 3'. El gen sintético lo proporcionó DNA 2.0, Inc. y se clonó en el plásmido pJ201:16083. Se liberó el gen *fadD1* a partir de este plásmido mediante digestión con BspHI y EcoRI. En SEQ ID NO: 3 (figura 20) se muestra la secuencia de este fragmento. Se ligó el 25 fragmento de secuencia de ADN resultante con pOP-80, que se digirió previamente con NcoI y EcoRI. Se transformó la mezcla de ligación en células químicamente competentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA), que entonces se sembraron en placas de agar Luria que contenían espectinomicina 100 µg/ml y se incubaron a 37°C durante la noche. Se examinaron las colonias que aparecieron al día siguiente. Se identificó una cepa que contenía el plásmido correcto. El plásmido se denominó pDS8.

4) Clonación de *yhfL* a partir de *Bacillus subtilis*

Se amplificó el gen *yhfL* mediante PCR usando la secuencia de ADN cromosómica de *Bacillus subtilis* 1168 como molde, y dos cebadores diseñados basándose en la secuencia de ADN depositada en el NCBI con el código de registro NC_000964. La secuencia de los 2 cebadores fue:

BsyhfLBspHIF: 5'-CATCATGAATCTTGTTC-3' (SEQ ID NO: 4, figura 21)

35 BsyhfLEcoR: 5'-CGGAATTCTTATTGGGGCAAATATC-3' (SEQ ID NO: 5, figura 22)

Estos dos cebadores introdujeron un sitio de reconocimiento de BspHI en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento de EcoRI en el extremo 3'. Se clonó el producto de PCR directamente en el vector pCR-Blunt II-TOPO usando el kit de clonación por PCR Zero Blunt TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Un plásmido que portaba el gen *yhfL* se denominó pDS1. Para subclonar *yhfL*, se digirió el plásmido pDS1 con BspHI y EcoRI. Se purificó en gel el 40 fragmento de secuencia de ADN resultante (SEQ ID NO: 6, figura 23) y se clonó en pOP-80, que se digirió previamente con NcoI y EcoRI. El plásmido que portaba el gen *yhfL* de *B. subtilis* clonado en pOP-80 se denominó pDS4.

5) Clonación de *faa3p* a partir de *Saccharomyces cerevisiae* (NP_012257)

Se amplificó el gen *faa3p* mediante PCR usando una secuencia de ADN cromosómica de *Saccharomyces cerevisiae* comercial, ATCC 204508D (American Type Culture Collection, Manassas, VA) como molde, y dos cebadores que se diseñaron basándose en la secuencia de ADN depositada en el NCBI con el código de registro NC_001141. La secuencia de los dos cebadores fue:

Scfaa3pPciF: 5'-CGACATGTCCGAACAACAC-3' (SEQ ID NO: 7, figura 24)

Scfaa3pPciI: 5'-GCAAGCTTCTAAGAATTTCTTTG-3' (SEQ ID NO: 8, figura 25)

50 Estos dos cebadores introdujeron un sitio de reconocimiento de PciI en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento de HindIII en el extremo 3'.

Se clonó el producto de PCR directamente en el vector pCR-Blunt II-TOPO usando el kit de clonación por PCR Zero Blunt TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Un plásmido que portaba el gen *faa3p* se denominó pDS2. Para subclonar

faa3p, se digirió el plásmido pDS2 con PciI y HindIII. Se purificó en gel el fragmento de secuencia de ADN (SEQ ID NO: 9, figura 26) y se clonó en pOP-80, que se digirió previamente con NcoI y HindIII. El plásmido que portaba el gen *fact3p* de *S. cerevisiae* clonado en pOP-80 se denominó pDS5.

6) Clonación de ZP_01644857 a partir de *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3

5 La secuencia de gen estructural para la proteína ZP_01644857 está disponible en el NCBI como parte del locus NZ_AAVZ01000044. Se amplificó el gen mediante PCR usando una secuencia de ADN cromosómica de *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3 como molde, y dos cebadores diseñados basándose en la secuencia de ADN depositada. La secuencia de los dos cebadores era:

Smprk59BspF: 5'-AGTCATGAGTCTGGATCG-3' (SEQ ID NO: 10, figura 27)

10 Smprk59HindR: 5'-GGAAGCTTACGGGGCGGGCG-3' (SEQ ID NO: 11, figura 28)

Estos dos cebadores introdujeron un sitio de reconocimiento de BspHI en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento de HindIII en el extremo 3'.

Se clonó el producto de PCR directamente en el vector pCR-Blunt II-TOPO usando el kit de clonación por PCR Zero Blunt TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Un plásmido que portaba el gen que codifica para la proteína ZP_01644857 se denominó pDS3. Para facilitar la subclonación adicional del gen, se eliminó un sitio BspHI interno mediante mutagénesis dirigida al sitio usando el cebador PrkBsp-(5'-GCGAACGGCCTGGTCTTTATGAAGTTCGGTGG-3') (SEQ ID NO: 12, figura 29) y el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios Quick-Change (Stratagene, La Jolla, CA). Tras corroborarse la mutación apropiada mediante secuenciación del ADN, se digirió el plásmido resultante con BspHI y HindIII, y se denominó pDS6. Se purificó en gel el fragmento de secuencia de ADN (SEQ ID NO: 13, figura 30) y se clonó en pOP-80 previamente digerido con NcoI y HindIII. El plásmido que portaba el gen que codifica para la proteína ZP_01644857 clonado en pOP-80 se denominó pDS7. En SEQ ID NO: 14 (figura 31) se da a conocer la secuencia de proteína de ZP_01644857.

7) Construcción de cepas para producir ésteres grasos.

En primer lugar se transformó una cepa de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pETDuet-1-tesA (descrito en el ejemplo 2) que portaba el gen *tesA* de *E. coli*, y el plásmido pHZ1.97 (descrito en el ejemplo 12) que portaba el gen de éster sintetasa *atfA2*, respectivamente. Ambos genes estaban bajo el promotor de T7 inducible por IPTG. Se transformaron dos transformantes independientes que portaban ambos plásmidos con cada uno de los plásmidos recombinantes que portaban los genes *fadD* heterólogos, y se seleccionaron en placas de agar Luria que contenían carbenicilina 100 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml y espectinomicina 100 µg/ml. Se sometieron a prueba tres colonias independientes que portaban los tres plásmidos para determinar la producción de ésteres grasos.

8) Análisis de ésteres grasos producidos usando ZP_01644857 a partir de *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3

Para evaluar el uso de la proteína ZP_01644857 de *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3 en un huésped de producción para producir ésteres grasos, se transformó una cepa de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pETDuet-1-tesA (descrito en el ejemplo 2) que portaba el gen *tesA* de *E. coli*, el plásmido pHZ1.97 (descrito en el ejemplo 12) que portaba el gen de éster sintetasa *atfA2* y el plásmido pDS7 que portaba el gen que codifica para la proteína ZP_01644857 (descrito anteriormente en este ejemplo). Se fermentó este huésped de producción para producir ésteres grasos tal como se describió en el ejemplo 13. Como control, se usó una segunda cepa de *E. coli*, BL21(DE3)Δ*fadE*, que contenía los plásmidos pETDuet-1-tesA, pHZ1.97 y pCL1920, como huésped de producción para producir ésteres grasos.

La tabla 20 a continuación muestra los rendimientos de ésteres grasos a partir de estos huéspedes de producción.

Tabla 20. Rendimientos de ésteres grasos a partir de un huésped de producción que producía ZP_01644857

Tipo de éster:	C ₂ C _{12:1} , mg/l	C ₂ C _{12:0} , mg/l	C ₂ C _{14:1} , mg/l	C ₂ C _{14:0} , mg/l	C ₂ C _{16:1} , mg/l	C ₂ C _{16:0} , mg/l	C ₂ C _{18:1} , mg/l	C ₂ C _{18:0} , mg/l	Total, mg/l ^c
Control ^a	0,0	0,0	0,0	1,78	9,80	5,65	33,7	0,00	50,93
<i>fadD</i> ZP_01644857b	1,49	3,57	3,68	33,22	52,77	43,09	91,11	10,08	239,01

^a Control: cepa BL21(DE3) Δ*fadE*, que contiene los plásmidos pETDuet-1-tesA, pHZ1.97 y pCL1920.

^b Cepa BL21(DE3) Δ*fadE*, que contiene los plásmidos pETDuet-1-tesA, pHZ1.97 y pDS7.

^c Estos valores representan el promedio de 3 cultivos.

Ejemplo 19. Regulación por disminución de la beta-oxidación

Este ejemplo describe la creación de una cepa de *E. coli* MG1655 Δ*fadE* Δ*ydiO*.

La degradación de ácidos grasos puede eliminarse o atenuarse atenuando cualquiera de las reacciones enzimáticas de β -oxidación descritas anteriormente (véase la figura 3). Por ejemplo, puede modificarse adicionalmente por ingeniería genética *E. coli* cepa MG1655 Δ *fadE* usando cebadores para amplificar en el sentido de 5' de *ydiO* y cebadores adicionales para amplificar en el sentido de 3' de *ydiO*. Entonces puede usarse PCR de solapamiento para crear un constructo para la delección en marco del gen *ydiO* completo. Entonces se clona el constructo de delección de *ydiO* en el plásmido sensible a la temperatura pKOV3, que contiene un gen *sacB* para la contraselección, y se realiza una delección cromosómica de *ydiO* según el método de Link *et al.*, J. Bact. 179:6228-6237, 1997. La cepa resultante no podrá degradar ácidos grasos ni acil graso-CoA. Se describen métodos adicionales de generación de una doble desactivación de *fadE* y *ydiO* en Campbell *et al.*, Mol. Microbiol. 47:793-805, 2003.

También es posible evitar la degradación de ácidos grasos usando un huésped de producción que no contiene la ruta de beta-oxidación. Por ejemplo, se han secuenciado varias especies de *Streptococcus* y no se ha encontrado ninguno de los genes implicados en la beta-oxidación.

Ejemplo 20. Identificación de éster sintasas adicionales

Este ejemplo proporciona éster sintasas adicionales y métodos de uso de tales sintasas para la producción de ésteres grasos.

Usando bioinformática, se identificaron éster sintasas adicionales. Estas éster sintasas contienen motivos que difieren de otros motivos conocidos, tales como los motivos encontrados en ADP1. En la tabla 21 a continuación se indican las diferencias en los motivos.

Tabla 21: Comparación de motivos de éster sintasas

Motivos de ADP1	HHAXVDGV	NDVVLA	GALRXIL	PLXAMVP	ISNVPGP	REPLYXNGA
Proteína hipotética BCG_3544c [<i>Mycobacterium bovis</i> BCG cepa Pasteur 1173P2] gi/121639399	HH <u>S</u> LIDGY	NDV <u>A</u> LA	GGLRR <u>F</u> L	SLIV <u>V</u> LP	<u>V</u> SNVPGP	EDVLILR <u>G</u> S
Proteína de función desconocida UPF0089 [<i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK] gi/145221651	HHALVDGY	NDV <u>A</u> LA	GGLR <u>K</u> FL	SLIA <u>F</u> LP	<u>V</u> SNVPGP	REPLYF <u>N</u> G <u>S</u>
Proteína de función desconocida UPF0089 [<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1] gi/120406715	HHALVDGY	NDV <u>A</u> LA	GGLR <u>K</u> FL	SLIA <u>F</u> LP	<u>V</u> SNVPGP	REPLYF <u>N</u> G <u>S</u>

Las secuencias identificadas pueden clonarse usando técnicas de biología molecular convencionales. Estas secuencias pueden expresarse usando los vectores descritos en el presente documento y usarse para preparar diversos ésteres grasos. También pueden usarse los motivos para identificar otras éster sintasas.

Ejemplo 21. Caracterización de productos

Para caracterizar y cuantificar los alcoholes grasos y ésteres grasos, se usó detección por cromatografía de gases (CG) acoplada con espectros de masas por impacto electrónico (EM). En primer lugar se derivatizaron muestras de alcoholes grasos con un exceso de N-trimetilsilil (TMS)-imidazol para aumentar la sensibilidad de la detección. Los ésteres grasos no requirieron derivatización. Se disolvieron tanto derivados de alcohol graso-TMS como ésteres grasos en un disolvente volátil apropiado, tal como acetato de etilo.

Se analizaron las muestras en una columna capilar DP-5 de 30 m usando el siguiente método. Tras una inyección sin fraccionamiento de 1 μ l en la columna de CG/EM, se mantuvo el horno a 100°C durante 3 minutos. Se aumentó la temperatura con pendiente hasta 320°C a una velocidad de 20°C/minuto. Se mantuvo el horno a 320°C durante 5 minutos adicionales. La velocidad de flujo del gas portador helio fue de 1,3 ml/minuto. El cuadrupolo de EM realizó un barrido desde 50 hasta 550 m/z. Se compararon los tiempos de retención y patrones de fragmentación de picos de producto con referencias auténticas para confirmar la identidad del pico.

Por ejemplo, el éster etílico de ácido hexadecanoico eluyó a 10,18 minutos (figura 16A y figura 16B). El ión padre de 284 unidades de masa se observó fácilmente. Fueron más abundantes los iones hijo producidos durante la

fragmentación de masas. Esto incluyó el ión hijo más prevalente de 80 unidades de masa. El alcohol graso derivatizado, hexadecanol-TMS, eluyó a 10,29 minutos y pudo observarse el ión padre de 313. El ión más prevalente fue el ión M-14 de 299 unidades de masa.

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

Equivalentes

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

REIVINDICACIONES

1. Célula recombinante para su uso en la producción de un alcohol graso que comprende (i) un gen que codifica para una acil-CoA sintasa (*fadD*), (ii) un gen que codifica para una acil-CoA reductasa y (iii) un gen que codifica para una tioesterasa, en la que dichos genes están sobreexpresados.
- 5 2. Célula recombinante según la reivindicación 1, en la que la célula comprende un gen que codifica para una proteína transportadora.
3. Célula recombinante según la reivindicación 1, en la que la célula es una célula de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolitica*, *Escherichia coli*, *Arthrobacter*, *Rhodotorula glutinins*, *Acinetobacter*, *Candida lipolitica*, *Botryococcus braunii*, *Vibrio furnissii*, *Micrococcus leuteus*, *Stenotrophomonas maltophilia* o *Bacillus subtilis*.
- 10 4. Célula recombinante según la reivindicación 1, en la que la célula es una célula cianobacteriana, preferiblemente una célula de *Synechocystis* sp. PCC6803 o *Synechococcus elongatus* PCC7942.
5. Célula recombinante según la reivindicación 1, en la que la célula es una célula vegetal, animal, humana, bacteriana, de levadura o de hongo filamentoso.
- 15 6. Célula recombinante según la reivindicación 3, en la que la célula es una célula de *Arthrobacter* AK 19, *Acinetobacter* sp. cepa M-1, *E. coli* B, *E. coli* C, *E. coli* K o *E. coli* W.
7. Célula recombinante según la reivindicación 1, en la que el gen que codifica para una acil-CoA sintasa está modificado para estar optimizado para su expresión en la célula recombinante.
8. Célula recombinante según la reivindicación 1, que comprende además
- 20 (i) al menos uno de un gen *pdh*, *panK*, *aceEF*, *fabH*, *fabD*, *fabG*, *acpP* y *fabF* que está modificado para expresarse o sobreexpresarse;
- (ii) al menos uno de un gen *fadE*, *gpsA*, *ldhA*, *pflB*, *adhE*, *pta*, *poxB*, *ackA* y *ackB* que está modificado de modo que la expresión del gen está atenuada; o
- (iii) al menos un gen modificado de *plsB* y *sfa*.
- 25 9. Método para producir alcoholes grasos en una célula recombinante que comprende
- (i) obtener la célula recombinante según la reivindicación 1, 2 ó 3;
- (ii) cultivar la célula recombinante en condiciones adecuadas para la expresión; y
- (iii) producir alcoholes grasos.

30

Figura 1

Los números de registro son de NCBI, GenBank, versión 159.0 del 15 de abril de 2007
 Los números EC son de KEGG, versión 42.0 de abril de 2007 (más actualizaciones diarias hasta e inclusive la fecha de esta patente).

CATEGORÍA	GEN	NOMBRE	REGISTRO	NUMERO EC	MODIFICACIÓN	USO	MICROORGANISMO
		1. Aumento de la producción de ácidos grasos / Aumento de la producción de productos					
		aumento de acil-CoA					
		reducción del catabolismo de derivados y productos intermedios					
		reducción de la inhibición por retroalimentación					
		atenuación de otras rutas que consumen ácidos grasos					
	accA	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad A (carboxiltransferasa alfa)	AA_C73296, NP_414727	6.4.1.2	Sobreexpresión	aumento de la producción de malonil-CoA	<i>Escherichia coli</i> , <i>Lactococci</i>
	accB	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad B (BCCP: proteína transportadora de biotina y carboxilo)	NP_417721	6.4.1.2	Sobreexpresión	aumento de la producción de malonil-CoA	<i>Escherichia coli</i> , <i>Lactococci</i>
	accC	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad C (biotina carboxilasa)	NP_417722	6.4.1.2, 6.3.4.14	Sobreexpresión	aumento de la producción de malonil-CoA	<i>Escherichia coli</i> , <i>Lactococci</i>
	accD	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad D (carboxiltransferasa beta)	NP_416819	6.4.1.2	Sobreexpresión	aumento de la producción de malonil-CoA	<i>Escherichia coli</i> , <i>Lactococci</i>
	accE	Pruvato deshidrogenasa, subunidad E1	NP_414656, AA_C73226	1.2.4.1	Sobreexpresión	aumento de la producción de malonil-CoA	<i>Escherichia coli</i>

aceF	Piruvato deshidrogenasa, subunidad E2	NP 414657	2.3.1.12	Sobreexpresión	aumento de la producción de Acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
ackA	Acetato cinasa	AAC75356, NP 416799	2.7.2.1	Delección o reducción	aumento de la producción de Acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
ackB	Acetato cinasa AckB	BAB81430	2.7.2.1	Delección o reducción	aumento de la producción de Acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
acpP	Proteína transportadora de acilo	AAC74178	NONE	Sobreexpresión	aumento de la producción de Acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
fadD	Acil-CoA sintasa	AP 002424	2.3.1.86, 6.2.1.3	Sobreexpresión	aumento de la producción de Acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i> W3110
adhE	Alcohol deshidrogenasa	CAA47743	1.1.1.1, 1.2.1.10	Delección o reducción	aumento de la producción de Acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i> W3111
cer1	Aldehído descarboxilasa	BAA11024	4.1.99.5	Sobreexpresión	aumento de la producción de Acetil-CoA	<i>Arabidopsis thaliana</i>
fabA	Beta-hidroxicarboxilato deshidratasa [proteína transportadora de acilo] S-malonitransferasa	NP 415474	4.2.1.60	Expresión	aumento de la producción de Acetil-CoA	<i>E. coli</i> K12
fabD	3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] sintasa II	AAC74176	2.3.1.39	Sobreexpresión	aumento de la producción de Acetil-CoA	<i>E. coli</i> K12
fabF	3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] sintasa III	AAC74179	2.3.1.179	Delección o sobreexpresión	aumento de la producción de Acetil-CoA	<i>E. coli</i> K12
fabG	3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] reductasa	AAC74177	1.1.1.100	Sobreexpresión	aumento de la producción de Acetil-CoA	<i>E. coli</i> K12
fabH	3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] sintasa III	AAC74175	2.3.1.180	Sobreexpresión	aumento de la producción de Acetil-CoA	<i>E. coli</i> K12, <i>Lactococci</i>
fabI	enol-[proteína transportadora de acilo] reductasa, dependiente de NADH	NP 415804	1.3.1.9	Expresión	producción de Acil-CoA-graso	<i>E. coli</i> K12, <i>Lactococci</i>

fabR	Represor de la transcripción (3R)-hidroximiristol proteína portadora de acilo deshidriatasa	NP 418398	NINGUNO	Delección o reducción	modula la producción de ácidos grasos insaturados	<i>E. coli</i> K12
fabZ		NP 414722	4.2.1.-			<i>E. coli</i> K12
fadE	acil-CoA deshidrogenasa	AAC73325	1.3.99.3, 1.3.99.-	Delección o reducción	aumento de la producción de Acetil-CoA	
acrI	Acil graso-CoA reductasa	YP_047869, AAC45217	1.2.1.42	Sobreexpresión	para la producción de alcoholes grasos	<i>Acinetobacter sp.</i> <i>i.e. calcoaceticus</i>
GST, gshB	Glutathión sintasa	P04425	6.3.2.3	Delección o reducción	aumento de Acil-CoA	<i>E. coli</i> K12
gpsA	sn-glicerol 3-fosfato deshidrogenasa biosintética	AAC76632, NP 418065	EC: 1.1.1.94	Delección o reducción	aumento de la producción de Acetil-CoA	<i>E. coli</i> K12
ldhA	lactato deshidrogenasa	AAC74462, NP 415898	EC: 1.1.1.27, 1.1.1.28	Delección o reducción	aumento de la producción de Acetil-CoA	<i>E. coli</i> K12
Lipasa	triglicérido lipasa	CAA89087, CAA98876	3.1.1.3	Expresión	aumento de la producción de ácidos grasos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
panD	Malonil-CoA descarboxilasa	AA26500	4.1.1.9, 4.1.1.41	Sobreexpresión		<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
panK a.k.a. coaA	aspartato-1-decarboxilasa	BAB96708	4.1.1.11	Sobreexpresión	aumento de Acil-CoA	<i>Escherichia coli</i> W3110
panK a.k.a. coaA, R106K	pentotenato cinasa	AAC76952	2.7.1.33	Sobreexpresión	aumento de la producción de Acetil-CoA	<i>E. coli</i>
pdh	piruvato deshidrogenasa	AAC76952	2.7.1.33	Expresión, sobreexpresión, mutación R106K	aumento de la producción de Acetil-CoA	<i>E. coli</i>
pflB	piruvato acetiltransferasa (piruvato formiato liasa)	BAB34380, AAC73226, NP 415392	1.2.4.1	Sobreexpresión	aumento de la producción de Acetil-CoA	
plsB	acetiltransferasa	AAC73989, P09373	EC: 2.3.1.54	Delección o reducción	aumento de la producción de Acetil-CoA	
		AAC77011	2.3.1.15	Mutación D311E	reducción de los límites sobre la reserva de acil-CoA	<i>E. coli</i> K12

	poxB	piruvato oxidasa	AAC73958, NP 415392	1.2.2.2	Delección o reducción	aumento de la pro- ducción de acetil-CoA	
	pta	fosfotransacetilasa	AAC75357, NP 416800	2.3.1.8	Delección o reducción	aumento de la pro- ducción de acetil-CoA	
	udhA	nucleótido de piridina transhidrogenasa	CAA46822	1.6.1.1	Sobreexpresión	conversión de NADH en NADPH o viceversa	
	fadB	3-hidroxibutil-CoA epimerasa/ delta(3)-cis-delta(2)-trans-enoil-CoA isomerasa/ enoil-CoA hidratasa y 3-hidroxialcil-CoA dehidrogenasa fusionadas	AP 003956	4.2.1.17, 5.1.2.3, 5.3.3.8, 1.1.1.35	Delección o reducción	Bloqueo de la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
	fadJ	3-hidroxialcil-CoA deshidrogenasa, K01692 enoil-CoA hidratasa, K01782 3-hidroxibutil-CoA epimerasa	AAC75401	1.1.1.35, 4.2.1.17, 5.1.2.3	Delección o reducción	Bloqueo de la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
	fadA	3-oxoalcil-CoA liolasa	BAE77458	2.3.1.16	Delección o reducción	Bloqueo de la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
	fadI	beta-cetobalcil-CoA liolasa	AAC75402	2.3.1.16	Delección o reducción	Bloqueo de la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
	YdiO	alcil-CoA deshidrogenasa	YP 852786	1.3.99.-	Delección o reducción	Bloqueo de la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
	2. Control de la estructura						
	2A. Control de la longitud de cadena						
2	tesA	tiosterasa	P0ADAI	3.1.2.-, 3.1.1.5	Delección y/o expresión	Longitud de cadena C18	
	tesA sin secuencia líder	tiosterasa	AAC73596, NP 415027	3.1.2.-, 3.1.1.5	Expresión o sobreexpresión	C18:1	<i>E. coli</i>
	tesA sin secuencia líder.	tiosterasa	P0ADAI	3.1.2.-, 3.1.1.5	Expresión y/o sobreexpresión	Longitud de cadena <C18	<i>E. coli</i>

L109P						de mutación L109P		
fatB1 (umbellularia)	toesterasa		Q41635	3.1.2.14	Expresión o sobreexpresión	C12:0	<i>Umbellularia californica</i>	
fatB2 (umbellularia)DE LETE umbelluria)	toesterasa		AAC49269	3.1.2.14	Expresión o sobreexpresión	C8:0 - C10:0	<i>Cuphea hookeriana</i>	
fatB3	toesterasa		AAC72881	3.1.2.14	Expresión o sobreexpresión	C14:0 - C16:0	<i>Cuphea hookeriana</i>	
fatB (cinnamomum)	toesterasa		Q39473	3.1.2.14	Expresión o sobreexpresión	C14:0	<i>Cinnamomum camphora</i>	
fatB[M141T]*	toesterasa		CAA85388	3.1.2.14	Expresión o sobreexpresión	C16:1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
fatA1 (Helianthus)	toesterasa		AAL79361	3.1.2.14	Expresión o sobreexpresión	C18:1	<i>Helianthus annuus</i>	
atfata (ACIL-ACP TOESTERA- SA DE ARABI- DOPSIS FatA)	toesterasa		NP_189147, NP_193041	3.1.2.14	Expresión o sobreexpresión	C18:1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
fatA	toesterasa		CAC39106	3.1.2.14	Expresión o sobreexpresión	C18:1	<i>Brassica juncea</i>	
fatA (cuphea)	toesterasa		AAC72883	3.1.2.14	Expresión o sobreexpresión	C18:1	<i>Cuphea hookeriana</i>	
2B. Control de la ramificación atenuación de FatH								

bkdB2	subunidad-b de a-cetábido de cadena ramificada deshidrogenasa (E1b)	NP_628019	EC 1.2.4.4	Expresión o sobreexpresión	preparación de precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Sireptomycetes coelicolor</i>
bkdC2	dihidrolipil transacetilasa (E2)	NP_628018	EC 2.3.1.168	Expresión o sobreexpresión	preparación de precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Sireptomycetes coelicolor</i>
bkdA	subunidad-a de a-cetábido de cadena ramificada deshidrogenasa (E1a)	BAC72074	EC 1.2.4.4	Expresión o sobreexpresión	preparación de precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Sireptomycetes avermitilis</i>
bkdB	subunidad-b de a-cetábido de cadena ramificada deshidrogenasa (E1b)	BAC72075	EC 1.2.4.4	Expresión o sobreexpresión	preparación de precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Sireptomycetes avermitilis</i>
bkdC	dihidrolipil transacetilasa (E2)	BAC72076	EC 2.3.1.168	Expresión o sobreexpresión	preparación de precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Sireptomycetes avermitilis</i>
bkdF	subunidad-a de a-cetábido de cadena ramificada deshidrogenasa (E1a)	BAC72088	EC 1.2.4.4	Expresión o sobreexpresión	preparación de precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Sireptomycetes avermitilis</i>
bkdG	subunidad-b de a-cetábido de cadena ramificada deshidrogenasa (E1b)	BAC72089	EC 1.2.4.4	Expresión o sobreexpresión	preparación de precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Sireptomycetes avermitilis</i>
bkdH	dihidrolipil transacetilasa (E2)	BAC72090	EC 2.3.1.168	Expresión o sobreexpresión	preparación de precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Sireptomycetes avermitilis</i>
bkdAA	subunidad-a de a-cetábido de cadena ramificada deshidrogenasa (E1a)	NP_390285	EC 1.2.4.4	Expresión o sobreexpresión	preparación de precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Bacillus subtilis</i>
bkdAB	subunidad-b de a-cetábido de cadena ramificada deshidrogenasa (E1b)	NP_390284	EC 1.2.4.4	Expresión o sobreexpresión	preparación de precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Bacillus subtilis</i>
bkdB	dihidrolipil transacetilasa (E2)	NP_390283	EC 2.3.1.168	Expresión o sobreexpresión	preparación de precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Bacillus subtilis</i>
bkdA1	subunidad-a de a-cetábido de cadena ramificada deshidrogenasa (E1a)	AAA65614	EC 1.2.4.4	Expresión o sobreexpresión	preparación de precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Pseudomonas putida</i>
bkdA2	subunidad-b de a-cetábido de cadena ramificada deshidrogenasa	AAA65615	EC 1.2.4.4	Expresión o sobreexpresión	preparación de precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Pseudomonas putida</i>

	(E1b)									
bkdC	dihidropol transacetilasa (E2)	AAA65617	EC 2.3.1.168	Expresión o sobreexpresión	cadena ramificada	preparación de precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Pseudomonas putida</i>			
lpd	dihidropirimidina deshidrogenasa (E3)	NP 414658	1.8.1.4	Expresión o sobreexpresión	cadena ramificada	preparación de precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Escherichia coli</i>			
IlvE	aminocido de cadena ramificada aminotransferasa	YP 026247	2.6.1.42	Expresión o sobreexpresión	ramificados	preparación de a-cetobáctos ramificados	<i>Escherichia coli</i>			
IlvE	aminocido de cadena ramificada aminotransferasa	AAF34406	2.6.1.42	Expresión o sobreexpresión	ramificados	preparación de a-cetobáctos ramificados	<i>Lactococcus lactis</i>			
IlvE	aminocido de cadena ramificada aminotransferasa	NP 745648	2.6.1.42	Expresión o sobreexpresión	ramificados	preparación de a-cetobáctos ramificados	<i>Pseudomonas putida</i>			
IlvE	aminocido de cadena ramificada aminotransferasa	NP 629657	2.6.1.42	Expresión o sobreexpresión	ramificados	preparación de a-cetobáctos ramificados	<i>Streptomyces coelicolor</i>			
ccr	crotonil-CoA reductasa	NP 630556	1.6.5.5.1.1	Expresión o sobreexpresión	conversión de crotonil-CoA en butiril-CoA	conversión de crotonil-CoA en butiril-CoA	<i>Streptomyces coelicolor</i>			
ccr	crotonil-CoA reductasa	AAD53915	1.6.5.5.1.1	Expresión o sobreexpresión	conversión de crotonil-CoA en butiril-CoA	conversión de crotonil-CoA en butiril-CoA	<i>Streptomyces cinnamomensis</i>			
lcmA, isobutiril-CoA mutasa	isobutiril-CoA mutasa, subunidad A	NP 629554	5.4.99.2	Expresión o sobreexpresión	conversión de butiril-CoA en isobutiril-CoA	conversión de butiril-CoA en isobutiril-CoA	<i>Streptomyces coelicolor</i>			
lcmA, isobutiril-CoA mutasa	isobutiril-CoA mutasa, subunidad A	AA08713	5.4.99.2	Expresión o sobreexpresión	conversión de butiril-CoA en isobutiril-CoA	conversión de butiril-CoA en isobutiril-CoA	<i>Streptomyces cinnamomensis</i>			
lcmB, isobutiril-CoA mutasa	isobutiril-CoA mutasa, subunidad B	NP 630904	5.4.99.2	Expresión o sobreexpresión	conversión de butiril-CoA en isobutiril-CoA	conversión de butiril-CoA en isobutiril-CoA	<i>Streptomyces coelicolor</i>			
lcmB, isobutiril-CoA mutasa	isobutiril-CoA mutasa, subunidad B	CAB59633	5.4.99.2	Expresión o sobreexpresión	conversión de butiril-CoA en isobutiril-CoA	conversión de butiril-CoA en isobutiril-CoA	<i>Streptomyces cinnamomensis</i>			

Genes FabH, ACP y fabF con especificidad por acil de cadena ramificada-CoA									
IIVe	aminocido de cadena ramificada aminotransferasa	CAC12788	EC2.6.1.4 2	Sobreexpresión					<i>Staphylococcus carnosus</i>
FabH1	beta-cetoadl-ACP sintasa III	NP_626634	2.3.1.180	Expresión o sobreexpresión					<i>Streptomyces coelicolor</i>
ACP	proteina transportadora de acilo	NP_626635	NINGUNO	Expresión o sobreexpresión					<i>Streptomyces coelicolor</i>
FabF	beta-cetoadl-ACP sintasa I	NP_626636	2.3.1.179	Expresión o sobreexpresión					<i>Streptomyces coelicolor</i>
FabH3	beta-cetoadl-ACP sintasa III	NP_823466	2.3.1.180	Expresión o sobreexpresión					<i>Streptomyces avermitilis</i>
FabC3 (ACP)	proteina transportadora de acilo	NP_823467	NINGUNO	Expresión o sobreexpresión					<i>Streptomyces avermitilis</i>
FabF	beta-cetoadl-ACP sintasa I	NP_823468	2.3.1.179	Expresión o sobreexpresión					<i>Streptomyces avermitilis</i>

	FabH A	beta-cetoacil-ACP sintasa III	NP_389015	2.3.1.180	Expresión o sobreexpresión	inicio de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena	<i>Bacillus subtilis</i>
	FabH B	beta-cetoacil-ACP sintasa III	NP_388898	2.3.1.180	Expresión o sobreexpresión	inicio de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena	<i>Bacillus subtilis</i>
	ACP	proteína transportadora de acilo	NP_389474	NINGUNO	Expresión o sobreexpresión	inicio y elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Bacillus subtilis</i>
	FabF	beta-cetoacil-ACP sintasa II	NP_389016	2.3.1.179	Expresión o sobreexpresión	elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Bacillus subtilis</i>
	SmaDRAFT_081 8	beta-cetoacil-ACP sintasa III	ZP_01643059	2.3.1.180	Expresión o sobreexpresión	inicio de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	SmaDRAFT_082 1	proteína transportadora de acilo	ZP_01643063	NINGUNO	Expresión o sobreexpresión	inicio y elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	SmaDRAFT_082 2	beta-cetoacil-ACP sintasa II	ZP_01643064	2.3.1.179	Expresión o sobreexpresión	elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	FabH	beta-cetoacil-ACP sintasa III	YP_123672	2.3.1.180	Expresión o sobreexpresión	inicio de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Legionella pneumophila</i>
	ACP	proteína transportadora de acilo	YP_123675	NINGUNO	Expresión o sobreexpresión	inicio y elongación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Legionella pneumophila</i>

P1mL		deshidrogenasa (supuesta)	AA084159	no disponible	Expresión o sobreexpresión	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces sp. HK803</i>
ChcA		enoi-CoA reductasa	AA084160	EC 1.3.1.34	Expresión o sobreexpresión	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces sp. HK803</i>
P1mM		oxidorreductasa (supuesta)	AA084161	no disponible	Expresión o sobreexpresión	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces sp. HK803</i>
ChcB		enoi-CoA isomerasa	AF268489	no disponible	Expresión o sobreexpresión	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces collinus</i>
ChcB/CaiD		enoi-CoA isomerasa	NP 629292	4.2.1.-	Expresión o sobreexpresión	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces coelicolor</i>
ChcB/CaiD		enoi-CoA isomerasa	NP 824296	4.2.1.-	Expresión o sobreexpresión	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces avermitilis</i>
2C. Control del nivel de saturación							
Sfa		Supresor de FabA	AA179592, AAC44390	NINGUNO	Sobreexpresión	aumento de ácidos grasos monosaturados	<i>E. coli</i>
	véase también FabA en la sec. 1				Expresión	producción de ácidos grasos insaturados	
GnsA		supresores de la mutación nula secG	ABD18647.1	NINGUNO	Sobreexpresión	aumento de ésteres de ácidos grasos insaturados	<i>E. coli</i>
GnsB		supresores de la mutación nula secG	AAC74076.1	NINGUNO	Sobreexpresión	aumento de ésteres de ácidos grasos insaturados	<i>E. coli</i>

	véase también la sección 2A artículos con 0 están insaturados (sin dobles enlaces) y con 1 están saturados (1 doble enlace)							
	fabB	3-oxoacil-(proteína portadora de acilo) sintasa I	BAA16180	EC:2.3.1.4 1	Sobreexpresión	modulación de la producción de ácidos grasos insaturados	<i>Escherichia coli</i>	
	fabK	trans-2-enoil-ACP reductasa II	AAF98273	1.3.1.9	Expresión	modulación de la producción de ácidos grasos insaturados	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	fabL	enoil-(proteína portadora de acilo)- reductasa	AAD39821	1.3.1.9	Expresión	modulación de la producción de ácidos grasos insaturados	<i>Bacillus licheniformis DSM 13</i>	
	fabM	trans-2, cis-3-decenil-ACP isomerasa	DAAD0501	4.2.1.17	Sobreexpresión	modulación de la producción de ácidos grasos insaturados	<i>Streptococcus mutans</i>	
	3. Salida de Productos Finales							
	3A. Salida de Cera							
	AT3G51970	alcohol de cadena larga O-acil graso transferasa	NP_190765	2.3.1.26	Expresión	producción de cera	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
		isomerasa (véase la sección de control de la longitud de cadena)			Expresión	aumento de la producción de ácidos grasos		
		acil-CoA reductasa que forma alcohol graso		1.1.1.*	Expresión	conversión de acil-CoA en alcohol graso		
	acr1	acil-CoA reductasa (ACR1)	YP_047869	1.2.1.42	Expresión	conversión de acil-CoA en alcohol graso	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	
	yqhD	alcohol deshidrogenasa	AP_003562	1.1.-.-	Expresión	aumento	<i>E. coli W3110</i>	

ELO1	ácido graso elongasa	BAD98251	2.3.1.-	Expresión	producción de ácidos grasos de cadena muy larga	<i>Pichia angusta</i>
plsC	aciltransferasa	AAA16514	2.3.1.51	Expresión		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
DAGAT/DGAT	diacilglicerol aciltransferasa	AAF19262	2.3.1.20	Expresión	producción de cera	<i>Arabidopsis thaliana</i>
hWS	acil-CoA cera alcohol aciltransferasa	AAX48018	2.3.1.20	Expresión	producción de cera	<i>Homo sapiens</i>
aft1	éster de cera sintasa/acil-CoA: diacilglicerol aciltransferasa bifuncional	AAO17391	2.3.1.20, 2.3.1.75	Expresión	producción de cera	<i>Acinetobacter sp. ADPI</i>
mWS	éster de cera sintasa (Simmondsie)	AAD38041	2.3.1.-, 2.3.1.75	Expresión	producción de cera	<i>Simmondsia chinensis</i>
3B. Salida de Alignedes Grasos						
	diversas liposferasas (véase la sec. 2A)			Expresión	producción	
acr1	acil-CoA reductasa	YP_047869	1.2.1.42	Expresión	producción	<i>Acinetobacter sp. ADPI</i>
yqhD	alcohol deshidrogenasa	AP_003562	1.1.-	Expresión	producción	<i>Escherichia coli W3110</i>
BmFAR	FAR (acil-CoA reductasa que forma alcohol (graso))	BAC79425	1.1.1.*	Expresión	reducción de acil-CoA para dar alcohol graso	<i>Bombyx mori</i>
Akr1a4	aldehído reductasa microsomal de mamífero	NP_067448	1.1.1.2	Expresión	producción	<i>Mus musculus</i>
GTNG 1865	aldehído de cadena larga deshidrogenasa	YP_001125970	1.2.1.3	Expresión	producción	<i>Geobacillus thermodenitrificans NG80-2</i>
FadD	acil-CoA sintasa	NP_416319	EC 6.2.1.3	Expresión	mas producción	<i>E. Coli K12</i>
Para la preparación de butanol						

CERS	transportador de cera	Atlg51500, AY734542, Atlg21090, Atlg51460	NINGUNO	Expresión	exportación de productos	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtMRP5	asociado a resistencia a múltiples fármacos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_171908	NINGUNO	Expresión	exportación de productos	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AmiS2	transportador de ABC AmiS2	JC5491	NINGUNO	Expresión	exportación de productos	<i>Rhodococcus sp.</i>
AtPGP1	GLICOPROTEINA 1 DE ARABIDOPSIS THALIANA P	NP_181228	NINGUNO	Expresión	exportación de productos	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AcrA	supuesta proteína transportadora de efujo de múltiples fármacos, acrA	CAF23274	NINGUNO	Expresión	exportación de productos	<i>Candidatus Protochlamydia amoebophila UIWE25</i>
AcrB	probable proteína transportadora de efujo de múltiples fármacos, acrB	CAF23275	NINGUNO	Expresión	exportación de productos	<i>Candidatus Protochlamydia amoebophila UIWE25</i>
ToiC	proteína de la membrana externa (biogénesis de la envuelta celular)	ABD59001	NINGUNO	Expresión	exportación de productos	<i>Francisella tularensis subsp. novicida</i>
AcrE	proteína transmembrana que afecta a la formación del septo y a la permeabilidad de la membrana celular	YP_312213	NINGUNO	Expresión	exportación de productos	<i>Shigella sonnei</i> Ss046
AcrF	proteína F de resistencia a acriflavina	P24181	NINGUNO	Expresión	exportación de productos	<i>Escherichia coli</i>
tl11618	transportador de efujo de múltiples fármacos	NP_682408.1	NINGUNO	Expresión	exportación de productos	<i>Thermosynechococcus elongatus BP-11</i>
tl11619	transportador de efujo de múltiples fármacos	NP_682409.1	NINGUNO	Expresión	exportación de productos	<i>Thermosynechococcus elongatus BP-11</i>

	II10139	transportador de flujo de múltiples fármacos	NP_680930.1	NINGUNO	Expresión	exportación de productos	<i>Thermosynechococcus elongatus BP-17</i>
5. Fermentación							
	genes de punto de control de la replicación					aumento de la eficacia de salida	
	umuD	ADN polimerasa V subunidad	YP_310132	3.4.21.-	Sobrexpresión	aumento de la eficacia de salida	<i>Shigella sonnei</i> Ss046
	umuC	ADN polimerasa V subunidad	ABC42261	2.7.7.7	Sobrexpresión	aumento de la eficacia de salida	<i>Escherichia coli</i>
	NADH:NADPH transhidrogenasa (subunidades alfa y beta) (ptaA, ptaB)		P0700L P0AB70	1.6.1.2	Expresión	aumento de la eficacia de salida	<i>Shigella flexneri</i>

FIGURA 2

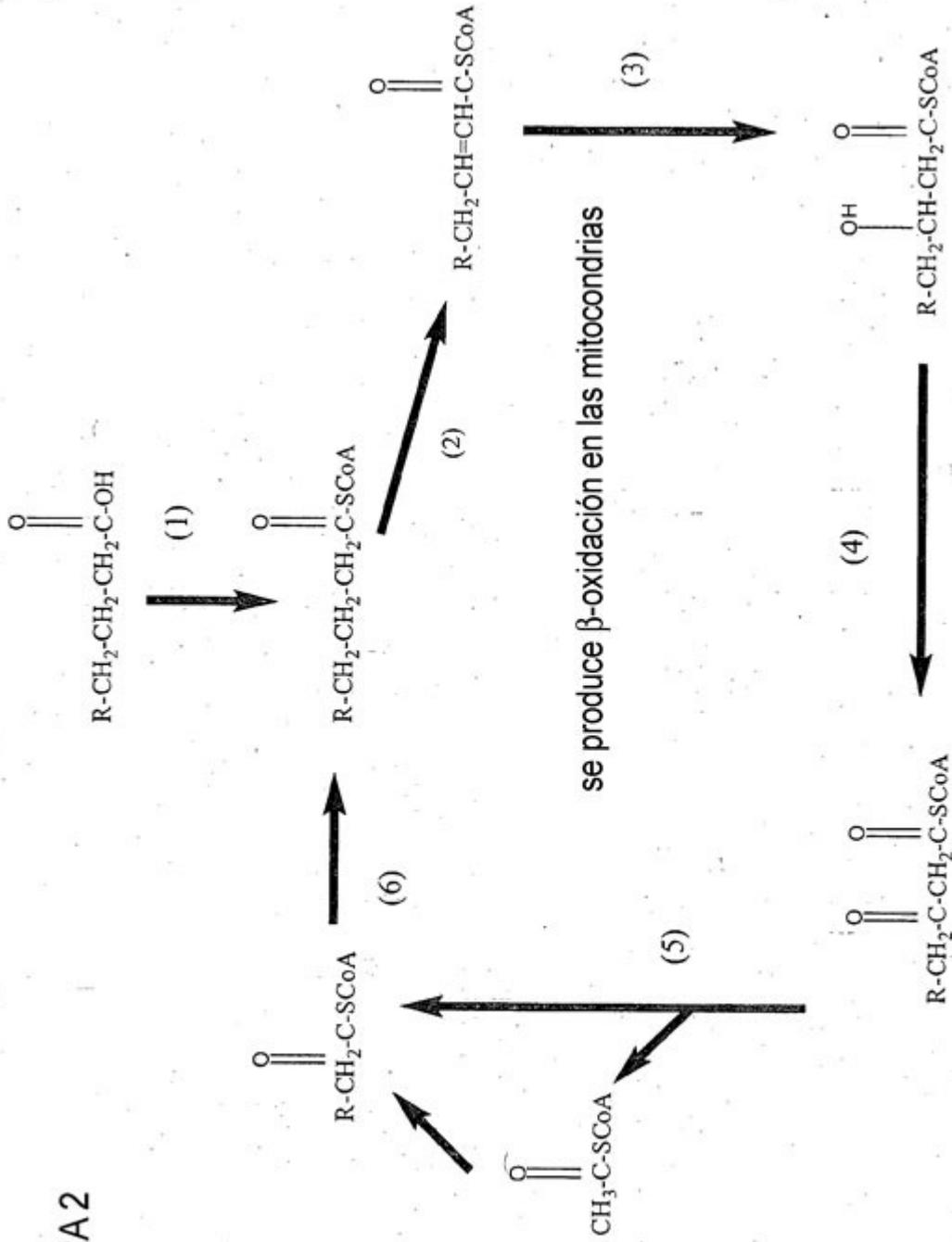


FIGURA 3

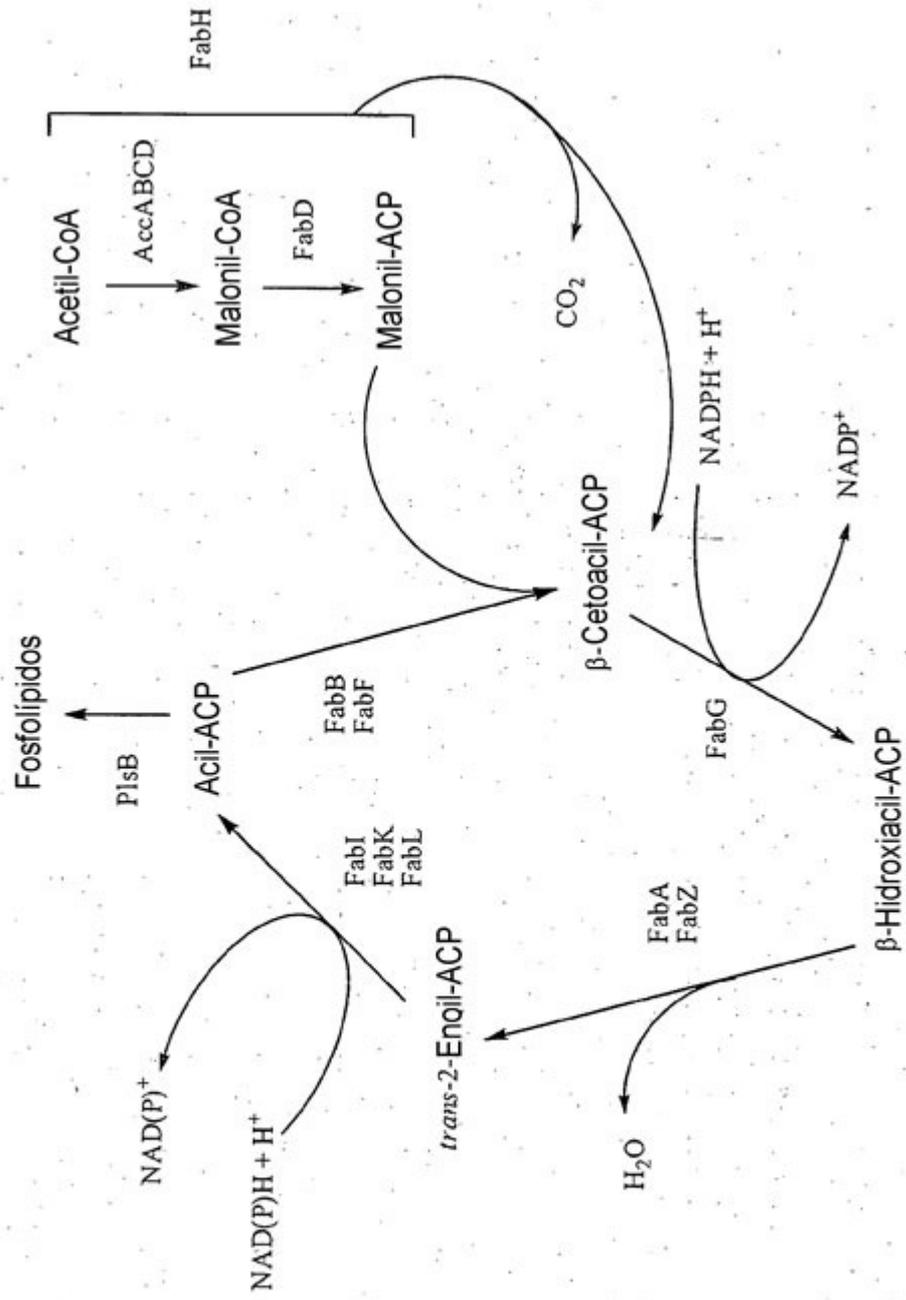
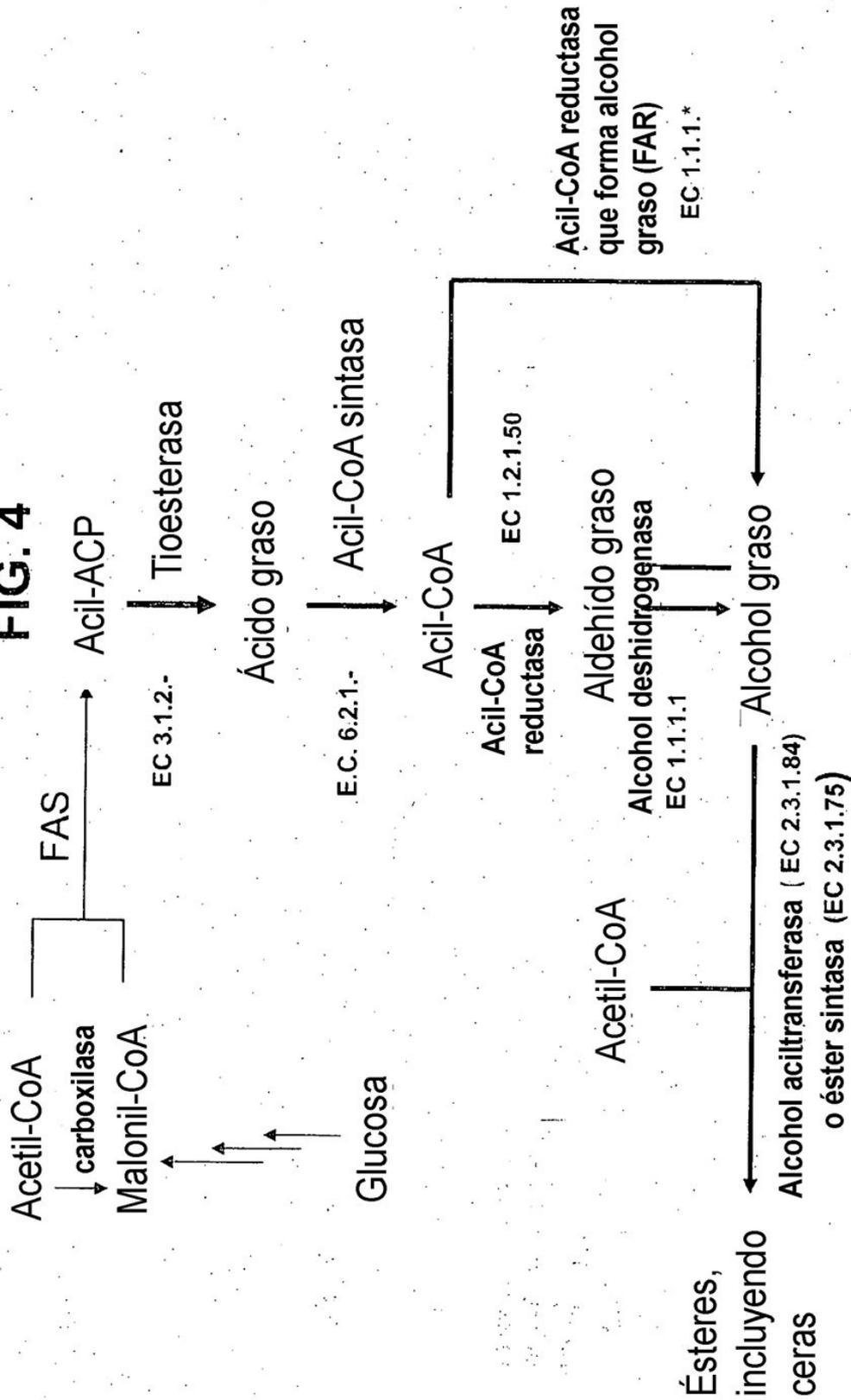
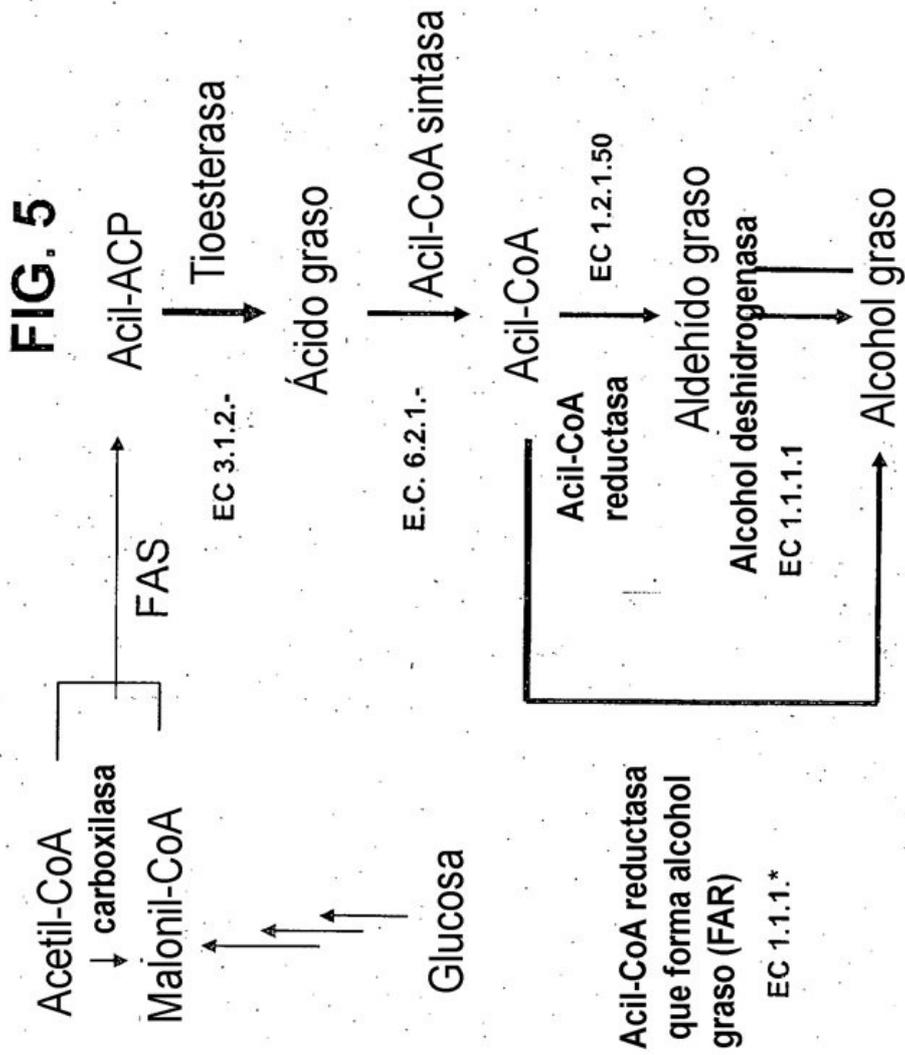


FIG. 4



Bibliografía sobre acil-CoA reductasa que forma alcohol graso: Kalscheuer 2006; Metz 2000; Cheng 2004a.



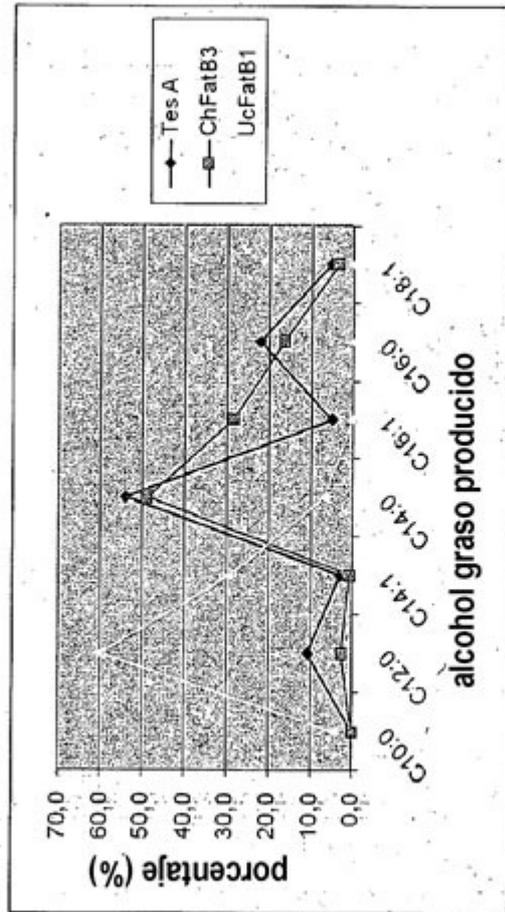


Figura 6

FIG. 7

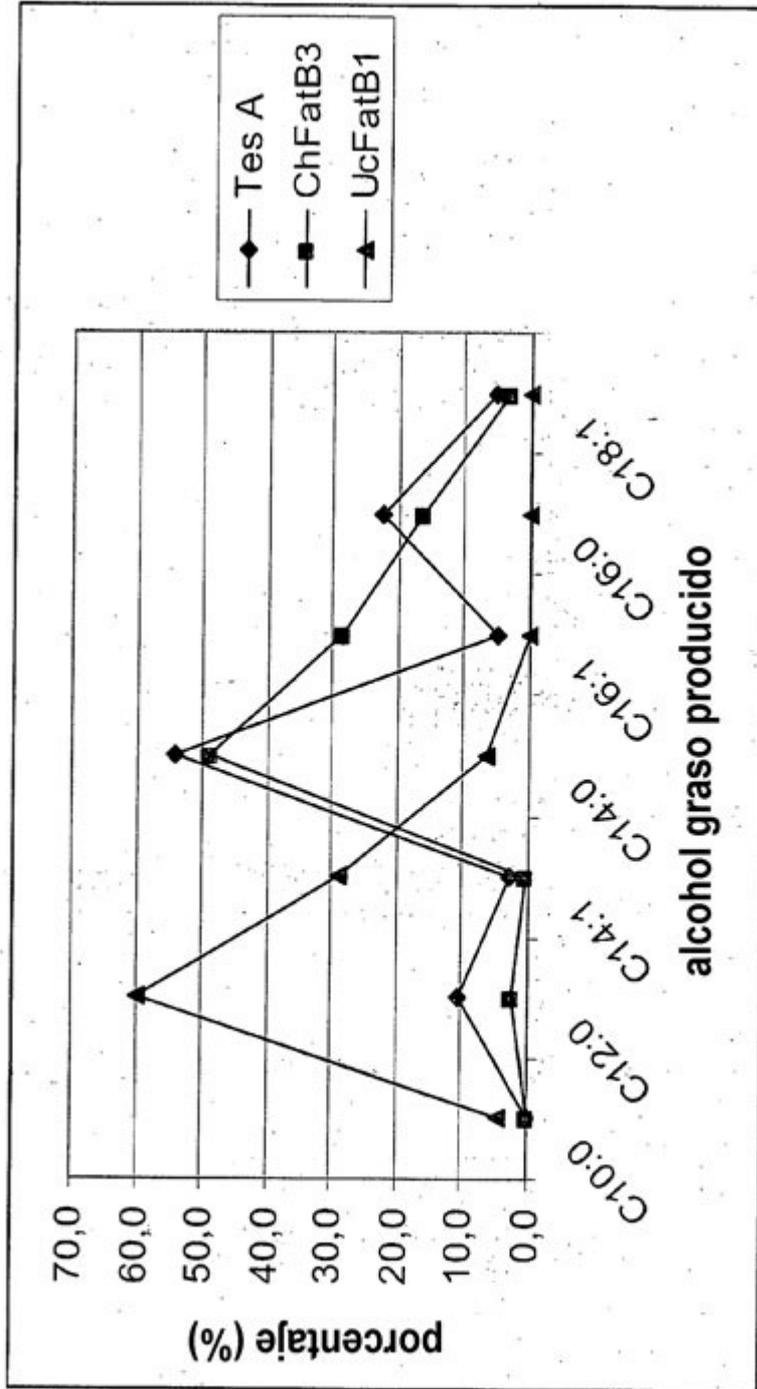
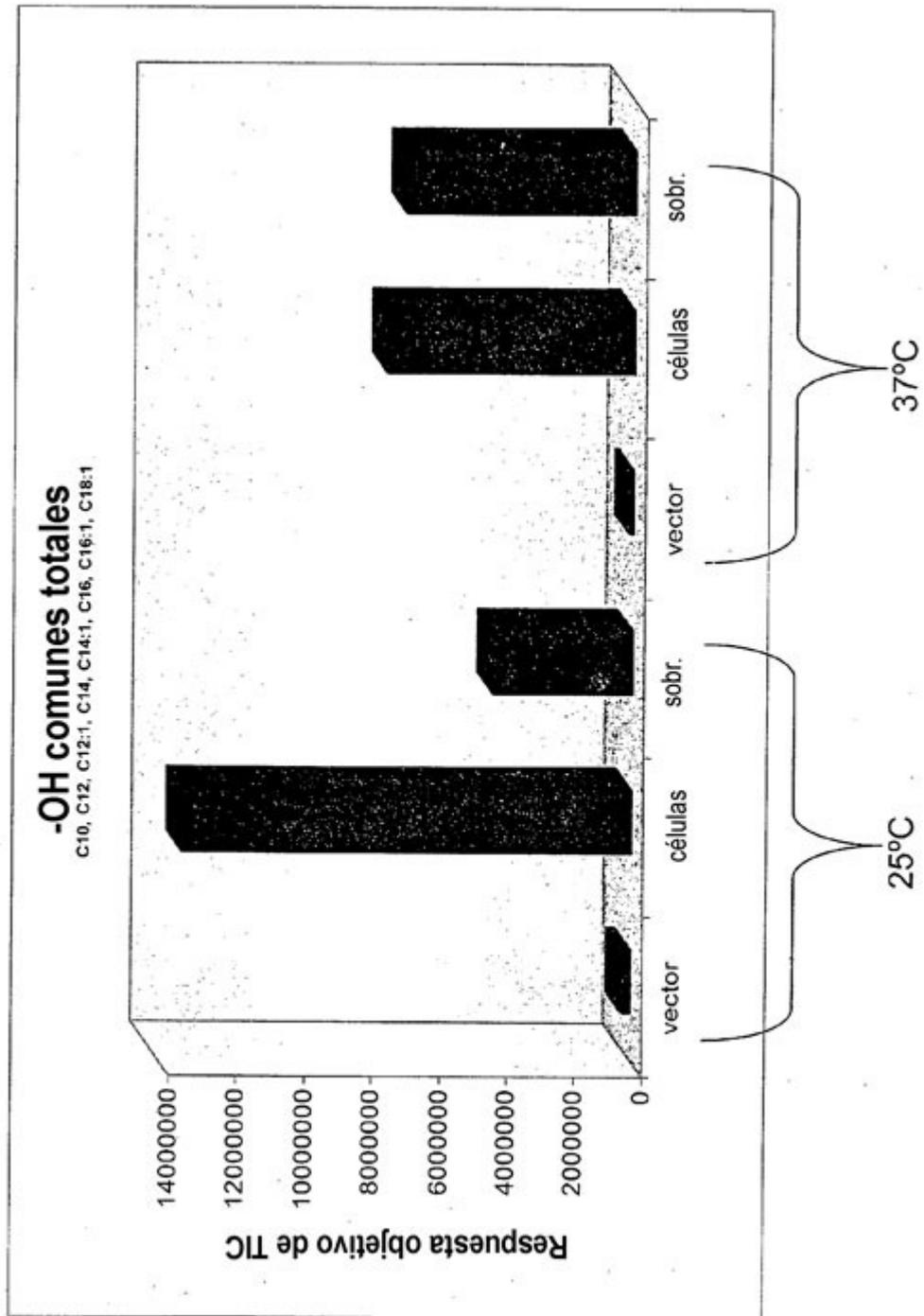


FIG. 8



FIGS. 9A-9D

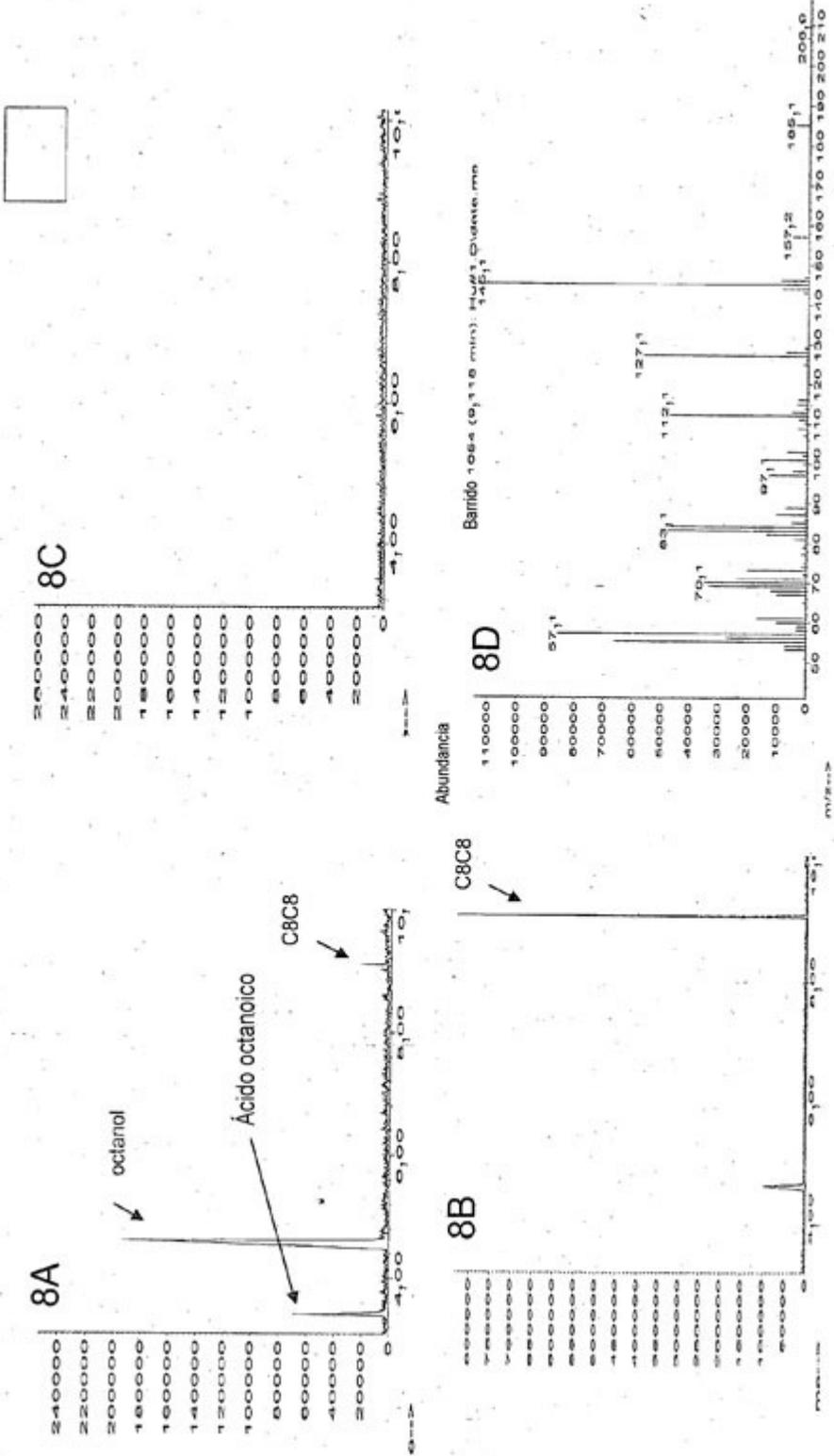


FIG. 10

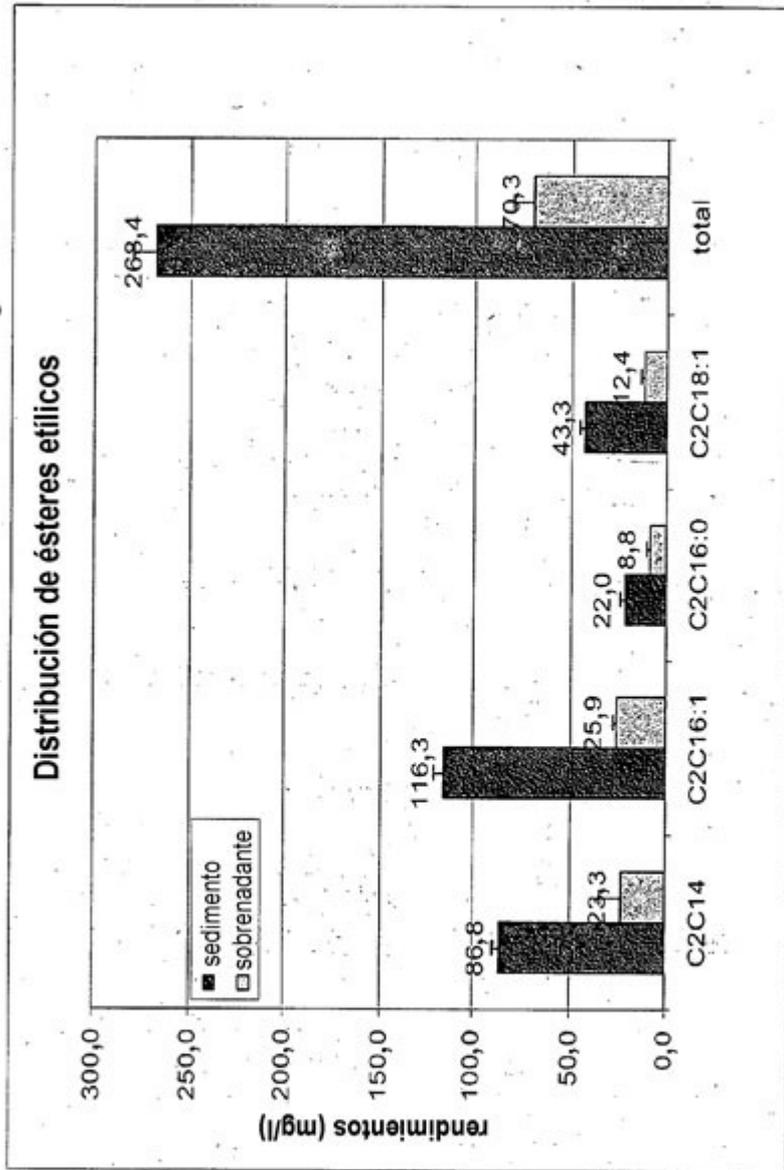


Figura 11

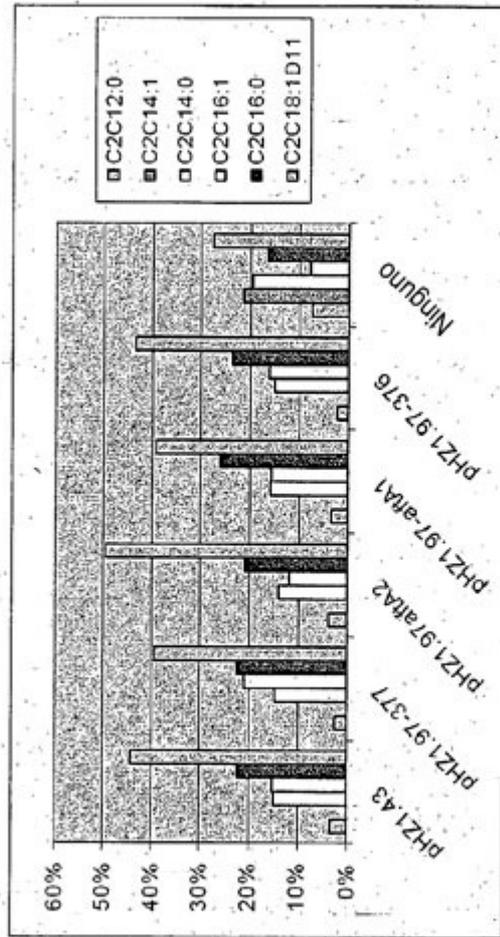


Fig. 12
Composición de FAEE desde 25°C

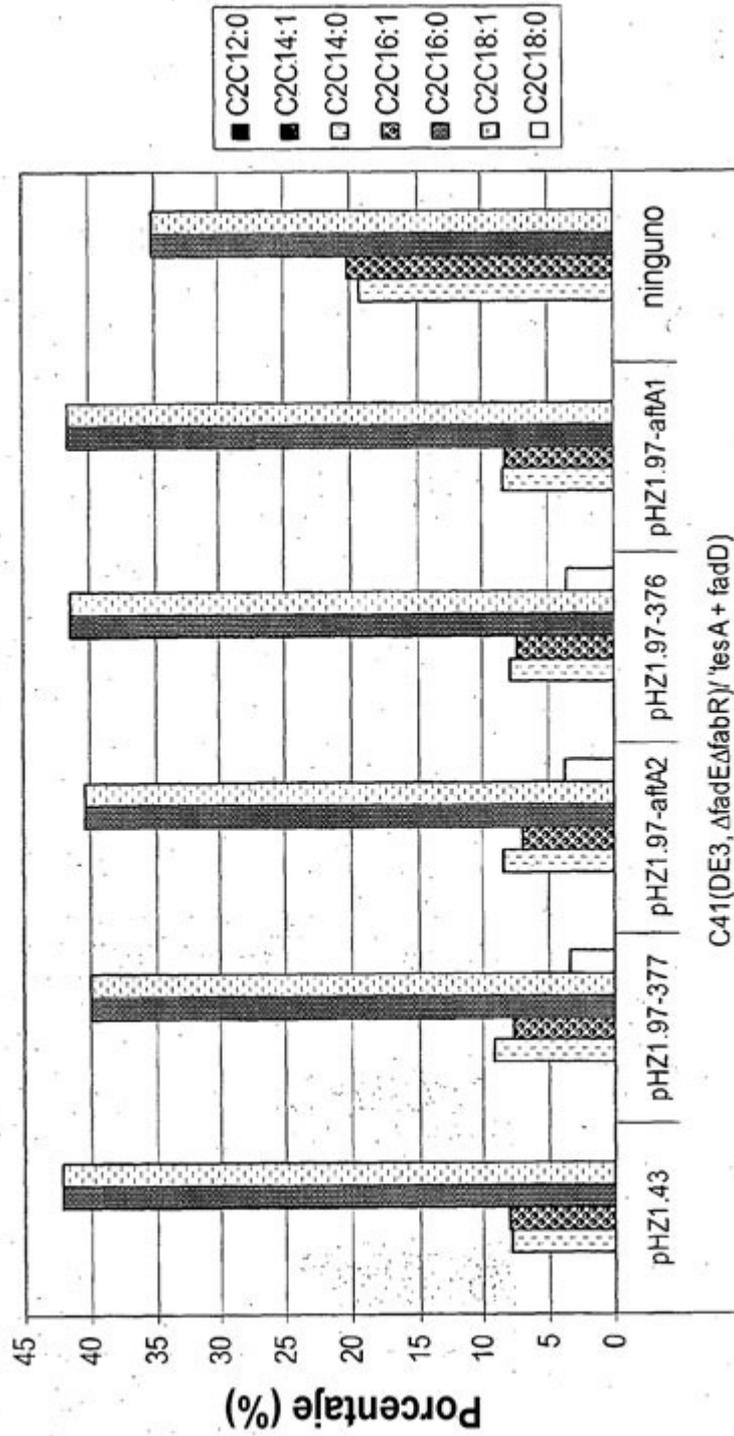
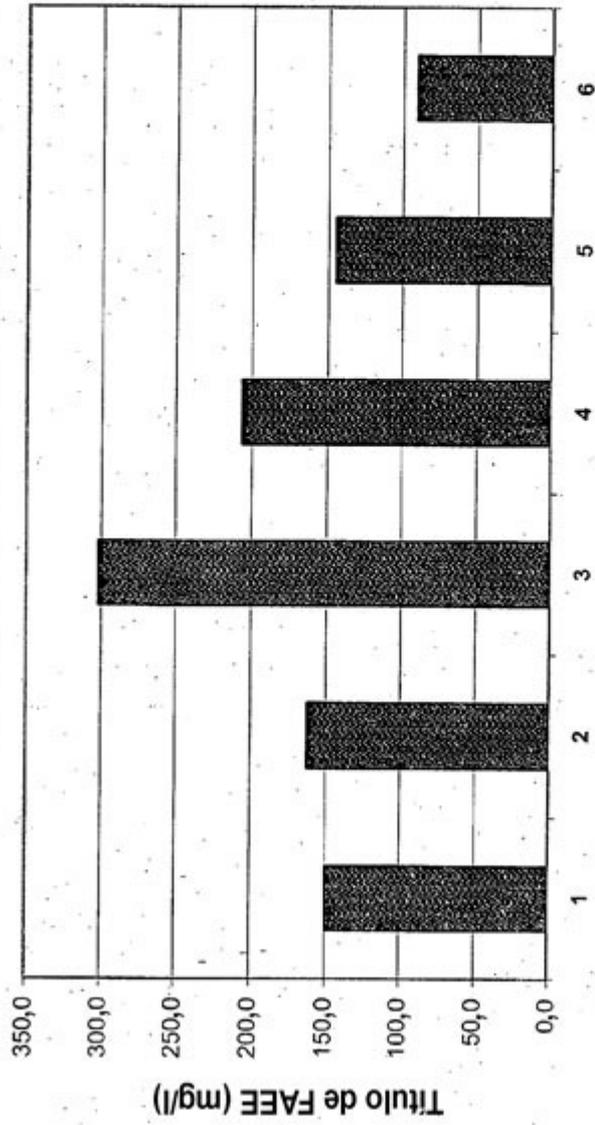


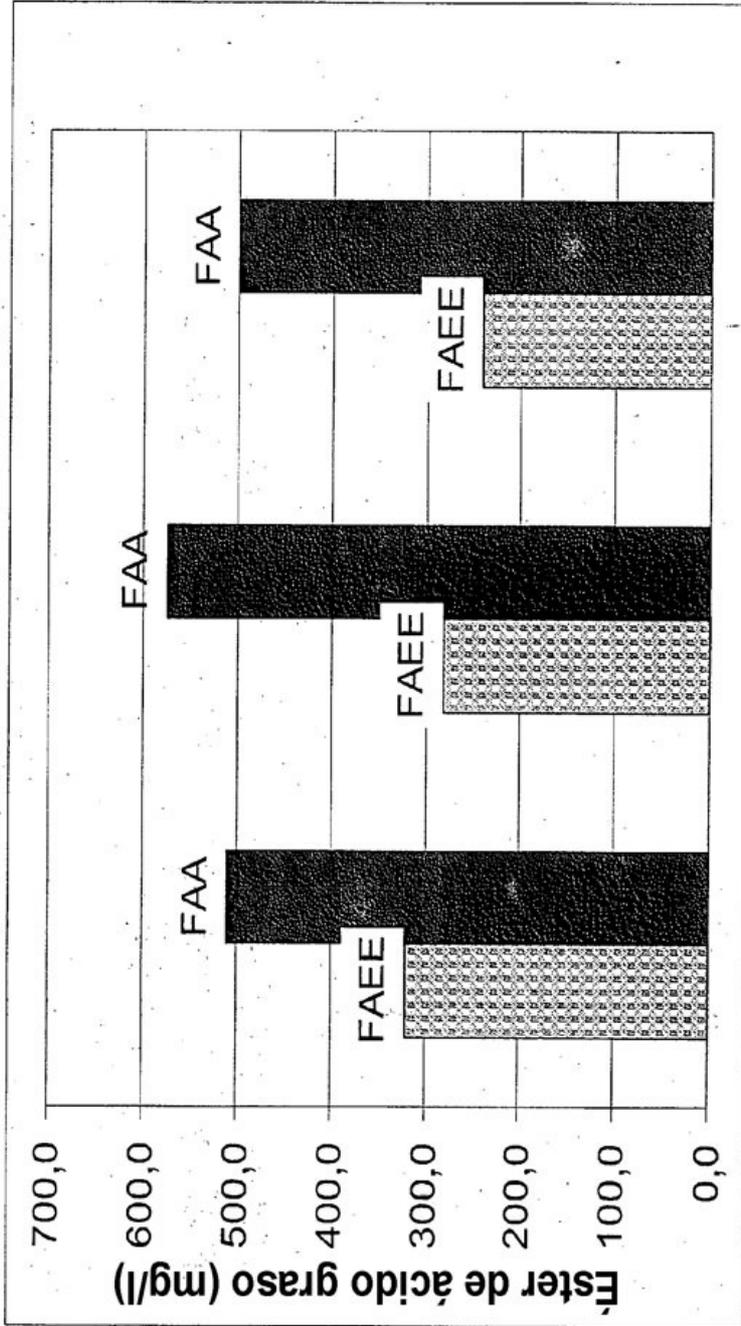
Fig. 13

FAEE por FAEE sintasas a 37°C



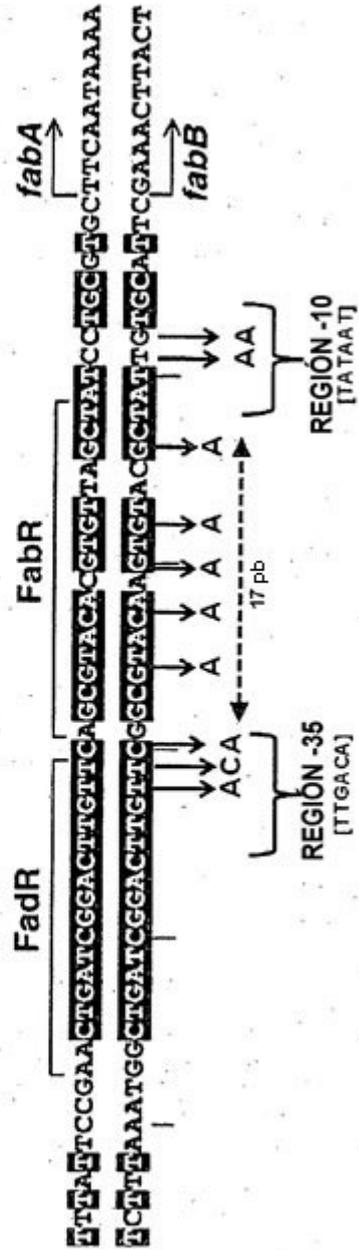
1. C41 (DE3, $\Delta fadE\Delta fabR$) / pETDuet-1-fesA + pCDFDuet-1-fadD con 1 pHZ1.43
2. pHZ1.97_377
3. pHZ1.97_atfA2
4. pHZ1.97_376
5. pHZ1.97_atfA1
6. Sin plásmidos (control)

Fig. 14



Concentraciones de ácidos grasos libres (FAA) y ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) producidos a partir de tres colonias individuales de C41 (DE3, Δ fadE Δ fabR)/ pETDuet-1-tesA + pCDFDuet-1-fadD + pHZ1.97_atfA2 t

Fig. 15



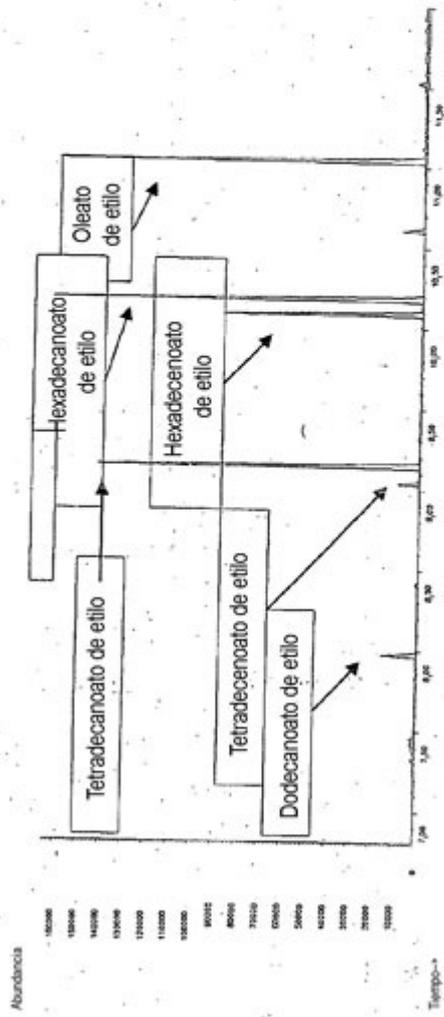


FIG. 16A

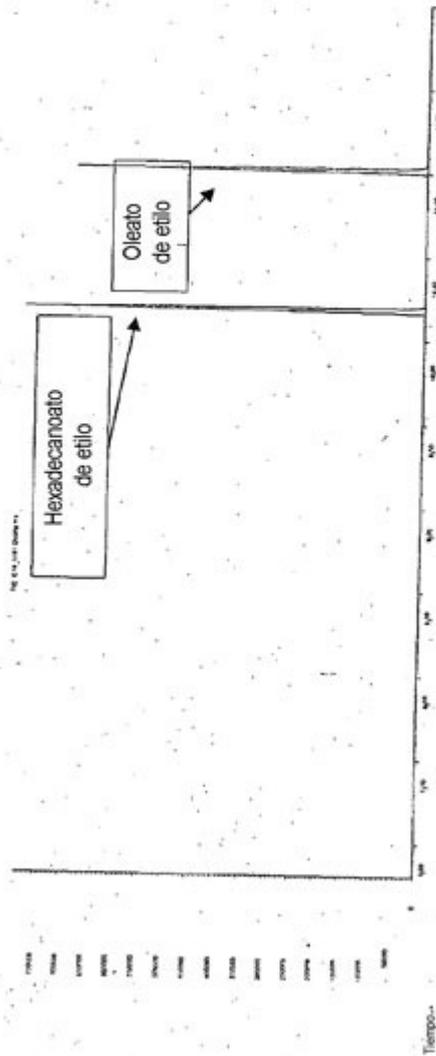


FIG. 16B

Figura 18

SEQ ID NO: 1 - **Secuencia de ADN del vector de expresión pOP-80**

CACTATACCAATTGAGATGGGCTAGTCAATGATAATTACTAGTCCCTTTCCCTTTGAGTTGTGGGTATCTGTAATCTGTAGACC
 TTGCTGGAAAACCTGTAAATCTGCTAGACCCCTGTAAATTCGGTAGACCTTTGTGTGTTTTTGTGTTTATATTCAAAGTGGTT
 ATAAATTTATAGAATAAAGAAAGAATAAAAAGATAAAAAGATAGATCCAGCCCTGTGTATAACTCACTACTTTAGTCAGTT
 CCGCAGTATTACAAAAGGATGTCGCAACCGCTGTTGCTCTCTACAAAACAGACCTTAAACCCCTAAAGGGTCGGCATCCGCT
 TACAGACAAGCTGTGACCCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAAGGTTTTCCCGTCAACCGAAACCGCGGAGGCAGCATC
 AATTCGGCCGGAAGCGGAAGCGGCATGCATTTACGTTGACACCATCGAATGGTGCAAAAACCTTTCCGGTATGGCATGATAGC
 GCCGGAAAGAGAGTCAATTCAGGTGGTGAATGTGAAACCCAGTAACGTTATACGATGTCGCAAGATATGCCGGTGTCTCTTATC
 AGACCGTTTCCCGGTGGTGAACCAAGCCAGCCACGTTTCTCGAAAACCGGGAAAAGTGAAGCGGCGATGCCGGAGCTG
 AATTACATTTCCCAACCGGTGGCACAACAACCTGGCGGCAACACAGTCTGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGC
 ACGGCCGTCGCAAAATGTCGGCGGGAATTAATCTCCGGCCGATCAACTGGTGGCAGCTGGTGTGTCGATGGTAGAACGAA
 CGCGGTCGAAGCCTGTAAAGCGGGGTCACAAATCTTCGCGCAACGCGTCAAGTGGGCTGATCAITTAACCTATCCGCTGGATGA
 CCAGGATGCCAATGTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTTAATTTCTGACCAGACACCCCATCAACAGTA
 TTAATTTCTCCCATGAAGACGTTACCGGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTTCGCAATGGGTCAACAGCAAAATCGCGCTGTAGCGGG
 CCCATTAAAGTCTCTCGGCGCTGCGCTGGCTGGCTGGCATAAATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAA
 CGGAAAGGCGACTGGAGTCCCATGTCCGGTTTTCAACAACCAATGCTGAAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGGATGCTG
 GTTGCCAACGATCAGATGGCGTGGCGCAATGCCGCCAATACCAGATCCGGGTTGGTGGGATATCTCGGATAGTG
 GGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACCAACCAATCAAGGATTTTCGCTGGTGGGCAACCA
 GCGTGGACCGCTTGTGCAACTCTCTCAGGGCCAGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCGCTCACTGGTGAAAGAAAA
 CCAACCTGGGCCCCAATACGCAACCGCCTCCCCCGCGTTGGCCGATTCATAATGACAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACT
 GGAAAGCGGCGAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTAAGTTAGCGGAAATGAGTGTGATGGCTGTGACAGTCAATCATCGACTGCAACGGT
 GCACCAATGCTTCTGGCTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAAGTCAATCATCGATAATTCGTTGCTCGCT
 CAAGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTCGGCCGACATCAATAACGGTTCCTGGCAATATCTGAAATGAGCTGTTGACAA
 TTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAAACAGCCCGCTGAGAAAAGCGAA
 CGGGCACTGCTCTTAACAAATTAATCAGACAATCTGTGTGGCACTCGACCGGAAATATCGAATTAACCTTTATTAAAAAATTA
 GAGGTATAATTAATGTATCGATTAATAAGGAGGAATAAACCATGGATCCGAGCTCGAGATCTGACGCTGGTACCATATGGGA
 ATTCGAAGCTTGGGCCCCAACAAAACCTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCCATCATCATCATCATGAGT
 TTAACCGGCTCCAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAATCAGAAACGCAAGAGCGGTC
 TGATAAAAACAGAAATTTGCCCTGGCGGCAATAGCCCGGTGGTCCCACTGACCCCATGCCCACTCAGAAAGTGAACCGCCGTAGCG
 CCGATGGTAGTGTGGGCTCTCCCCATGCGGAGATAGGGAACTGCCAGGCAATCAATAAACGAAAGGCTCAGTTCGAAAGACTGG

TCCAATTGGTCTATCTAGTTCAAACTTGGAAAATCAACGTATCAGTCGGGGCCCTCGCTTATCAACCACCAATTTTCATATTGGCTGTA
AGTGTTAAATCITTTACTTATTGGTTTCAAAAACCCATTGGTTAAGCCTTTTAACTCATGGTAGTTATTTTCAAGCAITTAACAATGA
ACTTAAATTCAJCAAGGCTAATCTCTATATTTGCCITGGAGTTTCTTTTGGTTAGTTCITTTAATAACCACTCATAAATCCTCA
TAGAGTATTTGTTTTCAAAAAGACTTAAACATGTTCCAGATTATATTTTATGAATTTTTTAACTGGAAAAGATAAGGCCAATATCTCT
TCACTAAAACCTAAATTCATAATTTTCGCTTGAGAACITGGCATAAGTTGTCCACTGGAAAATCTCAAAGCCTTTAAACCAAAAGGATT
CCTGATTTCCACAGTTCCTCGTCAATCAGCTCTCTGCTGTTGCTTTAGCTAATACACCAATAAGCAATTTCCCTACTGATGTTTCATCATCTG
AGCGTATTGGTTATAAGTGAACGATAACCGTCCGTTCTTTCCITTTAGGGTTTTCAATCGTGGGGTTGAGTAGTGCCACACACAGCATA
AAATTAGCTTGGTTTCATGCTCCGTTAAGTTCATAGCGACTAATCGCTAGTTCATTTGCTTTTGAAAACAACACTAATTCAGACATACAT
CTCAATTGGTCTAGGTGATTTTAAAT

Figura 20

SEQ ID NO: 3 - Secuencia de ADN del gen *fadD1* con codones optimizados de *E. coli* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

TCATGATCGAGAA TTTTGGGAAGGACAAGTATCCGGCAGGTATTGCAGCAGAAATTAATCCGGATCAGTATCCGAATATTCGTA
 GCGTCTG AAGGAGAGCTGCCAACGTTTGGACCAAGCCGGCGTTTACGAACCTGGGTAAGACCTTGACCTATGGTGAGCTGTA
 CAAACTGTCTGGCGACTTCGCAGCGTACCTGCAACAACATACCGATCTGAAACCCGGTGATCGTATTGCCGTTACAGTCCCGAAC
 GTTCTGAGTACCCGATCGTTGTCTTCGGCGCAATGCGTGGGTCTGATCGTGTGAACACGAAACCCGTTGTATACGGCGCGGTG
 AGTTGGAA CACCAGTTTAAATGATAGCGGCGCAAAAAGCGGTGGTTTGTTTGGCTAATAATGGCCACCTGGTTGAAAGGTGTTTGGC
 GAAGACCGGTGTTAACAAGGTGATTGTCAACCGAGGTGGCGGACATTTCTGCCACCCGCTGAAGCGTTTCAATTTGTCAATTTTCGTGTC
 AAACACATT AAGAAGATGGTCCCGGCTATTCCTGCCGACGGCCACGAA GTTGACCGATGCACTGGCCCGTGTGCAGGCAAG
 AGCTTCCAAGAAAGCGGACCCGAGGCAACGACGTCGGGTGCTGCAGTACACCGGCGGTACCCACGGGCTCGCC AAGGGTGC
 GATGCTGACCCATCGTAACTGGTCCGCTAACATGTTGCAGTGAAGCGTGTGGTGCGAACCTGAACGAGGGTTGCGAAAT
 CTTGATTGCCCGGTTGCCGCTGATCACATTTATGGTTTACCTTCCACTGATGGCTATGATGCTGACGGTAAATCATAACATTC
 TGATACCAA TCCGGCGACCTGCCGAGCATGCTGAAGGACCTGGGTCAGTGGAA GTTCACGGGTTTCGTGGTCTGAATACGCT
 GTTCGTGCGCTGTGCAATAATGAGACCTTCCGTAAGCTGGACTTTAGCGCACTGAAGCTGACCCCTGACCGCGGCATGGCCGTG
 CAGCTGGCCACGGCGGAACGTTGGAAAGAGGTACAGGGTCCGCTATTTGCGAGGGTTATGGTATGACCGAAACGGCCCCGGTG
 GTTCCCGTCA ACCCGTTTCAGAACATTCAAAGTTGGCACCATCGGTAATCCGGTGCCAAAGCACCTTGTGAAGGTTATTGGCGGATG
 ACGGTCA AGAAGTTCGCTGGCGAGCGCGGTGAGTTGTGCGTCAAAGGTCGCCAGGTTATGAAGGCTACTGGCAGCGCCAGG
 AGGCAACGGACGAGATTCTGGACGCTGATGGTTGGTTGAAACCGGGGATATTGCAATTTATTCAAAGAAGACGGCTATATGCCGA
 TTGTCCGATCGTAAGAAGACATGA'HTTGGTTAGCGGTTTCAACGTTTACCCGAAATGAAATGGAAGATGTTTGGCGACCTTGCC
 GGGTGTGCTGCAATGGCGACGATCCGGTATCCCGGATGAAAGAGCGGCGAGTCTATCAAGGTTTTCGTTGTTGTGAAGCCCGG
 TCGGACCCCTGACCAAAGAGCAGGTGATGCAGCATAACCTGACCGGCTACAAACGCCCGAAAGCAGTGGAGTTCGG
 TGATAGCCCTGCCAACGACCAATGTTGGCAAGATTTTGGCGTCTGAGCTGCGGATGAAGAGCTGAAAAGGCAAGGCCAGGCCAAGATCA
AGAATTC

Figura 21

SEQ ID NO: 4 -el cebador BsyhfLBspHIF basado en la secuencia de ADN depositada en el NCBI con el código de registro NC_000964.

CATCAATGAATCTTGTTC

Figura 22

SEQ ID NO: 5 - el cebador BsyhfLEcoR basado en la secuencia de ADN depositada en el NCBI con el código de registro NC_000964.

CGGAATTCTTATTGGGGCAAAATATC

Figura 23

SEQ ID NO: 6 - secuencia de ADN del gen *yhfL* de *Bacillus subtilis*.

TCATGAATCTTGTTCAAAATTGGAAGAAACAGCATCTGAGAAAGCCGACAGCATCGCATGCAGGTTTAAAGATCACATGATGACGATCAAGAGCTGAATGAATATAATTCAGCGATTTGCGGACGGCTTCAGGAAGCCGGTATGGAGAAAGGGGACCAITTAGCTT
 TGCTGCTTGGCAATTCGCCGTGATTTTATCATCGCGTITTTTGGCGCTTAAAAGCTGGATCGTAGTTGTCCCATCAATCCGTTGT
 ACACGCCGACAGAAATTGGTTATATGCTGACAAATGGCGATGTAAAGGCAATCGTGGCGTTAGCCAGCTTTTGCCGCTTATGA
 GAGCATGATGAATCGCTGCCAAGGTTGCAAAAATAATGCGGCCGACATCTGCCGTAAACAACAACCAAGAACCTGTACCTGATGA
 GGTCAAGGATGAAAATGACAACGTTTGCAAAATAATGCGGCCGACATCTGCCGTAAACAACAACCAAGAACCTGTACCTGATGA
 TACCGGGTATTTATATACGTCAGGAACGACTGGAAAACCGAAAGGCGGATGCTGACACATCAGAAATTTGTACAGCAATGC
 CAACGATGCGCAGGCTATTTGGGAATGGATGAGAGGGACAAATGTGGTCTGCCCTCTCCCATGTGTACAGCAATGC
 GTCTGTATGAATGCACCGCTGATGAGCGCGCAACTGTATTTGATTGAGCCTCAATTCAGTCCGGCATCTGTTTTTAAAGCTTGTAA
 GCAGCAGCAGCGACCAATTTTGGCGGTGCTCCTACAATGTATAACTACTTTTTCAGCATGAAACGGAAAGAAGATGATTTT
 TCTTCGATCCGGCTGTCAATTCGGGAGGGCGGTCCATGCCAGTCCGTTGCTGACGGCGTTTGAAGAAAATTCGGTGTACCA
 TTTTGGAAAGGCTACGGCTCTCGGAAGCATCACCCGTACCGTCTTAACCCGTTTGCAGGGGCAAGAGCCGGCTCCATCGG
 GACAAATCTTACATGTCGAAACAAGGTCGTAGATCCGCTCGGACCGGAGCTGCCCGCTCACAGGTCGGCGAATTGATCGT
 GAAAGGCCCAATGTGATGAAAGGCTATTATAAAAATGCCGATGGAACACAGAGCATGCAATTAAGAAGACGGGTGGCTTTATACGGG
 GGACTTGGCAAGACGGGATGAGGACGGCTATTTTACATTTGACCCGAAAAAAGACATGATCAATTTAGGAGGATACAATGT
 GTATCCCGGGGAGGTGGAGGATGTTGACAGCCAATCCGGACGTCAGGAGGGGTTTGTATCCGGCTGCCGACCCCAAG
 CCGGGAAGCGGTAAGGGGATATGTTGTCGCAACGCTCTGGGTAAACAGAGGAGGACATCATGCAGCACTGCCGAAAGCATC
 TGGCAAAATACAAGCGGCTGCCGCCATTACGTTTCTTGACGATAATCCGAAAATGCGACGGGAAAATGCTCAGACGGGCAC
 TGAGAGATAATTTGCCCAATAAAGAAATTC

Figura 24

SEQ ID NO: 7 -el cebador Scfaa3pPciF diseñado basándose en la secuencia de ADN depositada en el NCBI con el código de registro NC_001141.

CGACATGTCCGAACAACAC

Figura 25

SEQ ID NO: 8 - el cebador Scfaa3pPcil diseñado basándose en la secuencia de ADN depositada en el NCBI con el código de registro NC_001141.

GCAAGCTTCTAAGAAATTTTCTTIG

Figura 26

SEQ ID NO: 9 – secuencia de ADN del gen estructural *faa3p* de *Saccharomyces cerevisiae*.

TCA**TG**AGTCTGGATGTCCTGGTGCAGAGCTATCCGAAGGGCGTTCCCGCCGAATCGACGTCAACGAAATCCATTCCGGTGGC
 CTCGGTCTTCGACGCTTCCGTGCGAAATTCGCGACCGTCCGCTACTCCAGTTCGGCAAGGTCTCAACCTATGGTGAGACG
 GACGGCTGGTCAACCCAGTTCGCCGCTACCTGTGGTGAAGTCAAGTCAAGGTTGACCGCTGACCGCTGATGATGCCCA
 ACTGCCAGTACCCGGTGGCCACCTTCGGCGTGTGCGCGGCTGACCGTGGTCAACGTCAACCCCGTGTACACCCGGCG
 CGAACTCAAGCACACAGCTGGTTGATGCCGGCTAGCCCTGGTGGTGGACAACTTCGGCGACACCGTCAACAGGTCAT
 CGCCGATACACCCGTCAAGCACGTGGTCAACACCCGCTGGCGAACCTGCTCGCGCAAGGGCGGATCGTCAACTTCGTGCT
 GAAGTACATCAAGAAGATGGTGCCCAACTACCACATCAAGGGCGCTCCGCTTCAAGCAGGGCTCAAGCTGGGCGAGCCGCA
 CGGCTTCCGGCGTGCAGATCGACCGACGACATGGCTTCCCTGCAGTACACCGGGGACCAACCGGCTGGCCAAAGGGTGC
 GATGCTGACCAACCGCAACCTGATCGCCAAATGACAGCGGCTAGCGTGGTGTCCACCTCCGGCATCGAGCCGGGCAAGGA
 AGTGATCACTGCCCTGCCGTGTACCACATCTTCGCATTGACCCCGAACCGCCTGGTCTTTATGAAGTTCGGTGGTCAAC
 CACCTGATACCAACCCACGGGACATGAAGGGCTTCGTAAGGAGCTCAAGGGCACCCGTTCACTGCCATCACCGGCTCAAC
 ACGCTGTTCAACGGCTGCTCAACACCCGGCTTCGACGAGATCGACTTCTTCCGTCAAGTTCAACCTGGCGGCGGCATGG
 CGGTGCAACGTGCCGTGGCCGAACGCTGGAAGAAGTCAACCGGCTGACCTGGTTCGAAGCCTATGGCTGACCGGACCTCGC
 CCGCGCTGCATCAATCCGCTCACCTGGCGGAGTACAACGGTGGCATCGGCTGCCGATCCCGTACCCGATGCCTGCATCAA
 GGACGACAAACGGCAACATCTGGCGCTGGGCGAAGTGGCGAGCTGTGCATCAAGGGCCCGCAGGTAATGAAGGGCTACTGGC
 AGCGTCCGGGAAGAAACCGCCACCGCCATCGATGCGGACGGTGGTGCACACCGGGACATGGCGAAGATGGACGACAGGGC
 TTCTTCTACATCGTGCACCGCAAGAAAGGACATGATCCTGGTGTCCGGCTTCAACGTGTACCCGAAATGAGTTCGAAACCGTCA
 CGATGATGCCGGGGCTGGTGAAGTCCCGCGCTGGTGTCCCGGACGAAAGTCCGGGAAAGTGGTCAAGGTCGATCGTGA
 AGAAGGACCCGAACCTGACCCGGGAAATGGTCAAGGAACATGCGCGGGCAACCTGACCGGTTACAAAGCACCCCAAGATCGTA
 GAATCCGAAAGGAGCTGCCGAAGACCAACGTCCGCAAGATCTCCGTCCGAGCTGCTGATACGCCCGCCCGGTAAGAAATTC

Figura 27.

SEQ ID NO: 10 – el cebador Smprk59BspF basado en la secuencia de ADN depositada en el NCBI con el código de registro NZ_AAVZ01000044.

AGTCATGAGTCTGGATCG

Figura 28
SEQ ID NO: 11 - el cebador Smprk59HindR basado en la secuencia de ADN depositada en el NCBI con el código de registro NZ_AAVZ01000044.

GGAAGCTTACGGGGGGCG

Figura 29
SEQ ID NO: 12 – el cebador PrkBsp

GCGAACGGCCTGGTCTTTATGAAGTTCGGTGG

Figura 30

SEQ ID NO: 13 - secuencia de ADN del gen que codifica para la proteína ZP_01644857 de *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3.

TCATGAGTCTGGATCGTCCCTGGGTGCAGAGCTATCCGAAAGGGGTTCCCGCCGAAAATCGACGTCAACGAAATCCATTCCGTCGG
 CTCGGTCTCGACGCTTCGGTCGGAAATCCGGCACCGTCCCGCTACTCCAGCTTCGGCAAGTCTCACCTATGGTGAAGACG
 GACGGCTGGTACCCAGTTCGCCCTACTCTGCTGGTGAAGTCAAGAAAGGTGACCGGTCGCCCTGATGATGCCCA
 ACTGCTGCAGTACCCGGTGGCCACCTTCGGGTGCTGGCGCGGCTGACCGTGGTCAACGTCAACCCCTGTACACCCGGCGG
 CGAATCAAGCACAGTGGTTGATGCCGGCTCAGCCCTGGTGGTGCACAACTTCGGCGACACCCGTCCGAACAGGTGAT
 CGCCGATACACCGGTCAAGCACGTGGTCAACACCGGCTGGGCACTGCTCGGCGCCAAGGGCGGCTCAAGCTGGGCAAGCCGCCA
 GAAGTACATCAAGAAGATGGTGCCTCAACTACACATCAAGGGCGCCCTGCTGAGTACACCGGCGGGACCAACCGGCGTGGCCAAAGGGTGC
 CGCGTTCGGCGGTGAGATCGACACGACGACATTCCTGACAGTACACCGGCGGGTCCAGCTGGCTGCCACCTCCGGCATCGAGCCGGCAAGGA
 GATGCTGACCAACCGCAACCTGATCGCCAAACATGCAGCAGGCTGACCGTGGCTGACCGGCAACCGGCTGGTCTTATGAAGTTCGGTGGCTGCAAC
 AGTGATCATCACTGCCCTGGCGTGTACACATCTTCGCAATGACCGGCAACCGGCTGGTCTTATGAAGTTCGGTGGCTGCAAC
 CACCTGATCAACCAACCGGACATGAAGGGCTTCGTAAGGAGCTCAAGGGCACCCGCTTCACTGCCATCACCGGCTGCAAC
 ACGTGTTCACAGGCTGCTCAACACCCGGGCTTCGACGAGATCGACTTCTTTCGGTCAAGTTTCAACCTGGCGCGCGGCATGG
 CGGTGCAACGTGCCGTGGCCGAACGCTGGAAGAAGTCAACCGGCTGACCCCTGGTCAAGCTTACCGCTGACCCGAGACCTCGC
 CCGCGGCTGCATCAATCCGCTCACCCCTGCCGAGTACAACGGTGGCTGCCATCCCGTACCCGCTACCCGATGCCCTGCATCAA
 GGACGACAACGGCAACATCTGGCGCTGGCGGAAGTGGGCGAGCTGTGCAACAAGGGCCCGCAGGTAATGAAGGGCTACTGGC
 AGCGTCCGGAAGAACCAGCAACCGCCATCGATCGGACCGGCTGGTGCACACCGGCGACATGGCGAAGATGGACGAACAGGGC
 TTCTTACATCGTCCGACCGCAAGAGGACATGATCCGTGGTTCGGGTTCAACGTGTACCCGAAAGTGGTCAAGGTGATCGTGA
 CGATGATGCCGGGCGTGGTGAAGTCCCGCCCGTCCGTTCCCGGACGAAAGTCCCGGCAAGTGGTCAAGGTGATCGTGA
 AGAAGGACCCGAAACCTGACCCGGAAATGGTCAAGGAACATGCCGCGGGCAACCTGACCCGTTACAAGCAACCCCAAGATCGTA
 GAATCCGAAAGGAGCTGCCGAAAGACCAACGTCGGCAAGATCCCTCCGTCCGAGCTGCGTGATACGCCCGCCCGTAAAGAAATTC

Figura 31

SEQ ID NO: 14 - secuencia de proteina de ZP_01644857 de *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 17679.

MSLDRPWLQSYPKGVPAEIDVNEFHSVASVFDASVAKFRDRPAYSSFGKVLTYGETDALVTQFAAYLLGELKLLKGGDRVALMMPNC
 LQYPVATFGVLRAGLTVVNVNPLYTARELKHQLVDAGVSALVVVDNFGDIVEQVIADTPVKHVVTTLGLDLLGAKGAIVNFVLKYI
 KKMVPNYHIKGA VRFKQALKLSRHALPPVEIDHDDIAFLQYTGTTGVAKGAMLTNRNLJANMQQASAWLSTSGIEPGKEVIITALP
 LYHIFALTANGLVFMKFGGCNHLITNPRDMKGFVKELKGTTRFTAITGVNNTLFNGLLNTPGFDEIDFSSVKFTLGGGMAVQRAVAERWK
 KVTGVTLVEAYGLTETSPAACINPLTLPEYNGAIGLPIPSTDAKIKDDNGNILALGEV GELCIKGPQVMKGYWQRPEETATAIDADGWL
 HTGDMAKMDEQGGFFYIVDRKKDMILVSGFNVPNEVEDVIAMMPGVLEAAVGVPEKSGEVVKVVIVKDDPNLTAEMVKEHARA
 NLTGYKHPRIVEFRKELPKTNVGVKILRRELDTPA