

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 412**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/10** (2006.01)

**C12P 7/64** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 1/15** (2006.01)

**C12N 9/18** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/US2013/032564**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014 WO14042693**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13714142 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2895602**

54 Título: **Variantes enzimáticas con propiedades de éster sintasa mejoradas**

30 Prioridad:

**14.09.2012 US 201261701191 P**

**01.10.2012 US 201261708424 P**

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

**21.12.2017**

73 Titular/es:

**REG LIFE SCIENCES, LLC (100.0%)**

**600 Gateway Boulevard**

**South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**SHUMAKER, ANDREW;**

**DA COSTA, BERNARDO, M.;**

**HOLDEN, KEVIN;**

**HOM, LOUIS, G.;**

**BARON, TARAH, S. y**

**HELMAN, NOAH**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

ES 2 647 412 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

Variantes enzimáticas con propiedades de éster sintasa mejoradas

## Campo

La divulgación se refiere a variantes enzimáticas con propiedades de éster sintasa mejoradas para la producción de ésteres grasos.

## Antecedentes

El petróleo es un recurso natural limitado que se encuentra en la tierra en formas líquida, gaseosa o sólida. Sin embargo, los productos del petróleo se desarrollan con costes considerables, tanto financieros como medioambientales. En su forma natural, el petróleo crudo extraído de la Tierra tiene pocos usos comerciales. Es una mezcla de hidrocarburos, por ejemplo, parafinas (o alcanos), olefinas (o alquenos), alquinos, naftenos (o cicloalcanos), compuestos alifáticos, compuestos aromáticos, etc. de longitud y complejidad variables. Además, el petróleo crudo contiene otros compuestos orgánicos (por ejemplo, compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, oxígeno, azufre, etc.) e impurezas (por ejemplo, azufre, sal, ácido, metales, etc.). Debido a su alta densidad de energía y su fácil transportabilidad, la mayor parte del petróleo se refina para dar combustibles, tales como combustibles de transporte (por ejemplo, gasolina, diésel, combustible de aviación, etc.), gasóleo de calefacción, gas licuado de petróleo, etc.

Los productos petroquímicos pueden usarse para producir productos químicos especializados, tales como plásticos, resinas, fibras, elastómeros, productos farmacéuticos, lubricantes o geles. Ejemplos de productos químicos especializados que pueden producirse a partir de materiales de partida petroquímicos incluyen ácidos grasos, hidrocarburos (por ejemplo, hidrocarburos de cadena larga, hidrocarburos de cadena ramificada, hidrocarburos saturados, hidrocarburos insaturados, etc.), alcoholes grasos, ésteres, aldehídos grasos, cetonas, lubricantes, etc. Los productos químicos especializados tienen muchos usos comerciales. Los ácidos grasos se usan comercialmente como tensioactivos. Los tensioactivos pueden encontrarse, por ejemplo en detergentes y jabones. Los ácidos grasos también pueden usarse como aditivos en combustibles, aceites lubricantes, pinturas, lacas, velas, mantequilla, cosméticos y emulsionantes. Además, los ácidos grasos se usan como activadores aceleradores en productos de caucho. Los ácidos grasos también pueden usarse como materia prima para producir ésteres metílicos, amidas, aminas, cloruros de ácido, anhídridos, dímeros de ceteno y peroxiácidos y ésteres.

Los ésteres tienen muchos usos comerciales. Por ejemplo, el biodiesel, un combustible alternativo, está compuesto de ésteres (por ejemplo, éster metílico de ácidos grasos, ésteres etílicos de ácidos grasos, etc.). Algunos ésteres de bajo peso molecular son volátiles con un olor agradable que los hace útiles como fragancias o agentes saborizantes. Además, se usan ésteres como disolventes para lacas, pinturas y barnices. Además, algunas sustancias que se producen de manera natural, tales como ceras, grasas y aceites están compuestas de ésteres. También se usan ésteres como agentes de ablandamiento en resinas y plásticos, plastificantes, retardadores de la llama y aditivos en gasolina y gasoil. Además, pueden usarse ésteres en la fabricación de polímeros, películas, materiales textiles, colorantes y productos farmacéuticos.

Hay una necesidad de rutas alternativas para crear tanto combustibles como productos actualmente derivados del petróleo. Como tales, los sistemas microbianos ofrecen el potencial para la producción biológica de numerosos tipos de biocombustibles y productos químicos. Pueden derivarse productos químicos y combustibles renovables de organismos modificados por ingeniería genética (tales como bacterias, levaduras y algas). Pueden alterarse genéticamente rutas de biosíntesis que se producen de manera natural para permitir que los organismos modificados por ingeniería genética sinteticen productos químicos y combustible renovables. Además, pueden adaptarse microbios, o modificarse metabólicamente, para que utilicen diversas fuentes de carbono como materia prima para la producción de productos químicos y combustible. Por ejemplo, puede producirse FAME (éster metílico de ácidos grasos) añadiendo metanol a un cultivo de una célula huésped recombinante que expresa una éster sintasa de cera, por ejemplo, una éster sintasa de cera derivada de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ("*M. hydrocarbonoclasticus*"). Sin embargo, la expresión de la éster sintasa de cera silvestre de *M. hydrocarbonoclasticus* no produce cantidades significativas de FAME, por tanto el desarrollo de una éster sintasa de cera mejorada es altamente deseable. Además, la éster sintasa de cera silvestre de *M. hydrocarbonoclasticus* produce cantidades significativas de beta-hidroxí ( $\beta$ -OH)-ésteres, que normalmente no se encuentran en combustible o productos químicos derivados de fuentes vegetales. Véase, por ejemplo, la solicitud según el Tratado de Cooperación en materia de Patentes n.º PCT/US 12/31682, que se incorpora como referencia en el presente documento. Por tanto, sería deseable modificar por ingeniería genética una éster sintasa para producir rendimientos superiores de éster graso; y una éster sintasa que produzca rendimientos superiores de éster graso sin producir cantidades significativas de  $\beta$ -OH-éster, cuando se expresa en una célula huésped recombinante. Finalmente, sería deseable modificar por ingeniería genética otras enzimas que tengan actividad éster sintasa para mejorar adicionalmente el rendimiento de la producción de éster graso. El documento US 2011/072714 se refiere a métodos y composiciones para producir derivados de ácidos grasos, y describe variantes de una éster sintasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 con una o más sustituciones, adiciones, inserciones o deleciones de aminoácidos, en los que la éster sintasa variante puede presentar actividad éster sintasa y/o aciltransferasa.

A pesar de los avances en el campo, sigue habiendo la necesidad de mejoras en enzimas modificadas genéticamente, células huésped recombinantes, métodos y sistemas con el fin de lograr una producción robusta y rentable de productos químicos y combustibles de interés mediante fermentación de células huésped recombinantes. La presente divulgación aborda esta necesidad proporcionando varias variantes enzimáticas de éster sintasa que aumentan el rendimiento de ésteres grasos. Algunas de las variantes enzimáticas de éster sintasa de la divulgación también alteran (es decir, aumentan o reducen) el contenido de  $\beta$ -OH-éster de la composición de ésteres grasos producida mediante fermentación de células huésped recombinantes que expresan las variantes enzimáticas de éster sintasa. La presente divulgación aborda además esta necesidad proporcionando varias variantes de tioesterasa que se han modificado por ingeniería genética para que tengan mayor actividad éster sintasa, potenciando además de ese modo la producción de éster graso.

## Sumario

Un aspecto de la divulgación proporciona un polipéptido de éster sintasa variante que tiene SEQ ID NO: 2, en el que el polipéptido de éster sintasa variante se modifica por ingeniería genética para que tenga al menos una mutación en una posición de aminoácido incluyendo, pero sin limitarse a, los aminoácidos 4, 5, 7, 15, 24, 30, 33, 39, 40, 41, 43, 44, 58, 73, 76, 77, 78, 80, 98, 99, 101, 102, 111, 122, 131, 146, 147, 149, 150, 155, 157, 162, 164, 166, 170, 171, 172, 173, 177, 179, 182, 184, 185, 186, 187, 188, 190, 192, 193, 195, 197, 201, 202, 203, 206, 207, 212, 216, 219, 234, 239, 242, 243, 244, 246, 255, 257, 258, 259, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 285, 288, 289, 293, 294, 301, 302, 303, 304, 306, 307, 309, 310, 311, 313, 314, 315, 316, 317, 319, 320, 323, 328, 334, 348, 349, 351, 352, 353, 356, 357, 360, 366, 375, 381, 393, 394, 395, 409, 411, 413, 420, 424, 442, 443, 447, 454, 455, 457, 458, 461, 466, 468 y 472, en el que el polipéptido de éster sintasa variante tiene actividad de éster metílico de ácidos grasos mejorada en comparación con un polipéptido silvestre correspondiente. En un aspecto relacionado, el polipéptido variante es un polipéptido de éster sintasa de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (WS377). En otro aspecto relacionado, la expresión del polipéptido de éster sintasa variante en una célula huésped recombinante da como resultado un título superior de composiciones de ésteres grasos en comparación con una célula huésped recombinante que expresa el polipéptido silvestre correspondiente. El título es de al menos aproximadamente el 5 por ciento o mayor. Las composiciones de ésteres grasos incluyen, pero no se limitan a, ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE), ésteres propílicos de ácidos grasos, ésteres isopropílicos de ácidos grasos, ésteres butílicos de ácidos grasos, monoglicéridos, ésteres isobutílicos de ácidos grasos, ésteres 2-butílicos de ácidos grasos y ésteres terc-butílicos de ácidos grasos. La éster sintasa variante tiene actividad éster sintasa mejorada, particularmente actividad de éster metílico de ácidos grasos mejorada que da como resultado propiedades mejoradas incluyendo, pero sin limitarse a, beta-hidroxiésteres aumentados, beta-hidroxiésteres disminuidos, longitudes de cadena aumentadas de ésteres de ácidos grasos y longitudes de cadena disminuidas de ésteres de ácidos grasos.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un polipéptido de éster sintasa variante que tiene SEQ ID NO: 2, en el que el polipéptido de éster sintasa variante se modifica por ingeniería genética para que tenga al menos una mutación en una posición de aminoácido incluyendo, pero sin limitarse a, los aminoácidos 7, 24, 30, 41, 99, 111, 122, 146, 147, 149, 150, 171, 172, 173, 179, 187, 192, 212, 234, 239, 244, 246, 258, 264, 266, 267, 285, 301, 302, 303, 304, 306, 307, 309, 310, 311, 313, 314, 315, 316, 320, 348, 349, 352, 356, 357, 360, 375, 381, 393, 409, 411, 424, 443, 455, 457, 458, 461 y 472. La expresión del polipéptido de éster sintasa variante en una célula huésped recombinante puede dar como resultado la producción de un porcentaje alterado de beta-hidroxiésteres en comparación con una célula huésped recombinante que expresa el polipéptido de éster sintasa silvestre correspondiente, en el que el porcentaje alterado de beta-hidroxiésteres es un porcentaje aumentado o disminuido de beta-hidroxiésteres.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un polipéptido de éster sintasa variante que tiene SEQ ID NO: 2, en el que el polipéptido de éster sintasa variante se modifica por ingeniería genética para que tenga al menos una mutación en una posición de aminoácido incluyendo, pero sin limitarse a, los aminoácidos 5, 7, 15, 24, 33, 44, 58, 73, 78, 101, 111, 162, 171, 179, 184, 187, 188, 192, 201, 207, 212, 234, 243, 244, 255, 257, 267, 307, 310, 317, 320, 348, 349, 353, 357, 366, 381, 394, 409, 411, 413, 442, 443 y 461.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un polipéptido de éster sintasa variante que tiene SEQ ID NO: 2, en el que el polipéptido de éster sintasa variante se modifica por ingeniería genética para que tenga al menos una mutación en una posición de aminoácido incluyendo, pero sin limitarse a, los aminoácidos G4R, T5P, T5S, D7N, S15G, T24M, T24W, L30H, G33D, G33S, L39A, L39M, L39S, R40S, D41A, D41G, D41H, D41Y, V43K, V43S, T44A, T44F, T44K, Y58C, Y58L, A73Q, V76L, D77A, K78F, K78W, I80V, R98D, E99Q, G101L, I102R, P111D, P111 G, P111S, H122S, R131M, I146K, I146L, I146R, S147A, V149L, R150P, V155G, T157S, R162E, N164D, N164R, P166S, T170R, T170S, V171E, V171F, V171H, V171R, V171W, R172S, R172W, P173W, R177V, A179S, A179V, D182G, E184F, E184G, E184L, E184R, E184S, A185L, A185M, S186T, V187G, V187R, P188R, A190P, A190R, A190W, S192A, S192L, S192V, Q193R, Q193S, M195G, A197T, A197V, Q201A, Q201V, Q201W, A202L, D203R, P206F, R207A, G212A, G212L, V216I, V219L, V234C, H239G, T242K, T242R, A243R, Q244G, R246A, R246G, R246L, R246Q, R246V, R246W, D255E, L257I, K258R, N259E, N259Q, L260V, H262Q, A263V, S264D, S264V, S264W, G265N, G266A, G266S, S267G, A285L, A285R, A285V, N288D, N289E, N289G, T293A, P294G, V301A, N302G, I303G, I303R, I303W, R304W, A306G, D307F, D307G, D307L, D307N, D307R, D307V, E309A, E309G, E309S, G310H, G310R, G310V, T311S, T313S, Q314G, I315F, S316G, F317W, I319G, A320C, A323G, D328F,

Q334K, Q334S, Q348A, Q348R, K349A, K349C, K349H, K349Q, P351G, K352I, K352N, S353K, S353T, T356G, T356W, Q357V, M360Q, M360R, M360S, M360W, Y366G, Y366W, G375A, G375V, G375S, V381F, E393G, E393R, E393W, G394E, T395E, V409L, L411A, A413T, I420V, S424G, S424Q, S442E, S442G, M443G, A447C, A447I, A447L, L454V, D455E, L457Y, E458W, I461G, I461L, I461V, K466N, A468G, K472T y K472. En un aspecto particular de la divulgación el polipéptido de éster sintasa variante incluye las mutaciones D7N, A179V y V381F; D7N, A179V, Q348R y V381F; D7N, A179V, V187R, G212A, Q357V, V381F y M443G; T5S, S15G, P111S, V171R, P188R, F317W, S353T, V409L y S442G; T5S, S15G, K78F, P111S, V171R, P188R, S192V, A243R, F317W, K349H, S353T, V409L y S442G; T5S, S15G, V76L, P111S, V171R, P188R, K258R, S316G, F317W, S353T, M360R, V409L y S442G; T5S, S15G, P111S, V171R, P188R, Q244G, S267G, G310V, F317W, A320C, S353T, Y366W, V409L y S442G; S15G, P111S, V155G, P166S, V171R, P188R, F317W, Q348A, S353T, V381F, V409L y S442G; S15G, L39S, D77A, P111S, V171R, P188R, T313S, F317W, Q348A, S353T, V381F, V409L, I420V y S442G; T5S, S15G, T24W, T44F, P111S, I146L, V171R, P188R, D307N, F317W, S353T, V409L y S442G; T5S, S15G, K78F, P111S, V171R, P188R, S192V, R207A, A243R, D255E, L257I, N259Q, L260V, H262Q, G265N, A285V, N288D, N289G, F317W, Q348R, S353T, V381F, V409L y S442G; T5S, S15G, K78F, P111S, V171R, P188R, S192V, R207A, A243R, D255E, L257I, N259Q, L260V, H262Q, G265N, A285V, N288D, N289G, F317W, H349K, S353T, V381F, V409L y S442G; T5P, S15G, G33D, T44K, Y58L, P111S, R162E, V171R, P188R, R207A, V234C, Q244G, D255E, S267G, D307N, G310V, F317W, A320C, S353T, Y366W, G394E, V409L, S442G e I461V; T5P, S15G, G33D, T44K, Y58L, P111S, V171R, P188R, R207A, V234C, Q244G, L257I, S267G, D307N, G310V, F317W, A320C, S353T, Y366W, G394E, V409L, A413T, S442G e I461V; T5P, S15G, T44A, P111S, T157S, N164D, T170S, V171R, P188R, R207A, V216I, V234C, Q244G, L257I, S267G, D307N, G310V, F317W, A320C, Q334K, S353T, Y366W, G394E, V409L, S442G e I461V; o mutaciones T5P, S15G, Y58L, P111S, R162E, T170S, V171R, A179S, P188R, R207A, V234C, Q244G, L257I, S267G, D307N, G310V, F317W, A320C, S353K, Y366W, G394E, V409L, S442G e I461V.

Otro aspecto de la divulgación proporciona una célula huésped recombinante modificada por ingeniería genética para que exprese un polipéptido de éster sintasa variante. En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona una célula huésped recombinante cultivada que tiene una secuencia de polinucleótido que codifica para un polipéptido de éster sintasa variante, en el que la célula huésped recombinante, cuando expresa el polipéptido de éster sintasa variante, produce una composición de ésteres de ácidos grasos con título superior, rendimiento superior y/o productividad superior de ésteres de ácidos grasos en comparación con una célula huésped que expresa el polipéptido silvestre correspondiente, cuando se cultiva en un medio que contiene una fuente de carbono en condiciones eficaces para expresar el polipéptido de éster sintasa variante. El título es de al menos aproximadamente el 5 por ciento o mayor. En un aspecto relacionado, la célula huésped recombinante, cuando expresa el polipéptido de éster sintasa variante, produce una composición de ésteres grasos con un porcentaje alterado de beta-hidroxiésteres en comparación con una células huésped que expresa el polipéptido de éster sintasa silvestre. En el presente documento, el porcentaje alterado de beta-hidroxiésteres es un porcentaje aumentado o disminuido de beta-hidroxiésteres.

Todavía otro aspecto de la invención proporciona un cultivo celular que incluye la célula huésped recombinante y una composición de ésteres grasos. La composición de ésteres grasos puede incluir uno o más de un éster graso C6, C8, C10, C12, C13, C14, C15, C16, C17 o C18. Además, la composición de ésteres grasos puede incluir ésteres grasos insaturados y/o ésteres grasos saturados y/o ésteres grasos de cadena ramificada. La composición de ésteres grasos puede incluir además un éster graso que tiene un doble enlace en la posición 7 en la cadena de carbono entre C7 y C8 a partir del extremo reducido del éster graso.

La divulgación contempla además un polipéptido de éster sintasa de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (WS377) variante que tiene SEQ ID NO: 2, en el que el polipéptido de WS377 variante tiene actividad de éster metílico de ácidos grasos mejorada en comparación con el polipéptido de WS377 silvestre, y en el que el WS377 variante tiene al menos una mutación en una posición de aminoácido incluyendo, pero sin limitarse a, los aminoácidos 4, 5, 7, 15, 24, 30, 33, 39, 40, 41, 43, 44, 58, 73, 76, 77, 78, 80, 98, 99, 101, 102, 111, 122, 131, 146, 147, 149, 150, 155, 157, 162, 164, 166, 170, 171, 172, 173, 177, 179, 182, 184, 185, 186, 187, 188, 190, 192, 193, 195, 197, 201, 202, 203, 206, 207, 212, 216, 219, 234, 239, 242, 243, 244, 246, 255, 257, 258, 259, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 285, 288, 289, 293, 294, 301, 302, 303, 304, 306, 307, 309, 310, 311, 313, 314, 315, 316, 317, 319, 320, 323, 328, 334, 348, 349, 351, 352, 353, 356, 357, 360, 366, 375, 381, 393, 394, 395, 409, 411, 413, 420, 424, 442, 443, 447, 454, 455, 457, 458, 461, 466, 468 y 472.

La divulgación abarca todavía una célula huésped recombinante que incluye (a) un polinucleótido que codifica para un polipéptido variante con actividad éster sintasa aumentada, (b) un ácido graso activado y (c) un alcohol, en la que la célula huésped recombinante produce una composición de ésteres grasos en condiciones eficaces para expresar una actividad éster sintasa del polipéptido variante. El ácido graso activado es un acil-ACP o un acil-CoA. Las células huésped recombinantes pueden utilizar además una fuente de carbono. La composición de ésteres grasos se produce a un título de menos de aproximadamente el 5 por ciento o superior.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido de éster sintasa variante, en el que el polinucleótido tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 85% con SEQ ID NO: 1, en el que el polinucleótido incluye además SEQ ID NO: 27 antes del inicio de ATG.

Aún, otro aspecto de la divulgación proporciona un polipéptido de éster sintasa variante que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 95% con SEQ ID NO: 29; una identidad de secuencia del 95% con SEQ ID NO: 33; o una identidad de secuencia del 95% con SEQ ID NO: 35; o una identidad de secuencia del 95% con SEQ ID NO: 37; o una identidad de secuencia del 95% con SEQ ID NO: 39; o una identidad de secuencia del 95% con SEQ ID NO: 41; o una identidad de secuencia del 95% con SEQ ID NO: 43. En el presente documento, la expresión del polipéptido de éster sintasa variante en una célula huésped recombinante da como resultado una producción de un título superior, rendimiento superior o productividad aumentada de ésteres de ácidos grasos en comparación con una célula huésped recombinante que expresa un polipéptido de éster sintasa de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (WS377) silvestre. El título es de al menos aproximadamente el 5% o superior.

La invención se define en las reivindicaciones.

### Breve descripción de las figuras

La presente divulgación se entiende mejor cuando se lee junto con las figuras adjuntas, que sirven para ilustrar las realizaciones preferidas. Sin embargo, se entiende que la divulgación no se limita a las realizaciones específicas dadas a conocer en las figuras.

La figura 1 es una representación esquemática de una ruta de biosíntesis de tres genes a modo de ejemplo que pueden incorporarse en células huésped recombinantes para la producción de ésteres de ácidos grasos de diversas longitudes de cadena. Las abreviaturas usadas incluyen TE para tioesterasa, FACS para acil graso CoA sintetasa y AT para aciltransferasa.

La figura 2 es una representación esquemática de un ciclo fútil propuesto catalizado por tioesterasa.

La figura 3 es una representación esquemática de dos rutas de biosíntesis a modo de ejemplo para la producción de ésteres grasos partiendo de acil-ACP, en donde la producción de ésteres grasos se logra mediante un sistema de una enzima o un sistema de tres enzimas.

La figura 4 muestra los resultados de un examen de CG-FID a partir de una fermentación en placa de aciertos de una biblioteca de combinación. La biblioteca de combinación se construyó usando cebadores de Grupo 0 y pKEV38 como molde, transformada en BD64.

La figura 5 muestra títulos de FAME y el % de  $\beta$ -OH FAME producido por las cepas mutantes KEV040, KEV075 y KEV085 en comparación con una cepa que contiene éster sintasa de '377 silvestre.

La figura 6 muestra el título de especies de ácidos grasos totales producidas por KEV040 (Wax) y becos.128 (*Ppro*) cuando se alimentó metanol, etanol, 1-propanol, isopropanol, 1-butanol o glicerol a las cepas.

Las figuras 7A y 7B muestran el título y el % de FAME (figura 7A) o FAEE (figura 7B) producidos cuando se alimentó con metanol una biblioteca de combinación de *Ppro* construida para evaluar la capacidad de las variantes de *Ppro* para usar metanol para producir FAME (figura 7 A) o etanol para producir FAEE (figura 7B).

La figura 8 muestra la composición de especies de ácidos grasos producidos por becos.128 cuando se cultiva en presencia de metanol, etanol, 1-propanol, isopropanol, 1-butanol o glicerol (alimentados). FFA se refiere a especies de ácidos grasos libres y FAE se refiere a las especies de éster.

### Descripción detallada

#### Visión general

La divulgación se refiere a variantes enzimáticas con propiedades de éster sintasa mejoradas para la producción de ésteres grasos. En el presente documento, la divulgación se refiere a enzimas tales como enzimas éster sintasa variantes que tienen propiedades de éster sintasa mejoradas y enzimas tioesterasa variantes diseñadas para que tengan actividad éster sintasa. Ambos tipos de enzimas se modifican por ingeniería genética para mejorar la producción de ésteres grasos cuando se usan solas o en combinación con otras proteínas. Con el fin de ilustrar esto, los solicitantes han modificado por ingeniería genética una éster sintasa de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* y una tioesterasa de *Photobacterium profundum* para producir ésteres grasos *in vivo* sin la necesidad de sobreexpresar una acil graso-CoA sintetasa o una tioesterasa diferente. Hasta la fecha, se ha pensado que con el fin de producir rendimientos superiores de ésteres grasos, al menos una enzima acil-CoA sintetasa o una tioesterasa tiene que sobreexpresarse simultáneamente con una éster sintasa porque cualquier producción de éster graso requiere la coexpresión de tioesterasa, acil-CoA sintetasa y éster sintasa. Además, se sabe que éster sintasas nativas y tioesterasas nativas de *Marinobacter* en general utilizan alcoholes de cadena corta. Sin embargo, los solicitantes han modificado por ingeniería genética enzimas variantes con actividad éster sintasa de manera que las enzimas pueden utilizar alcoholes de cadena corta, incluyendo metanol y etanol, permitiendo que las enzimas produzcan ésteres grasos. Por ejemplo, la éster sintasa variante y tioesterasa variante con actividad éster sintasa puede producir éster(s) metílico(s) de ácidos grasos (FAME) y/o éster(es) etílico(s) de ácidos grasos (FAEE) en altas

cantidades. Como tal, los solicitantes han modificado por ingeniería genética enzimas variantes que pueden conducir a una producción superior de ésteres *in vivo*.

En el presente documento, los solicitantes emplean un sistema de un gen conveniente (véase al figura 3) para la producción de ésteres grasos. Un sistema de un gen emplea normalmente un gen que codifica para una enzima variante con actividad éster sintasa mejorada en combinación con un ácido graso activado, tal como un acil-ACP o acil-CoA, (es decir, como sustrato) y alcohol para producir ésteres grasos en una célula huésped recombinante. Hay determinadas ventajas del uso de un sistema de un gen (es decir, en vez de un sistema de múltiples genes) para la producción de ésteres grasos. Por ejemplo, una de tales ventajas es la simplicidad del propio sistema que permite que se implemente más rápidamente y se monitorice más fácilmente. Otra ventaja es que un sistema de un gen es más eficiente energéticamente para la célula porque probablemente sortea o evita el denominado ciclo fútil (es decir, un ciclo fútil de sustrato, en el que dos rutas metabólicas discurren simultáneamente en direcciones opuestas y no tienen un efecto global), aumentando de ese modo el rendimiento de producción de éster *in vivo*.

Más específicamente, la producción de ésteres de ácidos grasos en *Escherichia coli* se basa normalmente en la coexpresión de una tioesterasa (*tesA*), una acil-CoA sintetasa (*fadD*) y una cera o éster sintasa. Con el fin de maximizar la producción de ésteres, los tres genes se equilibran cuidadosamente con el fin de minimizar la producción de ácidos grasos libres ("FFA"). La tioesterasa puede actuar sobre tanto acil-ACP (producto de la biosíntesis de ácidos grasos) como acil-CoA (producto de acil-CoA sintetasa) generando ácidos grasos libres (sustrato de acil-CoA sintetasa). La presente divulgación se refiere a una éster sintasa modificada que tiene propiedades mejoradas en relación con la enzima silvestre, clonada a partir de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798 GenBank: EF219377 (denominada en el presente documento "377"). Se ha mostrado que la '377 modificada actúa sobre tanto acil-ACP como acil-CoA para generar ésteres de ácidos grasos tales como éster metílico de ácidos grasos ("FAME").

Además, el porcentaje de FAME de las especies de acilo totales (FAME + FFA) generadas varía dependiendo de la tioesterasa que esté usándose. La *tesA* de *Photobacterium profundum* ("*P. profundum*" o "*Ppro*") produce de manera natural un pequeño porcentaje de FAME. La *tesA* de *Photobacterium profundum* se modificó por ingeniería genética para que produjera un porcentaje superior de FAME. Por tanto, la presente divulgación se refiere además a una tioesterasa modificada (*tesA*) de *Photobacterium profundum* (denominado en el presente documento "*Ppro*") que se modificó por ingeniería genética para producir un porcentaje superior de FAME sin la necesidad de sobreexpresar cualquier otro gen en una célula huésped tal como *E. coli*. Aunque no se desea restringirse a la teoría, una éster sintasa que actúa directamente sobre acil-ACP (un producto de biosíntesis de ácidos grasos) podría eliminar el ciclo fútil que existe teóricamente en la ruta de biodiesel actual, reservando por tanto recursos de la célula, que podrían dirigirse hacia la biosíntesis de ácidos grasos, lo que debe también mejorar la producción.

#### Definiciones

Tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula huésped recombinante" incluye dos o más de tales células huésped recombinantes, la referencia a "un éster graso" incluye uno o más ésteres grasos, o mezclas de ésteres, la referencia a "una secuencia codificante de ácido nucleico" incluye una o más secuencias codificantes de ácido nucleico, la referencia a "una enzima" incluye una o más enzimas, y similares.

Los números de registro de secuencias en la totalidad de esta descripción se obtuvieron de bases de datos proporcionadas por el NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) mantenidas por los Institutos Nacionales de Salud, EE.UU. (que se identifican en el presente documento como "números de registro de NCBI" o alternativamente como "números de registro de GenBank"), y de las bases de datos UniProt Knowledgebase (UniProtKB) y Swiss-Prot proporcionadas por el Instituto Suizo de Bioinformática (que se identifican en el presente documento como "números de registro de UniProtKB").

Los números EC se establecen por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), cuya descripción está disponible en el sitio web de Nomenclatura de Enzimas del IUBMB en Internet. Los números EC clasifican las enzimas según la reacción catalizada.

Tal como se usa en el presente documento, el término "nucleótido" se refiere a una unidad monomérica de un polinucleótido que consiste en una base heterocíclica, un azúcar y uno o más grupos fosfato. Las bases que se producen de manera natural (guanina, (G), adenina, (A), citosina, (C), timina, (T) y uracilo (U)) son normalmente derivados de purina o pirimidina, aunque debe entenderse que también están incluidos análogos de bases que se producen de manera natural y no natural. El azúcar que se produce de manera natural es la pentosa (azúcar de cinco carbonos), la desoxirribosa (que forma ADN) o la ribosa (que forma ARN), aunque debe entenderse que también están incluidos análogos de azúcares que se producen de manera natural y no natural. Los ácidos nucleicos se unen normalmente mediante enlaces fosfato para formar ácidos nucleicos o polinucleótidos, aunque se conocen en la técnica muchas otras uniones (por ejemplo, fosforotioatos, boranofosfatos, y similares).

El término "polinucleótido" se refiere a un polímero de ribonucleótidos (ARN) o desoxirribonucleótidos (ADN), que

puede ser monocatenario o bicatenario y que puede contener nucleótidos no naturales o alterados. Los términos “polinucleótido”, “secuencia de ácido nucleico” y “secuencia de nucleótidos” se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, o bien ARN o bien ADN. Estos términos se refieren a la estructura primaria de la molécula, y por tanto incluyen ADN bi y monocatenario y ARN bi y monocatenario. Los términos incluyen, como equivalentes, análogos de o bien ARN o bien ADN producidos a partir de análogos de nucleótidos y polinucleótidos modificados tales como, aunque no limitados a polinucleótidos metilados y/o de extremos ocupados. El polinucleótido puede estar en cualquier forma, incluyendo pero sin limitarse a, plásmido, viral, cromosómico, EST, ADNc, ARNm y ARNr.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “polipéptido” y “proteína” se usan de manera intercambiable para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. El término “polipéptido recombinante” se refiere a un polipéptido que se produce mediante técnicas recombinantes, en las que generalmente se inserta ADN o ARN que codifica para la proteína expresada en un vector de expresión adecuado que se usa a su vez para transformar una célula huésped para producir el polipéptido.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “homólogo” y “homólogo/a” se refieren a un polinucleótido o un polipéptido que comprende una secuencia que es idéntica en al menos aproximadamente el 50% a la secuencia de polinucleótido o polipéptido correspondiente. Los polinucleótidos o polipéptidos homólogos pueden tener secuencias de polinucleótido o secuencias de aminoácidos que tienen una homología de al menos aproximadamente el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o al menos aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos o secuencia de polinucleótido correspondiente. Tal como se usa en el presente documento los términos “homología” de secuencia e “identidad” de secuencia se usan de manera intercambiable.

Un experto habitual en la técnica conoce métodos para determinar la homología entre dos o más secuencias. En resumen, pueden realizarse cálculos de “homología” entre dos secuencias de la siguiente manera. Las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico para la alineación óptima y pueden excluirse las secuencias no homólogas para fines de comparación). La longitud de una primera secuencia que se alinea para fines de comparación es de al menos aproximadamente el 30%, preferiblemente al menos aproximadamente el 40%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 50%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 60%, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 70%, 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 aproximadamente el 100% de la longitud de una segunda secuencia. Se comparan entonces los residuos de aminoácido o nucleótidos en posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótido correspondientes de las secuencias primera y segunda. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El tanto por ciento de homología entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación del tanto por ciento de homología entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático, tal como BLAST (Altschul *et al.* J. Mol. Biol. 215(3):403-410 (1990)). El tanto por ciento de homología entre dos secuencias de aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software de GCG, usando o bien una matriz Blossum 62 o bien una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 (Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)). El tanto por ciento de homología entre dos secuencias de nucleótidos también puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software de GCG, usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. Un experto habitual en la técnica puede realizar cálculos de homología inicial y ajustar los parámetros del algoritmo en consecuencia. Un conjunto preferido de parámetros (y el que debe usarse si un profesional no está seguro de qué parámetros deben aplicarse para determinar si una molécula está dentro de una limitación de homología de las reivindicaciones) son una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, penalización por extensión de hueco de 4 y penalización por hueco con desplazamiento del marco de lectura de 5. Se conocen métodos adicionales de alineación de secuencias en las técnicas biotecnológicas (véanse, por ejemplo, Rosenberg BMC Bioinformatics 6:278 (2005); Altschul *et al.* FEBS J. 272(20):5101-5109 (2005)).

El término “se hibrida en condiciones de rigurosidad baja, rigurosidad media, rigurosidad alta o condiciones de rigurosidad muy alta” describe condiciones para la hibridación y el lavado. Puede encontrarse orientación para realizar reacciones de hibridación en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1 - 6.3.6. Se describen métodos acuosos y no acuosos en esa referencia y puede usarse cualquier método. Condiciones de hibridación específicas a las que se hace referencia en el presente documento son de la siguiente manera: 1) condiciones de hibridación de rigurosidad baja -- 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por dos lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% al menos a 50°C (la temperatura de los lavados puede aumentarse hasta 55°C para condiciones de rigurosidad baja); 2) condiciones de hibridación de rigurosidad media -- 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% a 60°C; 3) condiciones de hibridación de rigurosidad alta -- 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% a 65°C; y 4) condiciones de hibridación de rigurosidad muy alta -- fosfato de

sodio 0,5 M, SDS al 7% a 65°C, seguido por uno o más lavados a 0,2X SSC, SDS al 1% a 65°C. Las condiciones de rigurosidad muy alta (4) son las condiciones preferidas a menos que se especifique de otro modo.

Un polipéptido “endógeno” se refiere a un polipéptido codificado por el genoma de la célula microbiana parental (también denominada “célula huésped”) a partir de la que se modifica por ingeniería genética la célulasrecombinante (o “se deriva”). Un polipéptido “exógeno” se refiere a un polipéptido que no está codificado por el genoma de la célula microbiana parental. Un polipéptido variante (es decir, mutante) es un ejemplo de un polipéptido exógeno.

El término “heterólogo” tal como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de nucleótido, polipéptido o proteína, no presente de manera natural en un organismo dado. Por ejemplo, una secuencia de polinucleótido endógena para una planta puede introducirse en una célula huésped mediante métodos recombinantes, y el polinucleótido de la planta es entonces heterólogo con respecto a la célula huésped recombinante. El término “heterólogo” también puede usarse con referencia a una secuencia de nucleótidos, polipéptido o proteína que está presente en una célula huésped recombinante en un estado no nativo. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos, polipéptido o proteína “heterologa” puede modificarse en relación con la secuencia silvestre presente de manera natural en la célula huésped silvestre correspondiente, por ejemplo, una modificación en el nivel de expresión o en la secuencia de un nucleótido, polipéptido o proteína.

Tal como se usa en el presente documento, el término “fragmento” de un polipéptido se refiere a una parte más corta de un polipéptido o una proteína de longitud completa cuyo tamaño oscila entre cuatro residuos de aminoácido y toda la secuencia de aminoácidos menos un residuo de aminoácido. En determinadas realizaciones de la divulgación, un fragmento se refiere a toda la secuencia de aminoácidos de un dominio de un polipéptido o una proteína (por ejemplo, un dominio de unión a sustrato o un dominio catalítico).

El término “mutagénesis” se refiere a un procedimiento mediante el cual se cambia la información genética de un organismo de manera estable. La mutagénesis de una secuencia de ácido nucleico que codifica para proteína produce una proteína mutante. Mutagénesis también se refiere a cambios en secuencias de ácido nucleico no codificantes que dan como resultado actividad de proteína modificada.

Una “mutación”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un cambio permanente en una posición de ácido nucleico de un gen o en una posición de aminoácido de un polipéptido o proteína. Las mutaciones incluyen sustituciones, adiciones, inserciones y deleciones. Por ejemplo, una mutación en una posición de aminoácido puede ser una sustitución de un tipo de aminoácido por otro tipo de aminoácido (por ejemplo, puede sustituirse una serina (S) por una alanina (A); puede sustituirse una lisina (L) por una treonina (T); etc.). Como tal, un polipéptido o una proteína puede tener una o más mutaciones en las que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido. Por ejemplo, una proteína o polipéptido de éster sintasa puede tener una o más mutaciones en su secuencia de aminoácidos.

Una “variante de éster sintasa” es un polipéptido o proteína de éster sintasa que tiene una o más mutaciones en su secuencia de aminoácidos. En un ejemplo, la secuencia de aminoácidos oscila entre 0 (es decir, la metionina (M) inicial basándose en el sitio de iniciación de ATG) y 473. Una variante de éster sintasa de este tipo puede tener una o más mutaciones en la posición de aminoácido 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472 y/o 473. Notablemente, las posiciones de aminoácido 139 y 140 son parte de un motivo conservado, y por tanto, son importantes para la actividad de la enzima. En una realización, las mutaciones incluyen G4R, T5P, T5S, D7N, S15G, T24M, T24N, T24W, Q26T, L30H, G33D, G33N, G33S, L39A, L39M, L39S, R40S, D41A, D41G, D41H, D41Y, V43K, V43S, T44A, T44F, T44K, E48A, E48Q, A49D, A49T, Y58C, Y58L, I70L, 170 V, A73G, A73Q, A73S, A73T, V76L, D77A, K78F, K78W, D79H, D79K, I80V, R98D, E99Q, G101L, I102R, P11 1D, P111G, P111S, H122S, V123I, V123M, R131M, I146K, I146L, I146R, S147A, V149L, R150P, V155G, T157S, T158E, T158K, R162E, R162K, C163I, C163R, N164D, N164R, P166L,

P166S, T170R, T170S, V171E, V171F, V171H, V171R, V171W, R172S, R172W, P173W, H174E, Q175R, Q175S, R176T, R177V, A179K, A179S, A179V, D182G, K183S, E184F, E184G, E184L, E184R, E184S, A185L, A185M, S186T, V187G, V187R, P188R, A189G, A190P, A190R, A190W, V191I, V191L, S 192A, S192L, S192V, Q193R, Q193S, M195G, D196E, A197T, A197V, Q201A, Q201V, Q201W, A202L, D203R, P206F, R207A, G212A, G212L, G212M, G212S, V216I, V219L, V234C, V236A, V236K, L237I, H239G, T242K, T242R, A243G, A243R, Q244G, R246A, R246G, R246L, R246Q, R246V, R246W, D255E, L257I, L257M, K258R, N259A, N259E, N259Q, L260M, L260V, H262Q, H262R, A263V, S264D, S264V, S264W, G265N, G266A, G266S, S267G, A285L, A285R, A285V, N288D, N289E, N289G, T293A, T293I, P294G, V301A, N302G, I303G, I303R, I303 W, R304W, A306G, A306S, D307F, D307G, D307L, D307N, D307R, D307V, E309A, E309G, E309S, G310H, G310R, G310V, T311S, T313S, Q314G, I315F, S316G, F317W, I319G, A320C, A323G, D328F, N331I, N331K, N331T, Q334K, Q334S, Q335C, Q335N, Q335S, T338A, T338E, T338H, Q348A, Q348R, K349A, K349C, K349H, K349Q, P351G, K352I, K352N, S353K, S353T, T356G, T356W, Q357V, M360R, M360Q, M360S, M360W, Y366G, Y366W, G375A, G375V, G375S, V381F, E393G, E393R, E393W, G394E, G394R, T395E, R402K, V409L, L411A, A413T, I420V, S424G, S424Q, S442E, S442G, M443G, A447C, A447I, A447L, L454V, D455E, L457Y, E458W, I461G, I461L, I461V, K466N, A468G, K472T y K472.

Los términos “variante de tioesterasa con actividad éster sintasa” o “variante de tioesterasa” se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un polipéptido o proteína de tioesterasa que tiene actividad éster sintasa y tiene una o más mutaciones en su secuencia de aminoácidos. En un ejemplo, la secuencia de aminoácidos oscila entre 0 (es decir, la metionina (M) inicial basándose en el sitio de iniciación de ATG) y 182.

Tal como se usa en el presente documento, el término “gen” se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican para o bien un producto de ARN o bien un producto de proteína, así como secuencias de ácido nucleico operativamente unidas que afectan a la expresión del ARN o la proteína (por ejemplo, tales secuencias incluyen pero no se limitan a secuencias de promotor o potenciador) o secuencias de ácido nucleico operativamente unidas que codifican para secuencias que afectan a la expresión del ARN o la proteína (por ejemplo, tales secuencias incluyen pero no se limitan a sitios de unión al ribosoma o secuencias de control de la traducción).

Se conocen en la técnica secuencias de control de la expresión e incluyen, por ejemplo, promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores de la transcripción, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), y similares, que proporcionan la expresión de la secuencia de polinucleótido en una célula huésped. Las secuencias de control de la expresión interaccionan específicamente con proteínas celulares implicadas en la transcripción (Maniatis *et al.* (1987) Science 236:1237-1245 (1987)). Se describen secuencias de control de la expresión a modo de ejemplo, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). En los métodos de la divulgación, una secuencia de control de la expresión está operativamente unida a una secuencia de polinucleótido. Por “operativamente unida” quiere decirse que una secuencia de polinucleótido y una(s) secuencia(s) de control de la expresión se conectan de tal manera que se permita la expresión génica cuando se unen las moléculas apropiadas (por ejemplo, proteínas activadoras de la transcripción) a la(s) secuencia(s) de control de la expresión. Están ubicados promotores operativamente unidos en el sentido de 5' de la secuencia de polinucleótido seleccionada en cuanto a la dirección de transcripción y traducción. Pueden estar ubicados potenciadores operativamente unidos en el sentido de 5', dentro de o en el sentido de 3' del polinucleótido seleccionado.

Tal como se usa en el presente documento, el término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico, es decir, una secuencia de polinucleótido, a la que se ha unido. Un tipo de vector útil es un episoma (es decir, un ácido nucleico que puede dar replicación extracromosómica). Los vectores útiles son aquéllos que pueden dar replicación y/o expresión autónoma de ácidos nucleicos a los que se unen. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes a los que se unen operativamente se denominan en el presente documento “vectores de expresión”. En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de “plásmidos”, que se refieren en general a bucles de ADN bicatenario circular que, en su forma de vector, no se unen al cromosoma. Los términos “plásmido” y “vector” se usan de manera intercambiable en el presente documento, en la medida en que un plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. Sin embargo, también se incluyen otras de tales formas de vectores de expresión que sirven para funciones equivalentes y que se han conocido en la técnica posteriormente al presente documento. En algunas realizaciones, un vector recombinante incluye además un promotor operativamente unido a la secuencia de polinucleótido. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor regulado por el desarrollo, uno específico de orgánulo, uno específico de tejido, uno inducible, uno constitutivo o uno específico de célula. El vector recombinante comprende normalmente al menos una secuencia seleccionada de una secuencia de control de la expresión acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótido; un marcador de selección acoplado operativamente a la secuencia de polinucleótido; una secuencia de polinucleótido; un marcador acoplado operativamente a la secuencia de polinucleótido; un resto de purificación acoplado operativamente a la secuencia de polinucleótido; una secuencia de secreción acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótido; y una secuencia de direccionamiento acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótido. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos se incorpora de manera estable en el ADN genómico de la célula huésped, y la expresión de la secuencia de nucleótidos está bajo el control de una región promotora regulada. Los vectores de expresión descritos en el presente documento incluyen una secuencia de polinucleótido descrita en el presente documento en una forma adecuada para la expresión de la secuencia de polinucleótido en una célula huésped. Los expertos en la técnica

apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que va transformarse, el nivel de expresión de polipéptido deseado, etc. Los vectores de expresión descritos en el presente documento pueden introducirse en células huésped para producir polipéptidos, incluyendo polipéptidos de fusión, codificados por las secuencias de polinucleótido tal como se describe en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, una “célula huésped” modificada por ingeniería genética o recombinante es una célula huésped, por ejemplo, un microorganismo usado para producir uno o más de derivados de ácidos grasos incluyen, por ejemplo, acil-CoA, ácidos grasos, aldehídos grasos, alcoholes de cadena corta y larga, hidrocarburos, alcoholes grasos, ésteres grasos (por ejemplo, ceras, ésteres de ácidos grasos, ésteres grasos y/o ésteres grasos grasos), olefinas terminales, olefinas internas y cetonas. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante comprende uno o más polinucleótidos, codificando cada polinucleótido para un polipéptido que tiene actividad enzimática de biosíntesis de ácidos grasos, en la que la célula huésped recombinante produce una composición de ésteres grasos cuando se cultiva en presencia de una fuente de carbono en condiciones eficaces para expresar los polinucleótidos.

Tal como se usa en el presente documento, “acil-ACP” se refiere a un acil-tioéster formado entre el carbono de carbonilo de una cadena de alquilo y el grupo sulfhidrilo del resto fosfopanteteinilo de una proteína transportadora de acilo (ACP). El resto fosfopanteteinilo se une de manera postraducciona a un residuo de serina conservado en la ACP mediante la acción de la proteína transportadora de holo-acilo sintasa (ACPS), una fosfopanteteinilo transferasa. En algunas realizaciones, una acil-ACP es un producto intermedio en la síntesis de acil-ACP totalmente saturadas. En otras realizaciones, una acil-ACP es un producto intermedio en la síntesis de acil-ACP insaturadas. En algunas realizaciones, la cadena de carbonos tendrá aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ó 26 carbonos. Cada una de estas acil-ACP son sustratos para enzimas que las convierten en derivados de ácido graso.

Tal como se usa en el presente documento, el término “derivado de ácido graso” significa un “ácido graso” o un “derivado de ácido graso”, que puede denominarse “ácido graso o derivado del mismo”. El término “ácido graso” significa un ácido carboxílico que tiene la fórmula  $\text{RCOOH}$ . R representa un grupo alifático, preferiblemente un grupo alquilo. R puede comprender entre aproximadamente 4 y aproximadamente 22 átomos de carbono. Los ácidos grasos pueden tener una cadena ramificada o cadena lineal y pueden estar saturados, monoinsaturados o poliinsaturados. Un “derivado de ácido graso” es un producto producido en parte a partir de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos del organismo huésped de producción. “Derivados de ácidos grasos” incluye productos preparados en parte a partir de acil-ACP o derivados de acil-ACP. Los derivados de ácidos grasos incluyen acil-CoA, ácidos grasos, aldehídos grasos, alcoholes de cadena corta y larga, alcoholes grasos, hidrocarburos, ésteres (por ejemplo, ceras, ésteres de ácidos grasos, ésteres grasos), olefinas terminales, olefinas internas y cetonas.

Una “composición de derivados de ácidos grasos” tal como se denomina en el presente documento se produce por una célula huésped recombinante y normalmente incluye una mezcla de derivados de ácidos grasos. En algunos casos, la mezcla incluye más de un tipo de producto de derivado de ácido graso (por ejemplo, ácidos grasos, ésteres grasos, alcoholes grasos, aldehídos grasos, cetonas grasas, hidrocarburos, etc.). En otros casos, una composición de derivados de ácidos grasos puede incluir, por ejemplo, una mezcla de ésteres grasos (u otro derivado de ácido graso) con diferentes longitudes de cadena, características de saturación y/o ramificación. En todavía otros casos, la composición de derivados de ácidos grasos puede comprender tanto una mezcla de más de un tipo de producto de derivado de ácido graso como derivados de ácidos grasos con diferentes longitudes de cadena, características de saturación y/o ramificación. En todavía otros casos, una composición de derivados de ácidos grasos puede incluir, por ejemplo, una mezcla de ésteres grasos y beta-hidroxiésteres.

Tal como se usa en el presente documento, el término “ruta de biosíntesis de ácidos grasos” significa una ruta de biosíntesis que produce derivados de ácidos grasos. La ruta de biosíntesis de ácidos grasos puede incluir enzimas adicionales para producir derivados de ácidos grasos que tienen características deseadas.

Tal como se usa en el presente documento, “éster graso” significa un éster que tiene la fórmula  $\text{RCOOR}'$ . Un éster graso tal como se denomina en el presente documento puede ser cualquier éster producido a partir de un ácido graso, por ejemplo un éster de ácido graso. En algunas realizaciones, el grupo R tiene al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18 o al menos 19 carbonos de longitud. Alternativamente, o además, el grupo R tiene 20 o menos, 19 o menos, 18 o menos, 17 o menos, 16 o menos, 15 o menos, 14 o menos, 13 o menos, 12 o menos, 11 o menos, 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos o 6 o menos carbonos de longitud. Por tanto, el grupo R puede tener un grupo R delimitado por dos cualesquiera de los extremos anteriores. Por ejemplo, el grupo R puede tener 6-16 carbonos de longitud, 10-14 carbonos de longitud o 12-18 carbonos de longitud. En algunas realizaciones, la composición de ésteres grasos comprende uno o más de un éster graso C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25 y C26. En otras realizaciones, la composición de ésteres grasos incluye uno o más de un éster graso C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17 y C18. En todavía otras realizaciones, la composición de ésteres grasos incluye ésteres grasos C12, C14, C16 y C18; ésteres grasos C12, C14 y C16; ésteres grasos C14, C16 y C18; o ésteres grasos C12 y C14.

El grupo R de un derivado de ácido graso, por ejemplo un éster graso, puede ser una cadena lineal o una cadena ramificada. Las cadenas ramificadas pueden tener más de un punto de ramificación y pueden incluir ramificaciones cíclicas. En algunas realizaciones, el ácido graso ramificado, aldehído graso ramificado o éster graso ramificado es un ácido graso ramificado, aldehído graso ramificado o éster graso ramificado C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25 o C26. En determinadas realizaciones, el ácido graso ramificado, aldehído graso ramificado o éster graso ramificado es un ácido graso ramificado o éster graso ramificado C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17 o C18. Un éster graso de la presente divulgación puede decirse que contiene un lado A y un lado B. Tal como se usa en el presente documento, un “lado A” de un éster se refiere a la cadena de carbonos unida al oxígeno de carboxilato del éster. Tal como se usa en el presente documento, un “lado B” de un éster se refiere a la cadena de carbonos que comprende el carboxilato original del éster. Cuando el éster graso se deriva de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos, al lado A contribuye normalmente 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, tal como las descritas en el presente documento. Alternativamente, el alcohol puede producirse a través de rutas que no son de biosíntesis 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 organismo. Alternativamente, un ácido carboxílico, tal como un ácido graso o ácido acético, puede suministrarse de manera exógena en casos en los que el éster graso se produce por un organismo que también puede producir alcohol.

Las cadenas de carbonos que comprenden el lado A o lado B del éster 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. Cuando el éster graso es un éster metílico de ácidos grasos, el lado A del éster tiene 1 carbono de longitud. Cuando el éster graso es un éster etílico de ácidos grasos, el lado A del éster tiene 2 carbonos de longitud. El lado B del éster puede tener 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 lado B puede estar saturado o insaturado. Si está insaturado, el lado A y/o lado B puede tener uno o más puntos de insaturación. Además, no es necesario que el grupo alcohol de un éster graso producido según la presente divulgación esté en la posición primaria (C1). 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 acilfosfato. Acil-CoA puede ser un producto directo de la biosíntesis o degradación de ácidos grasos. Además, puede sintetizarse acil-CoA 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.

En determinadas realizaciones, el derivado de ácido graso ramificado es un derivado de iso-ácido graso, por ejemplo un iso-éster graso, o un derivado de anteiso-ácido graso, por ejemplo, un anteiso-éster graso. En realizaciones a modo de ejemplo, el derivado de ácido graso ramificado se selecciona de éster graso ramificado iso-C7:0, iso-C8:0, iso-C9:0, iso-C10:0, iso-C11:0, iso-C12:0, iso-C13:0, iso-C14:0, iso-C15:0, iso-C16:0, iso-C17:0, iso-C18:0, iso-C19:0, anteiso-C7:0, anteiso-C8:0, anteiso-C9:0, anteiso-C10:0, anteiso-C11:0, anteiso-C12:0, anteiso-C13:0, anteiso-C14:0, anteiso-C15:0, anteiso-C16:0, anteiso-C17:0, anteiso-C18:0 y anteiso-C19:0.

El grupo R de un derivado de ácido graso ramificado o no ramificado puede estar saturado o insaturado. Si está insaturado, el grupo R puede tener uno o más de un punto de insaturación. En algunas realizaciones, el derivado de ácido graso insaturado es un derivado de ácido graso monoinsaturado. En determinadas realizaciones, el derivado de ácido graso insaturado es un derivado de ácido graso insaturado C6:1, C7:1, C8:1, C9:1, C10:1, C11:1, C12:1, C13:1, C14:1, C15:1, C16:1, C17:1, C18:1, C19:1, C20:1, C21:1, C22:1, C23:1, C24:1, C25:1 o C26:1. En determinadas realizaciones, el derivado de ácido graso insaturado es un derivado de ácido graso insaturado C10:1, C12:1, C14:1, C16:1 o C18:1. En otras realizaciones, el derivado de ácido graso insaturado está insaturado en la posición omega-7. En determinadas realizaciones, el derivado de ácido graso insaturado comprende un doble enlace en cis.

Tal como se usa en el presente documento, el término “clon” se refiere normalmente a una célula o un grupo de células que descienden de y esencialmente idénticas genéticamente a un único ancestro común, por ejemplo, las bacterias de una colonia bacteriana clonada surgida a partir de una única célula bacteriana.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cultivo” se refiere normalmente a un medio líquido que comprende células viables. En una realización, un cultivo comprende células que se reproducen en medios de cultivo predeterminados en condiciones controladas, por ejemplo, un cultivo de células huésped recombinantes hechas crecer en medios líquidos que comprenden una fuente de carbono y nitrógeno seleccionada. “Cultivar” o “cultivo” se refieren al crecimiento de una población de células huésped recombinantes en condiciones adecuadas en un medio líquido o sólido. En realizaciones particulares, cultivar se refiere a la bioconversión fermentativa de un sustrato en un producto final. Se conocen bien medios de cultivo y los componentes individuales de tales medios de cultivo están disponibles de fuentes comerciales, por ejemplo, medios DIFCO™ y medios BBL™. En un ejemplo no limitativo, el medio de nutrientes acuoso es un “medio rico” que comprende fuentes complejas de nitrógeno, sales y carbono, tal como el medio YP, que comprende 10 g/l de peptona y 10 g/l de extracto de levadura de un medio de

este tipo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “en condiciones eficaces para expresar dicha(s) secuencia(s) de nucleótidos heteróloga(s)” significa cualquiera condición que permita que una célula huésped produzca un derivado de ácido graso deseado. Las condiciones adecuadas incluyen, por ejemplo, condiciones de fermentación.

5 Tal como se usa en el presente documento, un “nivel modificado” o “alterado de” actividad de una proteína, por ejemplo una enzima, en una célula huésped recombinante se refiere a una diferencia en una o más características en la actividad determinadas con relación a la célula huésped parental o nativa. Normalmente se determinan diferencias en actividad entre una célula huésped recombinante, que tiene actividad modificada, y la célula huésped silvestre correspondiente (por ejemplo, comparación de un cultivo de una célula huésped recombinante con relación a la célula huésped silvestre correspondiente). Actividades modificadas pueden ser el resultado de, por ejemplo, cantidades modificadas de proteína expresada por una célula huésped recombinante (por ejemplo, como resultado de un aumento o una disminución del número de copias de secuencias de ADN que codifican para la proteína, un aumento o una disminución del número de transcritos de ARNm que codifican para la proteína, y/o un aumento o una disminución de las cantidades de traducción de proteína de la proteína a partir del ARNm); cambios en la estructura de la proteína (por ejemplo, cambios en la estructura primaria, tales como cambios en la secuencia codificante de la proteína que dan como resultado cambios en la especificidad de sustrato, cambios en parámetros cinéticos observados); y cambios en la estabilidad de la proteína (por ejemplo, un aumento o una disminución de la degradación de la proteína). En algunas realizaciones, el polipéptido es un mutante o una variante de cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento, por ejemplo, WS377 (“377”), *Prpo*. En determinados casos, las secuencias codificantes para los polipéptidos tal como se describe en el presente documento se someten a optimización de codones para la expresión en una célula huésped particular. Por ejemplo, para la expresión en *E. coli*, pueden optimizarse uno o más codones tal como se describe en, por ejemplo, Grosjean *et al.* Gene 18:199-209 (1982).

El término “secuencias reguladoras” tal como se usa en el presente documento se refiere normalmente a una secuencia de bases en ADN, operativamente unida a secuencias de ADN que codifican para una proteína que controla en última instancia la expresión de la proteína. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras de ARN, secuencias de unión a factor de transcripción, secuencias de terminación de la transcripción, moduladores de la transcripción (tales como elementos potenciadores), secuencias de nucleótidos que afectan a la estabilidad del ARN y secuencias reguladoras de la traducción (tales como sitios de unión al ribosoma (por ejemplo, secuencias de Shine-Dalgarno en procariotas o secuencias de Kozak en eucariotas), codones de iniciación, codones de terminación). Tal como se usa en el presente documento, la frase “la expresión de dicha secuencia de nucleótidos se modifica con relación a la secuencia de nucleótidos silvestre”, significa un aumento o una disminución en el nivel de expresión y/o actividad de una secuencia de nucleótidos endógena o la expresión y/o actividad de una secuencia de nucleótidos que codifica para polipéptido heterólogo o no nativo. Los términos “nivel alterado de expresión” y “nivel modificado de expresión” se usan de manera intercambiable y significan que está presente un polinucleótido, polipéptido o hidrocarburo en una concentración diferente en una célula huésped modificada por ingeniería genética en comparación con su concentración en una célula silvestre correspondiente en las mismas condiciones. Tal como se usa en el presente documento, el término “expresar” con respecto a un polinucleótido es provocar que funcione. Un polinucleótido que codifica para un polipéptido (o proteína), cuando se expresa, se transcribirá y traducirá para producir ese polipéptido (o proteína). Tal como se usa en el presente documento, el término “sobreexpresar” significa expresar o provocar que se exprese un polinucleótido o polipéptido en una célula en una concentración mayor de la que se expresa normalmente en una célula silvestre correspondiente en las mismas condiciones.

Tal como se usa en el presente documento, el término “título” se refiere a la cantidad de derivado de ácido graso producido por volumen unitario del cultivo de células huésped. En cualquier aspecto de las composiciones y los métodos descritos en el presente documento, un derivado de ácido graso se produce a un título de aproximadamente 25 mg/l, aproximadamente 50 mg/l, aproximadamente 75 mg/l, aproximadamente 100 mg/l, aproximadamente 125 mg/l, aproximadamente 150 mg/l, aproximadamente 175 mg/l, aproximadamente 200 mg/l, aproximadamente 225 mg/l, aproximadamente 250 mg/l, aproximadamente 275 mg/l, aproximadamente 300 mg/l, aproximadamente 325 mg/l, aproximadamente 350 mg/l, aproximadamente 375 mg/l, aproximadamente 400 mg/l, aproximadamente 425 mg/l, aproximadamente 450 mg/l, aproximadamente 475 mg/l, aproximadamente 500 mg/l, aproximadamente 525 mg/l, aproximadamente 550 mg/l, aproximadamente 575 mg/l, aproximadamente 600 mg/l, aproximadamente 625 mg/l, aproximadamente 650 mg/l, aproximadamente 675 mg/l, aproximadamente 700 mg/l, aproximadamente 725 mg/l, aproximadamente 750 mg/l, aproximadamente 775 mg/l, aproximadamente 800 mg/l, aproximadamente 825 mg/l, aproximadamente 850 mg/l, aproximadamente 875 mg/l, aproximadamente 900 mg/l, aproximadamente 925 mg/l, aproximadamente 950 mg/l, aproximadamente 975 mg/l, aproximadamente 1000 mg/l, aproximadamente 1050 mg/l, aproximadamente 1075 mg/l, aproximadamente 1100 mg/l, aproximadamente 1125 mg/l, aproximadamente 1150 mg/l, aproximadamente 1175 mg/l, aproximadamente 1200 mg/l, aproximadamente 1225 mg/l, aproximadamente 1250 mg/l, aproximadamente 1275 mg/l, aproximadamente 1300 mg/l, aproximadamente 1325 mg/l, aproximadamente 1350 mg/l, aproximadamente 1375 mg/l, aproximadamente 1400 mg/l, aproximadamente 1425 mg/l, aproximadamente 1450 mg/l, aproximadamente 1475 mg/l, aproximadamente 1500 mg/l, aproximadamente 1525 mg/l, aproximadamente 1550 mg/l, aproximadamente 1575 mg/l, aproximadamente 1600 mg/l, aproximadamente 1625 mg/l, aproximadamente

- 1650 mg/l, aproximadamente 1675 mg/l, aproximadamente 1700 mg/l, aproximadamente 1725 mg/l, aproximadamente 1750 mg/l, aproximadamente 1775 mg/l, aproximadamente 1800 mg/l, aproximadamente 1825 mg/l, aproximadamente 1850 mg/l, aproximadamente 1875 mg/l, aproximadamente 1900 mg/l, aproximadamente 1925 mg/l, aproximadamente 1950 mg/l, aproximadamente 1975 mg/l, aproximadamente 2000 mg/l (2 g/l), 3 g/l, 5 g/l, 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l o un intervalo delimitado por dos cualesquiera de los valores anteriores. En otras realizaciones, un derivado de ácido graso se produce a un título de más de 100 g/l, más de 200 g/l o más de 300 g/l. Un título preferido de derivado de ácido graso producido por una célula huésped recombinante según los métodos de la divulgación es de desde 5 g/l hasta 200 g/l, desde 10 g/l hasta 150 g/l, desde 20 g/l hasta 120 g/l y desde 30 g/l hasta 100 g/l. El título puede referirse a un derivado de ácido graso particular o una combinación de derivados de ácidos producidos por un cultivo de células huésped recombinantes dado. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido variante con actividad éster sintasa en una célula huésped recombinante tal como *E. coli* da como resultado la producción de un título superior en comparación con una célula huésped recombinante que expresa el polipéptido silvestre correspondiente. En una realización, el título superior oscila entre al menos aproximadamente 5 g/l y aproximadamente 200 g/l.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, el “rendimiento de un derivado de ácido graso producido por una célula huésped” se refiere a la eficacia con la cual una fuente de carbono de entrada se convierte en producto (es decir, un éster graso) en una célula huésped. Células huésped modificadas por ingeniería genética para producir derivados de ácidos grasos según los métodos de la divulgación tienen un rendimiento de al menos aproximadamente el 3%, al menos aproximadamente el 4%, al menos aproximadamente el 5%, al menos aproximadamente el 6%, al menos aproximadamente el 7%, al menos aproximadamente el 8%, al menos aproximadamente el 9%, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 11%, al menos aproximadamente el 12%, al menos aproximadamente el 13%, al menos aproximadamente el 14%, al menos aproximadamente el 15%, al menos aproximadamente el 16%, al menos aproximadamente el 17%, al menos aproximadamente el 18%, al menos aproximadamente el 19%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 21%, al menos aproximadamente el 22%, al menos aproximadamente el 23%, al menos aproximadamente el 24%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 26%, al menos aproximadamente el 27%, al menos aproximadamente el 28%, al menos aproximadamente el 29% o al menos aproximadamente el 30% o un intervalo delimitado por dos cualesquiera de los valores anteriores. En otras realizaciones, un derivado o derivados de ácidos grasos se producen a un rendimiento de más de aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90% o más. Alternativamente, o además, el rendimiento es de aproximadamente el 30% o menos, aproximadamente el 27% o menos, aproximadamente el 25% o menos, o aproximadamente el 22% o menos. Por tanto, el rendimiento puede estar delimitado por dos cualesquiera de los extremos anteriores. Por ejemplo, el rendimiento de un derivado o derivados de ácidos grasos producidos por la célula huésped recombinante según los métodos de la divulgación puede ser de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 15%, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 25%, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 22%, de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 27%, de aproximadamente el 18% a aproximadamente el 22%, de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 28% o de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 30%. El rendimiento puede referirse a un derivado de ácido graso particular o una combinación de derivados de ácidos grasos producidos por un cultivo de células huésped recombinantes dado. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido variante con actividad éster sintasa en una célula huésped recombinante tal como *E. coli* da como resultado la producción de un rendimiento superior de ésteres de ácidos grasos en comparación con una célula huésped recombinante que expresa el polipéptido silvestre correspondiente. En una realización, el rendimiento superior oscila entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 100% del rendimiento teórico.
- 45 Tal como se usa en el presente documento, el término “productividad” se refiere a la cantidad de un derivado o derivados de ácidos grasos producidos por volumen unitario de cultivo de células huésped por tiempo unitario. En cualquier aspecto de las composiciones y los métodos descritos en el presente documento, la productividad de un derivado o derivados de ácidos grasos producidos por una célula huésped recombinante es de al menos 100 mg/l/hora, al menos 200 mg/l/hora, al menos 300 mg/l/hora, al menos 400 mg/l/hora, al menos 500 mg/l/hora, al menos 600 mg/l/hora, al menos 700 mg/l/hora, al menos 800 mg/l/hora, al menos 900 mg/l/hora, al menos 1000 mg/l/hora, al menos 1100 mg/l/hora, al menos 1200 mg/l/hora, al menos 1300 mg/l/hora, al menos 1400 mg/l/hora, al menos 1500 mg/l/hora, al menos 1600 mg/l/hora, al menos 1700 mg/l/hora, al menos 1800 mg/l/hora, al menos 1900 mg/l/hora, al menos 2000 mg/l/hora, al menos 2100 mg/l/hora, al menos 2200 mg/l/hora, al menos 2300 mg/l/hora, al menos 2400 mg/l/hora, 2500 mg/l/hora, o tan alta como 10 g/l/hora (dependiendo de la masa celular). Por ejemplo, la productividad de un derivado o derivados de ácidos grasos producidos por una célula huésped recombinante según los métodos de la divulgación puede ser de desde 500 mg/l/hora hasta 2500 mg/l/hora, o desde 700 mg/l/hora hasta 2000 mg/l/hora. La productividad puede referirse a un derivado de ácido graso particular o una combinación de derivados de ácidos grasos producidos por un cultivo de células huésped recombinantes dado. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido variante con actividad éster sintasa en una célula huésped recombinante tal como *E. coli* da como resultado la producción de una productividad aumentada de ésteres de ácidos grasos en comparación con una célula huésped recombinante que expresa el polipéptido silvestre correspondiente. En una realización, la productividad superior oscila entre aproximadamente 0,3 g/l/h y aproximadamente 3 g/l/h.

Tal como se usa en el presente documento, el término “especie grasa total” y “producto de ácido graso total” pueden usarse de manera intercambiable en el presente documento con referencia a la cantidad de ésteres grasos y ácidos grasos, tal como se evalúa mediante CG-FID. Los mismos términos pueden usarse para querer decir alcoholes grasos, aldehídos grasos y ácidos grasos libres cuando se hace referencia a un análisis de alcoholes grasos.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término “velocidad de utilización de glucosa” significa la cantidad de glucosa usada por el cultivo por tiempo unitario, notificada como gramos/litro/hora (g/l/h).

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “mayor actividad éster sintasa en comparación con el polipéptido silvestre” se usa con referencia a una éster sintasa o tioesterasa con actividad éster sintasa con un título superior, rendimiento superior y/o productividad superior a la enzima silvestre correspondiente. En una realización preferida, el título, rendimiento o productividad es al menos dos veces el del polipéptido silvestre. En otras realizaciones preferidas, el título, rendimiento o productividad es al menos 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces el del polipéptido silvestre. En una realización particular, el título es al menos aproximadamente el 5% o mayor. En algunos, “mayor actividad éster sintasa en comparación con el polipéptido silvestre”, también significa que además del título, rendimiento y/o productividad superior a la enzima éster sintasa silvestre correspondiente, la éster sintasa produce a un porcentaje bajo o inferior (por ejemplo, el 1-5%) de beta-hidroxiésteres (véanse los ejemplos, más adelante). En otros casos, “mayor actividad éster sintasa en comparación con el polipéptido silvestre”, también significa que además del título, rendimiento y/o productividad superior a la enzima éster sintasa silvestre correspondiente, la éster sintasa produce un porcentaje superior de beta-hidroxiésteres (véanse los ejemplos, más adelante).

20 El término “actividad de éster metílico de ácidos grasos mejorada” significa que el polipéptido o enzima variante puede producir ésteres metílicos de ácidos grasos, ésteres etílicos de ácidos grasos, ésteres propílicos de ácidos grasos, ésteres isopropílicos de ácidos grasos, ésteres butílicos de ácidos grasos, monoglicéridos, ésteres isobutílicos de ácidos grasos, ésteres 2-butílicos de ácidos grasos, y ésteres terc-butílicos de ácidos grasos, y similares. Un polipéptido o enzima variante con actividad de éster metílico de ácidos grasos mejorada tiene propiedades mejoradas incluyendo, pero sin limitarse a, beta-hidroxiésteres aumentados, beta-hidroxiésteres disminuidos, longitudes de cadena aumentadas de ésteres de ácidos grasos y longitudes de cadenas disminuidas de ésteres de ácidos grasos. Un polipéptido de éster sintasa variante con actividad de éster metílico de ácidos grasos mejorada produce un título que es de al menos aproximadamente el 5% o mayor cuando el polipéptido variante se expresa en un microorganismo recombinante.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “fuente de carbono” 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 y gases (por ejemplo, CO y CO<sub>2</sub>). Las fuentes de carbono a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, monosacáridos, tales como glucosa, fructosa, manosa, galactosa, xilosa y arabinosa; oligosacáridos, tales como fructo-oligosacárido y galacto-oligosacárido; polisacáridos tales como almidón, celulosa, pectina y xilano; disacáridos, tales como sacarosa, maltosa, celobiosa y turanosa; material celulósico y variantes tales como hemicelulosas, metilcelulosa y carboximetilcelulosa sódica; ácidos grasos saturados o insaturados, succinato, lactato y acetato; alcoholes, tales como etanol, metanol y glicerol, o mezclas de los mismos. La fuente de carbono también puede ser un producto de fotosíntesis, tal como glucosa. En determinadas realizaciones preferidas, la fuente de carbono es biomasa. En otras realizaciones preferidas, la fuente de carbono es glucosa. En otras realizaciones preferidas, la fuente de carbono es sacarosa. En otras realizaciones, la fuente de carbono es glicerol.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término “biomasa” se refiere a cualquier material biológico del que se derive una fuente de carbono. En algunas realizaciones, se procesa una biomasa para dar una fuente de carbono, que es adecuada para la bioconversión. En otras realizaciones, la biomasa no requiere procesamiento adicional para dar una fuente de carbono. La fuente de carbono puede convertirse en una composición que comprende ésteres grasos. Los ésteres grasos encuentran utilidad en varios productos incluyendo, pero sin limitarse a, tensioactivos, polímeros, películas, textiles, colorantes, productos farmacéuticos, fragancias y agentes saborizantes, lacas, pinturas, barnices, agentes de ablandamiento en resinas y plásticos, plastificantes, retardantes de la llama y aditivos en gasolina y gasoil.

50 Una fuente de biomasa a modo de ejemplo es vegetación o materia vegetal, tal como maíz, caña de azúcar o césped de pradera. Otra fuente de biomasa a modo de ejemplo es productos de desecho metabólicos, tales como materia animal (por ejemplo, estiércol de vaca). Las fuentes de biomasa a modo de ejemplo adicionales incluyen algas y otras plantas marinas. La biomasa también incluye productos de desecho de la industria, la agricultura, silvicultura y domésticos, incluyendo, pero sin limitarse a, glicerol, residuo de fermentación, ensilado, paja, madera, aguas cloacales, basura, desechos urbanos celulósicos y restos de comidas (por ejemplo, jabones, aceites y ácidos grasos). El término “biomasa” también puede referirse a fuentes de carbono, tales como hidratos de carbono (por ejemplo, monosacáridos, disacáridos o polisacáridos).

60 Tal como se usa en el presente documento, el término “aislados”, con respecto a productos (tales como ácidos grasos y derivados de los mismos) se refiere a productos que están separados de componentes celulares, medios

de cultivo celular, o precursores químicos o sintéticos. Los ácidos grasos y derivados de los mismos producidos mediante los métodos descritos en el presente documento pueden ser relativamente inmiscibles en el caldo de fermentación, así como en el citoplasma. Por tanto, los ácidos grasos y derivados de los mismos pueden recogerse en una fase orgánica o bien de manera intracelular o bien de manera extracelular.

5 Tal como se usa en el presente documento, los términos “purificar”, “purificado” o “purificación” significan la retirada o el aislamiento de una molécula de su entorno, por ejemplo, mediante aislamiento o separación. Las moléculas “sustancialmente purificadas” están libres en al menos aproximadamente el 60% (por ejemplo, libres en al menos aproximadamente el 70%, libres en al menos aproximadamente el 75%, libres en al menos aproximadamente el 85%, libres en al menos aproximadamente el 90%, libres en al menos aproximadamente el 95%, libres en al menos aproximadamente el 97%, libres en al menos aproximadamente el 99%) de otros componentes con los que se asocian. Tal como se usa en el presente documento, estos términos también se refieren a la retirada de contaminantes de una muestra. Por ejemplo, la eliminación de contaminantes puede dar como resultado un aumento en el porcentaje de derivados de ácidos en una muestra. Por ejemplo, cuando un derivado de ácido graso se produce en una célula huésped recombinante, el derivado de ácido graso puede purificarse mediante la eliminación de las proteínas de la célula huésped. Tras la purificación, el porcentaje de derivado de ácido graso en la muestra aumenta. Los términos “purificar”, “purificado” y “purificación” son términos relativos que no requieren pureza absoluta. Por tanto, por ejemplo, cuando un derivado de ácido graso se produce en células huésped recombinantes, un derivado de ácido graso purificado es un derivado de ácido graso que está sustancialmente separado de otros componentes celulares (por ejemplo, ácidos nucleicos, polipéptidos, lípidos, hidratos de carbono u otros hidrocarburos). Tal como se usa en el presente documento, el término “atenuar” significa debilitar, reducir o disminuir. Por ejemplo, un polipéptido puede atenuarse modificando el polipéptido para reducir su actividad (por ejemplo, modificando una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido).

#### Variantes de éster sintasa

La presente divulgación se refiere a, entre otras cosas, enzimas éster sintasa variantes, secuencias de polipéptido de tales variantes y fragmentos funcionales de los mismos con propiedades mejoradas; polinucleótidos que codifican para secuencias de polipéptido de éster sintasa variantes; microorganismos recombinantes que incluyen un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de éster sintasa mejorado; microorganismos que pueden expresar el polipéptido de éster sintasa mejorado; cultivos de tales microorganismos; procedimientos para producir ésteres de ácidos grasos; composiciones de ésteres de ácidos grasos y otras composiciones derivadas de los mismos usando los polipéptidos de éster sintasa mejorados; y las composiciones resultantes.

Particularmente, se proporcionan en el presente documento polipéptidos de éster sintasa con propiedades mejoradas y microorganismos que expresan estos polipéptidos. Se han descritos polipéptidos de éster sintasa silvestres de la cepa de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM8798 en Holtzaple *et al.* (véase JBacteriol. (2007) 189(10):3804-3812) y la patente estadounidense n.º 7.897.369. SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de la éster sintasa silvestre, es decir, ES9/DSM8798 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (*M. hydrocarbonoclasticus*; n.º de registro de GenBank ABO21021), que se usó como molde para generar las enzimas éster sintasa mejoradas con el fin de ilustrar la divulgación (véanse los ejemplos más adelante). Una variante de éster sintasa preferida tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 90% con la secuencia de aminoácidos de la enzima éster sintasa de *M. hydrocarbonoclasticus* silvestre (denominada en el presente documento “WS377” o “377”) de SEQ ID NO: 2. Además, SEQ ID NO: 1 es la secuencia de polinucleótido que codifica para SEQ ID NO: 2. Con respecto a las secuencias de polipéptido de éster sintasa descritas en el presente documento “M” (ATG) se considera que es el aminoácido “0”. El primer aminoácido tras el ATG se designa aminoácido “1”.

En un aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos de éster sintasa mejorados con actividad éster sintasa potenciada y secuencias de nucleótidos que los codifican. En otro aspecto, puede observarse que las sustituciones introducidas en numerosas posiciones de aminoácido diferentes (también denominados en el presente documento “residuos”) dentro del polipéptido de ‘377 silvestre de SEQ ID NO: 2 producen polipéptidos de ‘377 mejorados, que pueden catalizar una producción aumentada de ésteres grasos en relación con ‘377 silvestre. Dependiendo de la posición mutada, cambios de un único aminoácido en posiciones especificadas dan lugar a aumentos o disminuciones en la producción de ésteres grasos. Cambios de un único aminoácido en posiciones especificadas también pueden dar lugar a aumentos o disminuciones en la producción en beta hidroxí ( $\beta$ -OH)-éster. En una realización, un cambio de un único aminoácido da lugar a un aumento en la producción de ésteres grasos y una disminución en la producción de  $\beta$ -OH-éster. En otra realización, un cambio de un único aminoácido da como resultado un aumento en la producción de ésteres grasos y ningún cambio en la producción de  $\beta$ -OH-éster. En todavía otra realización, un cambio de un único aminoácido da como resultado un aumento en la producción de ésteres grasos y un aumento en la producción de  $\beta$ -OH-éster. Un cambio de un único aminoácido puede dar como resultado también una disminución en la producción de ésteres grasos y un aumento, una disminución o ningún cambio en la producción de  $\beta$ -OH-éster. En otras realizaciones, cambios de aminoácidos individuales o múltiples dan como resultado un aumento en la producción de ésteres grasos. En todavía otras realizaciones, cambios de aminoácidos individuales o múltiples dan como resultado un aumento o una disminución en la producción de  $\beta$ -OH.

Por tanto, combinaciones de dos o más cambios de aminoácidos en posiciones especificadas pueden dar lugar a aumentos o disminuciones en la producción de ésteres grasos y/o ácidos grasos libres. El efecto de cada cambio de

aminoácido individual sobre la producción de ésteres grasos y ácidos grasos libres puede ser o no aditiva al efecto de otros cambios de aminoácidos individuales sobre la producción de ésteres grasos y ácidos grasos libres. En algunas realizaciones preferidas, una combinación de dos o más cambios de aminoácido en posiciones especificadas da como resultado un aumento en la producción de ésteres grasos y una disminución en la producción de ácidos grasos libres. Por consiguiente, múltiples cambios de aminoácidos en posiciones especificadas dan lugar a aumentos o disminuciones en la producción de ésteres grasos. Como tales, múltiples cambios de aminoácidos en posiciones especificadas pueden dar lugar también a disminuciones en la producción de  $\beta$ -OH-éster. En algunas realizaciones, múltiples cambios de aminoácidos dan como resultado un aumento en la producción de ésteres grasos y una disminución en la producción de  $\beta$ -OH-éster. En otras realizaciones, múltiples cambios de aminoácidos dan como resultado un aumento en la producción de ésteres grasos y ningún cambio en la producción de  $\beta$ -OH-éster. En todavía otras realizaciones, múltiples cambios de aminoácidos dan como resultado un aumento en la producción de ésteres grasos y un aumento en la producción de  $\beta$ -OH-éster. Múltiples cambios de aminoácidos pueden dar como resultado también una disminución en la producción de ésteres grasos y un aumento, una disminución o ningún cambio en la producción de  $\beta$ -OH-éster.

Se preparó una biblioteca de saturación completa usando éster sintasa de WS377 como molde, tal como se describe en el ejemplo 1 (más adelante). Se identificaron más de 200 mutaciones beneficiosas basándose en el título aumentado de éster graso y/o una disminución en el porcentaje de beta-hidroxiéster producido. Se preparó una biblioteca de combinación basándose en los "aciertos" a partir de la biblioteca de saturación, tal como se detalla en los ejemplos 2 y 5. En un aspecto, la divulgación se refiere a polipéptidos de éster sintasa mejorados con una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 70% con SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, un polipéptido de éster sintasa mejorada muestra una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 75% (por ejemplo, al menos el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o al menos el 99%) con la secuencia de '377 silvestre de SEQ ID NO: 2 y también incluye una o más sustituciones que dan como resultado características y/o propiedades útiles tal como se describe en el presente documento. En un aspecto de la divulgación, el polipéptido de éster sintasa mejorado tiene una identidad de secuencia de aproximadamente el 100% con SEQ ID NO: 4. En otro aspecto de la divulgación, el polipéptido de éster sintasa mejorado tiene una identidad de secuencia de aproximadamente el 100% con una cualquiera de las siguientes SEQ ID NO, incluyendo, pero sin limitarse a, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 43.

En un aspecto relacionado, un polipéptido de éster sintasa mejorado está codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia del 100% con SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 7. En otro aspecto relacionado, un polipéptido de éster sintasa mejorado está codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de aproximadamente el 100% con una cualquiera de las siguientes SEQ ID NO incluyendo, pero sin limitarse a, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 42.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a polipéptidos de éster sintasa mejorados con una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 70% con SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, un polipéptido de éster sintasa mejorado tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 75% (por ejemplo, al menos el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o al menos el 99%) con la secuencia de éster sintasa de SEQ ID NO: 4 y también incluye una o más sustituciones que dan como resultado características y/o propiedades mejoradas tal como se describe en el presente documento. En otro aspecto, la divulgación se refiere a polipéptidos de éster sintasa mejorados con una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 70% con una cualquiera de las siguientes SEQ ID NO incluyendo, pero sin limitarse a, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 43. En algunas realizaciones, un polipéptido de éster sintasa mejorado tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 75% (por ejemplo, al menos el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o al menos el 99%) con la secuencia de éster sintasa de una cualquiera de las siguientes SEQ ID NO incluyendo, pero sin limitarse a, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 43, y también incluye una o más sustituciones que dan como resultado características y/o propiedades mejoradas tal como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a polipéptidos de éster sintasa mejorados que comprenden una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 75% (por ejemplo, al menos el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o y al menos el 99%) con la secuencia de éster sintasa de SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones la

secuencia de ácido nucleico puede codificar para una variante de éster sintasa con una o más sustituciones que dan como resultado características y/o propiedades mejoradas tal como se describe en el presente documento. La secuencia de ácido nucleico de éster sintasa mejorada o variante también puede derivarse de una especie distinta de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. En otro aspecto, la divulgación se refiere a polipéptidos de éster sintasa mejorados que comprenden una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 75% (por ejemplo, al menos el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o y al menos el 99%) con la secuencia de éster sintasa de una cualquiera de las siguientes SEQ ID NO incluyendo, pero sin limitarse a, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 42. La secuencia de ácido nucleico puede codificar para una variante de éster sintasa con una o más sustituciones que dan como resultado características y/o propiedades mejoradas tal como se describe en el presente documento. La secuencia de ácido nucleico de éster sintasa mejorada o variante también puede derivarse de una especie distinta de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a polipéptidos de éster sintasa que comprenden una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas a lo largo de sustancialmente toda la longitud de un ácido nucleico correspondiente a una cualquiera de las siguientes SEQ ID NO incluyendo, pero sin limitarse a, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 42. La secuencia de ácido nucleico puede codificar para una secuencia de ácido nucleico de éster sintasa mejorada o variante derivada de una especie distinta de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona una éster sintasa codificada por una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 70% (por ejemplo, al menos el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o al menos el 99%) con SEQ ID NO: 1 y comprende una o más de las sustituciones dadas a conocer en el presente documento.

#### Propiedades mejoradas de variantes de éster sintasa

La éster sintasa silvestre de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798 ("377") se modificó por ingeniería genética para producir un alto porcentaje de éster graso sin la necesidad de sobreexpresar ningún otro gen usando expresión en *E. coli* como modelo ilustrativo. Además, cuando se expresan en una célula huésped recombinante tal como *E. coli*, las variantes de la enzima éster sintasa silvestre que da como resultado un título, rendimiento o productividad superior también producen más de aproximadamente el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45%, el 50% o más de  $\beta$ -OH-ésteres. En un aspecto, la presente divulgación proporciona una variante mejorada de una éster sintasa que tiene un título, rendimiento o productividad superior a la éster sintasa silvestre, y también produce un menor porcentaje de  $\beta$ -OH-ésteres que la enzima silvestre. En una realización preferida, las enzimas éster sintasa variantes de la divulgación producen menos de aproximadamente el 20%, el 18%, el 16%, el 14%, el 12%, el 10%, el 9%, el 8%, el 7%, el 6%, el 5%, el 4%, el 3%, el 2% o menos del 1% de  $\beta$ -OH-ésteres. Como tales, las variantes de éster sintasa de la divulgación presentan características y/o propiedades mejoradas tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, un aumento en el título, el rendimiento y/o la productividad de ésteres de ácidos grasos; y/o una disminución en el título, el rendimiento o la productividad de beta-hidroxiésteres. Por tanto, la modificación por ingeniería genética de una éster sintasa para que tenga un título, rendimiento y/o productividad superior impide esencialmente que *E. coli* use recursos en un ciclo fútil (véase la figura 2), al tiempo que permite un alto nivel de producción de ésteres de ácidos grasos, por ejemplo, para su uso como biodiesel o en la fabricación de tensioactivos.

#### Variantes de *Photobacterium profundum*

La presente divulgación se refiere a, entre otras cosas, enzimas tioesterasa variantes con actividad éster sintasa aumentada; secuencias de polipéptido de tales variantes y fragmentos funcionales de las mismas con propiedades mejoradas; polinucleótidos que codifican para secuencias de polipéptido de tioesterasa variantes con actividad éster sintasa aumentada; microorganismos recombinantes que comprenden un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de tioesterasa mejorado con actividad éster sintasa aumentada; microorganismos que pueden expresar las secuencias de polipéptido de tioesterasa mejorado con actividad éster sintasa aumentada; cultivos de tales microorganismos; procedimientos para producir ésteres de ácidos grasos; composiciones de ésteres de ácidos grasos y otras composiciones derivadas de los mismos usando las secuencias de polipéptido de tioesterasa mejorado con actividad éster sintasa aumentada; y las composiciones resultantes.

Particularmente, se proporcionan en el presente documento polipéptidos de tioesterasa con propiedades mejoradas tales como una actividad éster sintasa aumentada y microorganismos que expresan estos polipéptidos. Se han descrito polipéptidos de *Photobacterium profundum* (Ppro) silvestres en Vezzi *et al.* (véase Science (2005) 307: 1459-1461). SEQ ID NO: 51 es la secuencia de aminoácidos silvestre para tioesterasa de *Photobacterium profundum*. SEQ ID NO: 50 es la secuencia de polinucleótido que codifica para SEQ ID NO: 51. La secuencia líder

que dirige la tioesterasa al interior del periplasma se retiró de SEQ ID NO: 50. Polipéptidos de tioesterasa mejorados, por ejemplo, polipéptidos de *Ppro* variantes, tienen actividad éster sintasa potenciada. Con respecto a las secuencias de polipéptido de *Ppro* descritas en el presente documento "M" (ATG) se considera que es el aminoácido "0". El primer aminoácido tras el ATG se designa aminoácido "1".

- 5 En un aspecto, la divulgación se refiere a polipéptidos de *Ppro* mejorados actividad éster sintasa potenciada y secuencias de nucleótidos que los codifican. Polipéptidos de *Ppro* mejorados son ejemplos de polipéptidos de tioesterasa variantes con actividad éster sintasa aumentada o potenciada. Puede observarse que las sustituciones introducidas en numerosas posiciones de aminoácido diferentes (también denominadas en el presente documento posiciones de "residuo") dentro del *Ppro* silvestre de SEQ ID NO: 51 producen polipéptidos de *Ppro* mejorados que
- 10 pueden catalizar una producción aumentada de ésteres grasos en relación con *Ppro* silvestre. Dependiendo de la posición mutada, cambios de un único aminoácido en posiciones especificadas dan lugar a aumentos o disminuciones en la producción de ésteres grasos. Cambios de un único aminoácido en posiciones especificadas pueden dar lugar también a aumentos o disminuciones en la producción de ácidos grasos libres. Un cambio de un único aminoácido puede dar como resultado también una disminución en la producción de ésteres grasos y un
- 15 aumento, una disminución o ningún cambio en la producción de ácidos grasos libres. Combinaciones de dos o más cambios de aminoácidos en posiciones especificadas pueden dar lugar también a aumentos o disminuciones en la producción de ésteres grasos y/o ácidos grasos libres. El efecto de cada cambio de aminoácido individual sobre la producción de ésteres grasos y ácidos grasos libres puede ser o no aditivo al efecto de otros cambios de aminoácidos individuales sobre la producción de ésteres grasos y ácidos grasos libres.
- 20 En un aspecto, la divulgación se refiere a polipéptidos de *Ppro* que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 70% con SEQ ID NO: 51. En un aspecto relacionado, el polipéptido de *Ppro* tiene una identidad de secuencia del 100% con SEQ ID NO: 51. En otros aspectos relacionados los polipéptidos de *Ppro* tienen una identidad de secuencia del 100% con SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 31.
- 25 En otro aspecto, la divulgación se refiere a polipéptidos de *Ppro* que comprenden una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 75% (por ejemplo, al menos el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o y al menos el 99%) con la secuencia de *Ppro* silvestre de SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56,
- 30 SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64 o SEQ ID NO: 30.

#### Propiedades mejoradas de variantes de *Ppro*

- Con el fin de ilustrar la divulgación, se modificó por ingeniería genética la *tesA* de *P. profundum* para producir un porcentaje superior de FAME sin la necesidad de sobreexpresar ningún otro gen en *E. coli*. Una éster sintasa que actúa directamente sobre acil-ACP (producto de biosíntesis de ácidos grasos) podría dirigirse hacia una producción
- 35 de ésteres aumentada, así como permitir un aumento directo de la ruta a partir de la biosíntesis de ácidos grasos, lo que debe también mejorar la producción. Además, una de las bibliotecas se sometió a prueba para determinar la producción de FAEE, y se observó que *tesA* modificada por ingeniería genética de *P. profundum* para FAME, también producía niveles más altos de FAEE que la cepa silvestre. Estas variantes de *Ppro* presentan características y/o propiedades mejoradas tal como se describe en el presente documento, por ejemplo un aumento
  - 40 en el título, el rendimiento y/o la productividad de ésteres de ácidos grasos; y/o una disminución en el título, el rendimiento y/o la productividad de ácidos grasos libres. Como ejemplo, la *tesA* de *P. profundum* (*Ppro*) se modificó por ingeniería genética para que tuviese actividad éster sintasa. En otras palabras, la *tesA* de *Ppro* se modificó por ingeniería genética para que actuase como éster sintasa. Cuando se examinó en placas, el gen de *tesA* de *Ppro* silvestre produjo aproximadamente el 15-18% de FAME de los productos de acilo totales (FAME + ácidos grasos
  - 45 libres ("FFA")). Se identificaron mutantes que daban como resultado un aumento de producción de FAME del 42-44% cuando se sometió a prueba en placas. Cuando se sometieron a prueba estos mismos mutantes en frascos de agitación, produjeron el 62-65% de FAME en comparación con la *tesA* de *Ppro* silvestre que produjo sólo el 30% de FAME (véase el ejemplo 7, más adelante).

#### Métodos de preparación de variantes de *Ppro* o éster sintasa

- 50 En la práctica de los métodos de la presente divulgación, se usa mutagénesis para preparar grupos de células huésped recombinantes para examen. Normalmente, las células huésped recombinantes comprenden una o más secuencias de polinucleótido que incluyen un marco de lectura abierto para un polipéptido de éster sintasa o *Ppro*, tal como una variante de éster sintasa o una variante de tioesterasa (por ejemplo, *Ppro*) junto con secuencias reguladoras operativamente unidas. En el presente documento se describen numerosos ejemplos de polipéptidos de
- 55 éster sintasa variantes y polipéptidos de tioesterasa variantes útiles en la práctica de los métodos de la presente divulgación. También se describen en el presente documento ejemplos de secuencias reguladoras útiles en la práctica de los métodos de la presente divulgación. La mutagénesis de tales secuencias de polinucleótido puede realizarse usando técnicas de ingeniería genética, tales como mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis química al azar, procedimientos de delección con exonucleasa III o técnicas de clonación convencionales. Alternativamente,
- 60 pueden crearse mutaciones en secuencias de polinucleótido usando procedimientos de modificación o síntesis

química.

Se conocen bien en la técnica métodos de mutagénesis e incluyen, por ejemplo, los siguientes. En la PCR propensa a errores (véanse, por ejemplo Leung *et al.* Technique 1:11-15, 1989; y Caldwell *et al.* PCR Methods Applic. 2: 28-33, 1992), se realiza PCR en condiciones en las que la fidelidad de copiado de la ADN polimerasa es baja, de manera que se obtiene una alta tasa de mutaciones puntuales a lo largo de toda la longitud del producto de PCR. En resumen, en tales procedimientos, se mezclan polinucleótidos que van a mutagenizarse con cebadores de PCR, tampón de reacción, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, Taq polimerasa y una concentración apropiada de dNTP para lograr una alta tasa de mutaciones puntuales a lo largo de toda la longitud del producto de PCR. Por ejemplo, la reacción puede realizarse usando 20 fmoles de ácido nucleico que va a mutagenizarse, 30 pmoles de cada cebador de PCR, un tampón de reacción que comprende KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM (pH 8,3), y gelatina al 0,01%, MgCl<sub>2</sub> 7 mM, MnCl<sub>2</sub> 0,5 mM, 5 unidades de Taq polimerasa, dGTP 0,2 mM, dATP 0,2 mM, dCTP 1 mM y dTTP 1 mM. Puede realizarse PCR durante 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 45°C durante 1 min y 72°C durante 1 min. Se apreciará que estos parámetros pueden variarse según sea apropiado. Los polinucleótidos mutagenizados se clonan entonces en un vector apropiado, y se evalúan las actividades de los polipéptidos afectados codificados por los polinucleótidos mutagenizados. También puede realizarse la mutagénesis usando mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (véase, por ejemplo Reidhaar-Olson *et al.* Science 241:53-57, 1988) para generar mutaciones específicas de sitio en cualquier ADN clonado de interés. En resumen, en tales procedimientos, se sintetizan una pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios que portan una o más mutaciones que van a introducirse en el ADN clonado, y se ensamblan en el ADN clonado que va a mutagenizarse. Se recuperan los clones que contienen el ADN mutagenizado, y se evalúan las actividades de los polipéptidos afectados. Otro método de mutagénesis para generar variantes de secuencia de polinucleótido es la PCR de ensamblaje. La PCR de ensamblaje implica el ensamblaje de un producto de PCR de una mezcla de fragmentos de ADN pequeños. Un gran número de diferentes reacciones PCR se producen en paralelo en el mismo vial, cebando con los productos de una reacción los productos de otra reacción. La PCR de ensamblaje se describe en, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.965.408. Todavía otro método de mutagénesis de generación de variantes de secuencia de polinucleótido es la mutagénesis por PCR sexual (Stemmer PNAS, USA 91:10747-10751 1994). En la mutagénesis por PCR sexual, se produce recombinación homóloga forzada entre moléculas de ADN de diferentes secuencias de ADN, pero altamente relacionadas, *in vitro* como resultado de fragmentación al azar de la molécula de ADN basándose en la homología de secuencia. Esto va seguido por fijación del cruzamiento mediante extensión de cebadores en una reacción PCR.

También pueden crearse variantes de secuencia de éster sintasa (por ejemplo, '377) o tioesterasa (por ejemplo, *Ppro*) mediante mutagénesis *in vivo*. En algunas realizaciones, se generan mutaciones al azar en una secuencia de ácido nucleico propagando la secuencia de polinucleótido en una cepa bacteriana, tal como una cepa de *E. coli*, que porta mutaciones en una o más de las rutas de reparación de ADN. Tales cepas "mutadoras" tienen una mayor tasa de mutación al azar que la de una cepa silvestre. La propagación de una secuencia de ADN en una de estas cepas generará eventualmente mutaciones al azar dentro del ADN. Se describen cepas mutadoras adecuadas para su uso para mutagénesis *in vivo* en, por ejemplo, la publicación internacional PCT n.º WO 91/16427.

También pueden crearse variantes de secuencia de éster sintasa (por ejemplo, '377) o tioesterasa (por ejemplo, *Ppro*) usando mutagénesis de casete. En la mutagénesis de casete, se reemplaza una pequeña región de una molécula de ADN bicatenaria por un "casete" de oligonucleótido sintético que difiere de la secuencia de polinucleótido de partida. El oligonucleótido contiene a menudo versiones completa y/o parcialmente aleatorizadas de la secuencia de polinucleótido de partida. Hay muchas aplicaciones de mutagénesis de casete; por ejemplo, preparación de proteínas mutantes mediante mutagénesis de casete (véanse, por ejemplo Richards, J. H. Nature 323: 187 (1986); Ecker, D. J., *et al.* J. Biol. Chem. 262:3524-3527 (1987)); mutagénesis de casete de codones para insertar o reemplazar codones individuales (véase, por ejemplo Kegler-Ebo, D. M., *et al.* Nucleic Acids Res. 22(9): 1593-1599 (1994)); preparación de secuencias de polinucleótido variantes mediante aleatorización de secuencias de polinucleótido no codificantes que comprenden secuencias reguladoras (por ejemplo, sitios de unión al ribosoma, véanse, por ejemplo, Barrick, D., *et al.* Nucleic Acids Res. 22(7): 1287-1295 (1994)); Wilson, B. S., *et al.* Biotechniques 17:944-953 (1994)).

También puede usarse mutagénesis de conjunto recursivo (véase, por ejemplo Arkin *et al.* PNAS, USA 89:7811-7815, 1992) para generar variantes de secuencia de polinucleótido. La mutagénesis de conjunto recursivo es un algoritmo para la modificación por ingeniería de proteínas (es decir, mutagénesis de proteínas) desarrollado para producir diversas poblaciones de mutantes relacionados fenotípicamente cuyos miembros difieren en la secuencia de aminoácidos. Este método usa un mecanismo de retroalimentación para controlar tandas sucesivas de mutagénesis de casete combinatoria. También puede usarse mutagénesis de conjunto exponencial (véase, por ejemplo Delegrave *et al.* Biotech. Res. 11: 1548-1552, 1993) para generar variantes de secuencia de polinucleótido. La mutagénesis de conjunto exponencial es un procedimiento para generar bibliotecas combinatorias con un alto porcentaje de mutantes únicos y funcionales, en los que se aleatorizan pequeños grupos de residuos en paralelo para identificar, en cada posición alterada, aminoácidos que conducen a proteínas funcionales. También pueden usarse mutagénesis dirigida al sitio y al azar (véase, por ejemplo Arnold Curr. Opin. Biotech. 4:450-455, 1993).

Además, pueden usarse métodos de mutagénesis *in vivo* convencionales. Por ejemplo, células huésped, que comprenden una o más secuencias de polinucleótido que incluyen un marco de lectura abierto para un polipéptido de éster sintasa (por ejemplo, '377) o tioesterasa (por ejemplo, *Ppro*), así como secuencias reguladoras

operativamente unidas, pueden someterse a mutagénesis por medio de exposición a radiación (por ejemplo, luz UV o rayos X) o exposición a productos químicos (por ejemplo, agentes etilantes, agentes alquilantes o análogos de ácido nucleico). En algunos tipos de célula huésped, por ejemplo, bacterias, levaduras y plantas, también pueden usarse elementos transponibles para mutagénesis *in vivo*.

- 5 La mutagénesis de una o más secuencias de polinucleótido que codifican para una variante de éster sintasa tal como una variante de '377 da como resultado generalmente la expresión de un producto de polipéptido de éster sintasa que demuestra una función biológica modificada y mejorada. De manera similar, la mutagénesis de una o más secuencias de polinucleótido que codifican para una variante de *Ppro* da como resultado generalmente la expresión de un producto de polipéptido de *Ppro* que demuestra una función biológica modificada y mejorada tal como actividad éster sintasa potenciada. Por ejemplo, cuando se prepara un grupo de microorganismos recombinantes mediante mutagénesis de una o más secuencias de polinucleótido incluyendo el marco de lectura abierto que codifica para un polipéptido de '377 y secuencias reguladoras operativamente unidas, la proteína expresada a partir de las secuencias de polinucleótido mutagenizadas resultantes pueden mantener la función biológica de éster sintasa de '377, sin embargo, se observa un rendimiento mejorado de ésteres grasos, un rendimiento disminuido de beta-hidroxiésteres y/o composiciones mejoradas que comprenden una mezcla modificada de productos de éster graso (en cuanto a longitud de cadena, saturación, y similar) tras el cultivo del microorganismo recombinante en condiciones eficaces para expresar el polipéptido de '377 mutante. De manera similar, cuando se prepara un grupo de microorganismos recombinantes mediante mutagénesis de una o más secuencias de polinucleótido incluyendo el marco de lectura abierto que codifica para un polipéptido de *Ppro* y secuencias reguladoras operativamente unidas, la proteína expresada a partir de las secuencias de polinucleótido mutagenizadas resultantes pueden mantener la función biológica de tioesterasa de *Ppro* pero se observa una actividad éster sintasa en el microorganismo recombinante. Debido a la actividad éster sintasa, se observa un rendimiento mejorado de ésteres grasos, composiciones mejoradas que comprenden una mezcla modificada de productos de éster graso (en cuanto a longitud de cadena, saturación, y similares) tras el cultivo del microorganismo recombinante en condiciones eficaces para expresar el polinucleótido de *Ppro* mutante. En otra realización, la mutagénesis de una o más secuencias de polinucleótido de *Ppro* da como resultado generalmente la expresión de un producto de polipéptido de *Ppro* que puede conservar la misma función biológica que el polipéptido de *Ppro* original o silvestre aun cuando el polipéptido de *Ppro* mutante demuestra una función biológica modificada. Por ejemplo, cuando se prepara un grupo de microorganismos recombinantes mediante mutagénesis de una o más secuencias de polinucleótido que incluyen el marco de lectura abierto que codifica para un polipéptido de *Ppro* y secuencias reguladoras operativamente unidas, la proteína expresada a partir de las secuencias de polinucleótido mutagenizadas resultantes pueden mantener la función biológica de tioesterasa de *Ppro* pero se observa una actividad éster sintasa en el microorganismo recombinante.

#### Puntos calientes

- 35 La divulgación también se basa, al menos en parte, en la identificación de determinados "puntos calientes" conservados estructuralmente entre polipéptidos de éster sintasa variantes tales como polipéptidos de '377. Los puntos calientes son regiones en las que se observa un alto número de mutaciones que conducen a un título superior de producto de éster graso y/o una producción inferior de beta-hidroxiésteres en polipéptidos de '377. Notablemente, tales regiones se observan en polipéptidos de éster sintasa variantes que presentan una mayor actividad éster sintasa en comparación con el polipéptido silvestre que carece de esos puntos calientes. Los puntos calientes incluyen las regiones de aminoácido 39-44; 76-80; 98-102; 146-150; 170-207, en particular 182-207 (por ejemplo, que muestran el mayor número de mutaciones); 242-246; 300-320; 348-357; y 454-458.

#### Motivos

- 45 La divulgación también se basa, al menos en parte, en la identificación de determinados motivo conservados estructuralmente entre polipéptidos de tioesterasa actividad éster sintasa potenciada, en los que un polipéptido de tioesterasa, tal como *Ppro*, que comprende uno de estos motivos tiene mayor actividad éster sintasa en comparación con el polipéptido de tioesterasa silvestre que carece del motivo. Por consiguiente, la divulgación presenta polipéptidos de tioesterasa variantes, tales como *Ppro*, que comprenden un motivo en la región de aminoácidos 73-81 de SEQ ID NO: 51, con las sustituciones indicadas a continuación.

**Leu-Gly-[Ala or Gly]-[Val or Ile or Leu]-Asp-[Ala or Gly]-Leu-Arg-Gly**

**LG[AG][VIL]D[AG]LRG (SEQ ID NO: 66)**

50

Las posibles sustituciones incluyen alanina (A) o glicina (G) en la posición de aminoácido 75; valina (V), isoleucina (I) o leucina (L) en la posición de aminoácido 76; y alanina (A) o glicina (G) en la posición de aminoácido 78.

Células huésped recombinantes y cultivos de células huésped recombinantes

- 55 Las células huésped recombinantes de la divulgación comprenden una o más secuencias de polinucleótido que comprenden un marco de lectura abierto que codifica para un polipéptido que tiene actividad éster sintasa, por

ejemplo, cualquier polipéptido que cataliza la conversión de un acil-tioéster en un éster graso, junto con secuencias reguladoras operativamente unidas que facilitan la expresión del polipéptido que tiene actividad éster sintasa en una célula huésped recombinante. El polipéptido que tiene actividad éster sintasa mejorada es una variante o mutante de '377. El polipéptido que tiene actividad éster sintasa mejorada es una variante o mutante de *Ppro*. En una célula huésped recombinante de la divulgación, las secuencias codificantes y/o las secuencias reguladoras del marco de lectura abierto pueden modificarse en relación con la secuencia codificante silvestre correspondiente del polipéptido de '377 o *Ppro*. Se produce una composición de ésteres grasos cultivando una célula huésped recombinante en presencia de una fuente de carbono en condiciones eficaces para expresar el polipéptido de éster sintasa variante (por ejemplo, '377) o el polipéptido de tioesterasa variante con actividad éster sintasa (por ejemplo, *Ppro*). La expresión de polipéptidos de '377 mutantes o variantes da como resultado la producción de composiciones de ésteres grasos con rendimientos aumentados de ésteres grasos y rendimientos disminuidos de beta-hidroxiésteres. La expresión de polipéptidos de *Ppro* mutantes o variantes da como resultado la producción de composiciones de ésteres grasos con rendimientos aumentados de ésteres grasos.

Con el fin de ilustrar la divulgación, los solicitantes han construido cepas huésped que expresan secuencias de polipéptido de éster sintasa variantes (véanse los ejemplos, más adelante). Los ejemplos de secuencias de polipéptido de éster sintasa variantes que cuando se expresan en una célula huésped recombinante dan como resultado un título superior de ésteres grasos incluyen pero no se limitan a, secuencias expresadas en cepas huésped 9B12 (SEQ ID NO: 4), pKEV022 (SEQ ID NO: 10), KASH008 (SEQ ID NO: 16), KASH280 (SEQ ID NO: 33) y KASH281 (SEQ ID NO: 35). Los ejemplos de secuencias de polipéptido de éster sintasa variantes que cuando se expresan en una célula huésped recombinante dan como resultado un título superior de ésteres grasos y una disminución en la producción de  $\beta$ -OH-éster incluyen secuencias de polipéptido expresadas en cepas huésped pKEV28 (SEQ ID NO: 12), y KASH008 (SEQ ID NO: 16), KASH285 (SEQ ID NO: 37), KASH286 (SEQ ID NO: 39), KASH288 (SEQ ID NO: 41) y KASH289 (SEQ ID NO: 43).

Los ejemplos de secuencias de polipéptido de *Ppro* variantes que cuando se expresan en una célula huésped recombinante dan como resultado un título superior de ésteres grasos incluyen pero no se limitan a, secuencias expresadas en cepas huésped PROF1 (SEQ ID NO: 53), PROF2 (SEQ ID NO: 55), P1B9 (SEQ ID NO: 58), N115F (SEQ ID NO: 61), Vc7P4H5 (SEQ ID NO: 63), Vc7P5H9 (SEQ ID NO: 65) y Vc7P6F9 (SEQ ID NO: 31).

La célula huésped recombinante puede producir un éster graso, tal como un éster metílico de ácidos grasos (FAME), un éster etílico de ácidos grasos (FAEE), un éster de cera, o similares. Los ésteres de ácidos grasos se recuperan normalmente del medio de cultivo. La composición de ésteres de ácidos grasos producida por una célula huésped recombinante puede analizarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, CG-FID, con el fin de determinar la distribución de ésteres de ácidos grasos particulares así como las longitudes de cadena y el grado de saturación de los componentes de la composición de ésteres grasos.

#### Métodos de preparación de cultivos y células huésped recombinantes

Pueden usarse diversos métodos bien conocidos en la técnica para modificar por ingeniería genética células huésped para producir ésteres grasos y/o composiciones de ésteres grasos. Los métodos pueden incluir el uso de vectores, preferiblemente vectores de expresión, que comprenden un ácido nucleico que codifica para una éster sintasa de '377 o tioesterasa de *Ppro* mutante o variante con actividad éster sintasa, tal como se describe en el presente documento. Los expertos en la técnica apreciarán una variedad de vectores virales y no virales que pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, un título "superior" de ésteres grasos en una composición particular es un título superior de un tipo particular de éster de ácido graso o una combinación de ésteres de ácidos grasos producidos por un cultivo de células huésped recombinantes en relación con el título del mismo éster de ácido graso o combinación de ésteres de ácidos grasos producidos por un cultivo de control de una célula huésped silvestre correspondiente. Una secuencia de polinucleótido (o gen) de éster sintasa de '377 mutante o variante o una secuencia de polinucleótido (o gen) de *Ppro* mutante o variante pueden proporcionarse a la célula huésped por medio de un vector recombinante, que comprende un promotor operativamente unido a la secuencia de polinucleótido. El promotor puede ser un promotor regulado por el desarrollo, uno específico de orgánulo, uno específico de tejido, uno inducible, uno constitutivo o uno específico de célula. El vector recombinante comprende normalmente al menos una secuencia seleccionada de una secuencia de control de la expresión acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótido; un marcador de selección acoplado operativamente a la secuencia de polinucleótido; una secuencia de marcador acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótido; un resto de purificación acoplado operativamente a la secuencia de polinucleótido; una secuencia de secreción acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótido; y una secuencia de direccionamiento acoplada operativamente a la secuencia de polinucleótido. La una o más secuencias de polinucleótido, que comprenden marcos de lectura abiertos que codifican para proteínas y secuencias reguladoras operativamente unidas, pueden integrarse en un cromosoma de las células huésped recombinantes, incorporarse en uno o más sistemas de plásmido de expresión residentes en las células huésped recombinantes, o ambos.

Los vectores de expresión descritos en el presente documento incluyen una secuencia de polinucleótido descrita en el presente documento en una forma adecuada para la expresión de la secuencia de polinucleótido en una célula

huésped. Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que va a transformarse, el nivel de expresión del polipéptido deseado, etc. Los vectores de expresión descritos en el presente documento pueden introducirse en las células huésped para producir polipéptidos, incluyendo polipéptidos de fusión, codificados por las secuencias de polinucleótido descritas en el presente documento. La expresión de genes que codifican para polipéptidos en procariotas, por ejemplo, *E. coli*, se lleva a cabo lo más a menudo con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de polipéptidos o bien de fusión o bien de no fusión. Se conocen bien en la técnica sistemas de expresión adecuados para células tanto procariotas como eucariotas; véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989). En determinadas realizaciones, una secuencia de polinucleótido de la divulgación está operativamente unida a un promotor derivado del bacteriófago T5. En una realización, la célula huésped es una célula de levadura. En esta realización, el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Pueden introducirse vectores en células procariotas o eucariotas por medio de una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico foráneo (por ejemplo, ADN) en una célula huésped. Pueden encontrarse métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped en, por ejemplo, Sambrook *et al.* (anteriormente).

Para la transformación estable de células bacterianas, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transformación usados, sólo una pequeña fracción de células captará y replicará el vector de expresión. Con el fin de identificar y seleccionar estos transformantes, puede introducirse un gen que codifica para un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a un antibiótico) en las células huésped junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables incluyen los que confieren resistencia a fármacos tales como, pero sin limitarse a, ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Pueden introducirse ácidos nucleicos que codifican para un marcador seleccionable en una célula huésped en el mismo vector que el que codifica para un polipéptido descrito en el presente documento o pueden introducirse en un vector separado. Las células transformadas de manera estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse mediante crecimiento en presencia de un fármaco de selección apropiado.

Los ejemplos de células huésped que son microorganismos incluyen pero no se limitan a células del género *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Zymomonas*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Chrysosporium*, *Saccharomyces*, *Stenotrophomonas*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia* o *Streptomyces*. En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula bacteriana Gram-positiva. En otras realizaciones, la célula huésped es una célula bacteriana Gram-negativa. En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula de *E. coli*. En otras realizaciones, la célula huésped es una célula de *Bacillus lentus*, una célula de *Bacillus brevis*, una célula de *Bacillus stearothermophilus*, una célula de *Bacillus licheniformis*, una célula de *Bacillus alkalophilus*, una célula de *Bacillus coagulans*, una célula de *Bacillus circulans*, una célula de *Bacillus pumilis*, una célula de *Bacillus thuringiensis*, una célula de *Bacillus clausii*, una célula de *Bacillus megaterium*, una célula de *Bacillus subtilis* o una célula de *Bacillus amyloliquefaciens*.

En todavía otras realizaciones, la célula huésped es una célula de *Trichoderma koningii*, una célula de *Trichoderma viride*, una célula de *Trichoderma reesei*, una célula de *Trichoderma longibrachiatum*, una célula de *Aspergillus awamori*, una célula de *Aspergillus fumigatus*, una célula de *Aspergillus foetidus*, una célula de *Aspergillus nidulans*, una célula de *Aspergillus niger*, una célula de *Aspergillus oryzae*, una célula de *Humicola insolens*, una célula de *Humicola lanuginosa*, una célula de *Rhodococcus opacus*, una célula de *Rhizomucor miehei* o una célula de *Mucor miehei*. En aún otras realizaciones, la célula huésped es una célula de *Streptomyces lividans* o una célula de *Streptomyces murinus*. En aún otras realizaciones, la célula huésped es una célula de *Actinomycetes*. En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula de *Saccharomyces cerevisiae*.

En otras realizaciones, la célula huésped es una célula de una planta eucariota, alga, cianobacteria, bacteria verde del azufre, bacteria verde no del azufre, bacteria púrpura del azufre, bacteria púrpura no del azufre, extremófilo, levadura, hongo, un organismo modificado por ingeniería genética de los mismos o un organismo sintético. En algunas realizaciones, la célula huésped es dependiente de la luz o fija carbono. En algunas realizaciones, la célula huésped tiene actividad autótrofa.

En algunas realizaciones, la célula huésped tiene actividad fotoautótrofa, tal como en presencia de luz. En algunas realizaciones, la célula huésped es heterótrofa o mixótrofa en ausencia de luz. En determinadas realizaciones, la célula huésped es una célula de *Arabidopsis thaliana*, *Panicum virgatum*, *Miscanthus giganteus*, *Zea mays*, *Botryococcus braunii*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Synechococcus* Sp. PCC 7002, *Synechococcus* Sp. PCC 7942, *Synechocystis* Sp. PCC 6803, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Clorobium tepidum*, *Cloroflexus auranticus*, *Chromatium vinosum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium thermocellum*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pseudomonas fluorescens* o *Zymomonas mobilis*.

Cultivo y fermentación de células huésped modificadas por ingeniería genética

Tal como se usa en el presente documento, el término "fermentación" se refiere ampliamente a la conversión de

materiales orgánicos en sustancias diana por células huésped, por ejemplo, la conversión de una fuente de carbono por células huésped recombinantes en ácidos grasos o derivados de los mismos mediante la propagación de un cultivo de las células huésped recombinantes en un medio que comprende la fuente de carbono. Tal como se usa en el presente documento, el término “condiciones permisivas para la producción” significa cualesquiera condiciones que permiten que una célula huésped produzca un producto deseado, tal como una composición de ésteres grasos. De manera similar, el término “condiciones en las que se expresa la secuencia de polinucleótido de un vector” significa cualesquiera condiciones que permiten que una célula huésped sintetice un polipéptido. Las condiciones adecuadas incluyen, por ejemplo, condiciones de fermentación. Las condiciones de fermentación pueden comprender muchos parámetros incluyendo, pero sin limitarse a, intervalos de temperatura, niveles de aireación, tasas de alimentación y composición de medios. Cada una de estas condiciones, individualmente y en combinación, permiten que crezca la célula huésped. La fermentación puede ser aerobia, anaerobia, o variaciones de las mismas (tales como microaerobias). Los medios de cultivo a modo de ejemplo incluyen caldos o geles. Generalmente, el medio incluye una fuente de carbono que puede metabolizarse por una célula huésped directamente. Además, pueden usarse enzimas en el medio para facilitar la movilización (por ejemplo, la despolimerización de almidón o celulosa para dar azúcares fermentables) y el metabolismo posterior de la fuente de carbono.

Para la producción a pequeña escala, las células huésped modificadas por ingeniería genética pueden hacerse crecer en lotes de, por ejemplo, aproximadamente 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl, 500 µl, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 15 ml, 25 ml, 50 ml, 75 ml, 100 ml, 500 ml, 1 l, 2 l, 5 l o 10 l; fermentarse; e inducirse para expresar una secuencia de polinucleótido deseada, tal como una secuencia de polinucleótido que codifica para un polipéptido que tiene actividad éster sintasa. Para la producción a gran escala, las células huésped modificadas por ingeniería genética pueden hacerse crecer en cultivos que tienen un volumen de lotes de aproximadamente 10 l, 100 l, 1000 l, 10.000 l, 100.000 l y 1.000.000 l o más; fermentarse; e inducirse para expresar una secuencia de polinucleótido deseada. Las composiciones de ésteres grasos descritas en el presente documento pueden encontrarse en el entorno extracelular del cultivo de células huésped recombinantes y pueden aislarse fácilmente del medio de cultivo. Un derivado de ácido graso puede secretarse por la célula huésped recombinante, transportarse al entorno extracelular o transferirse de manera pasiva al entorno extracelular del cultivo de células huésped recombinantes. Puede aislarse la composición de ésteres grasos de un cultivo de células huésped recombinantes usando métodos de rutina conocidos en la técnica.

#### Examen de células huésped modificadas por ingeniería genética

En una realización de la presente divulgación, la actividad de un polipéptido de éster sintasa de '377 variante o mutante se determina cultivando células huésped recombinantes (que comprenden una o más éster sintasas mutagenizadas tales como secuencias de polinucleótido de '377), seguido por examen para identificar características de composiciones de ésteres de ácidos grasos producidos por las células huésped recombinantes; por ejemplo, título, rendimiento y productividad de ésteres de ácidos grasos; y tanto por ciento de beta-hidroxiésteres. Pueden someterse a ensayo polipéptidos de éster sintasa de '377 variantes o mutantes y fragmentos de los mismos para detectar actividad éster sintasa usando métodos de rutina. Por ejemplo, se pone en contacto un polipéptido de éster sintasa de '377 variante o mutante o fragmento del mismo con un sustrato (por ejemplo, un acil-CoA, un acil-ACP, un ácido graso libre, un alcohol) en condiciones que permiten que el polipéptido funcione. Puede medirse una disminución en el nivel del sustrato o un aumento en el nivel de un éster graso o una composición de ésteres grasos para determinar la actividad éster sintasa.

#### Productos derivados de células huésped recombinantes

Tal como se usa en el presente documento, “fracción de carbono moderno” o fM tiene el mismo significado definido por los materiales de referencia patrón del Instituto Nacional de Normas y Tecnología (NIST) (SRM 4990B y 4990C, conocidos como patrones de ácido oxálico HOxI y HOxII, respectivamente). La definición fundamental se refiere a 0,95 veces la razón isotópica  $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$  HOxI (con referencia a AD 1950). Esto es aproximadamente equivalente a la madera antes de la Revolución Industrial corregida para la desintegración. Para la biosfera viva actual (material vegetal), fM es aproximadamente 1,1.

Los bioproductos (por ejemplo, las composiciones de ésteres grasos según la presente divulgación) que comprenden compuestos orgánicos producidos biológicamente y, en particular, las composiciones de ésteres grasos producidos usando la ruta de biosíntesis de ácidos grasos descrita en el presente documento, se han producido a partir de fuentes de carbono renovables y, como tal, son nuevas composiciones de materia. Estos nuevos bioproductos pueden distinguirse de compuestos orgánicos derivados de carbono petroquímico basándose en la obtención de huella isotópica de carbono dual o la datación mediante  $^{14}\text{C}$ . Adicionalmente, la fuente específica de carbono de fuente biológica (por ejemplo, glucosa frente a glicerol) puede determinarse mediante obtención de huella isotópica de carbono dual (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7.169.588). La capacidad para distinguir bioproductos de compuestos orgánicos basados en el petróleo es beneficiosa en la trazabilidad de estos materiales en el comercio. Por ejemplo, pueden distinguirse compuestos orgánicos o químicos que comprenden perfiles isotópicos de carbono tanto de base biológica como de base en el petróleo de compuestos orgánicos y químicos que se componen sólo de materiales basados en el petróleo. Así, los bioproductos en el presente documento pueden someterse a seguimiento o trazabilidad en el comercio basándose en su perfil isotópico de carbono único. Los bioproductos pueden distinguirse de compuestos orgánicos basados en el petróleo comparando

la razón isotópica de carbono estable ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) en cada muestra. La razón  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  en un bioproducto dado es consecuencia de la razón  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  en el dióxido de carbono atmosférico en el momento en que se fija el dióxido de carbono. También refleja la ruta metabólica precisa. También se producen variaciones regionales. El petróleo, las plantas C3 (las de hoja caduca), las plantas C4 (las hierbas) y carbonatos marinos muestran todas diferencias significativas en  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  y los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  correspondientes. Las plantas tanto C4 como C3 muestran un intervalo de razones isotópicas  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , pero valores típicos son de aproximadamente -7 a aproximadamente -13 por cada mil para plantas C4 y de aproximadamente -19 a aproximadamente -27 por cada mil para plantas C3 (véase, por ejemplo, Stuiver *et al.* Radiocarbon 19:355 (1977)). El carbón y el petróleo se encuentran generalmente en este último intervalo.

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

Se han desarrollado una serie de RM alternativos en cooperación con IAEA, USGS, NIST, y otros laboratorios de isótopos internacionales seleccionados. Las notaciones para las desviaciones por mil con respecto a PDB es  $\delta^{13}\text{C}$ . Se realizan las mediciones con  $\text{CO}_2$  mediante espectrometría de masas de razón estable de alta precisión (IRMS) con iones moleculares de masas 44, 45 y 46. Las composiciones descritas en el presente documento incluyen composiciones de ésteres grasos y productos producidos mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Específicamente, la composición de ésteres grasos o producto puede tener un  $\delta^{13}\text{C}$  de aproximadamente -28 o mayor, aproximadamente -27 o mayor, -20 o mayor, -18 o mayor, -15 o mayor, -13 o mayor, -10 o mayor u -8 o mayor. Por ejemplo, la composición de ésteres grasos o producto puede tener un  $\delta^{13}\text{C}$  de aproximadamente -30 a aproximadamente -15, de aproximadamente -27 a aproximadamente -19, de aproximadamente -25 a aproximadamente -21, de aproximadamente -15 a aproximadamente -5, de aproximadamente -13 a aproximadamente -7 o de aproximadamente -13 a aproximadamente -10. En otros casos, la composición de ésteres grasos o producto puede tener un  $\delta^{13}\text{C}$  de aproximadamente -10, -11, -12 o -12,3. Las composiciones de ésteres grasos y productos producidos según la divulgación en el presente documento, también pueden distinguirse de compuestos orgánicos basados en el petróleo comparando la cantidad de  $^{14}\text{C}$  en cada compuesto. Dado que el  $^{14}\text{C}$  tiene una semivida nuclear de 5730 años, los combustibles basados en el petróleo que contienen carbono más "antiguo" pueden distinguirse de composiciones de ésteres grasos y bioproductos que contienen carbono "más nuevo" (véanse, por ejemplo, Currie, "Source Apportionment of Atmospheric Particles", Characterization of Environmental Particles, J. Buffle y H. P. van Leeuwen, eds., 1 de vol. I de IUPAC Environmental Analytical Chemical Series (Lewis Publishers, Inc.) 3-74, (1992)).

La suposición básica en la datación por radiocarbono es que la constancia de la concentración de  $^{14}\text{C}$  en la atmósfera conduce a la constancia de  $^{14}\text{C}$  en organismos vivos. Sin embargo, debido a las pruebas nucleares atmosféricas desde 1950 y el quemado de combustibles fósiles desde 1850, el  $^{14}\text{C}$  ha adquirido una segunda característica temporal geoquímica. Su concentración en el  $\text{CO}_2$  atmosférico, y así en la biosfera viva, se duplicó aproximadamente en el apogeo de las pruebas nucleares, a mediados de los años 1960. Desde entonces se ha vuelto gradualmente a la tasa isotópica ( $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) inicial cosmogénica (atmosférica) de estado estacionario de aproximadamente  $1,2 \times 10^{-12}$ , con una "semivida" de relajación aproximada de 7-10 años. (Esta última semivida no ha de tomarse literalmente; más bien, debe usarse la función de entrada/desintegración nuclear atmosférica detallada para rastrear la variación de  $^{14}\text{C}$  atmosférico y de la biosfera desde el comienzo de la era nuclear). Es esta última característica temporal de  $^{14}\text{C}$  de la biosfera la que mantiene la promesa de datación anual de carbono reciente de la biosfera. Puede medirse el  $^{14}\text{C}$  mediante espectrometría de masas con acelerador (AMS), facilitándose los resultados en unidades de "fracción de carbono moderno" (fM). Las composiciones de ésteres grasos y productos descritos en el presente documento incluyen bioproductos que pueden tener un fM $^{14}\text{C}$  de al menos aproximadamente 1. Por ejemplo, el bioproducto de la divulgación puede tener un fM $^{14}\text{C}$  de al menos aproximadamente 1,01, un fM $^{14}\text{C}$  de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5, un fM $^{14}\text{C}$  de aproximadamente 1,04 a aproximadamente 1,18, o un fM $^{14}\text{C}$  de aproximadamente 1,111 a aproximadamente 1,124.

Otra medición de  $^{14}\text{C}$  se conoce como el tanto por ciento de carbono moderno (pMC). Para un arqueólogo o geólogo que usa dataciones por  $^{14}\text{C}$ , 1950 es igual a una edad de "cero años". Esto también representa 100 pMC. El "carbono de bombas" en la atmósfera alcanzó casi el doble del nivel normal en 1963 en el apogeo de las armas termonucleares. Su distribución dentro de la atmósfera se ha aproximado desde su aparición, mostrando valores que son mayores de 100 pMC para plantas y animales que viven desde 1950. Ha disminuido gradualmente a lo largo del tiempo, siendo el valor de hoy en día próximo a 107,5 pMC. Esto significa que un material de biomasa reciente, tal como maíz, proporcionaría una firma de  $^{14}\text{C}$  próxima a 107,5 pMC. Los compuestos basados en el petróleo tendrán un valor de pMC de cero. La combinación de carbono fósil con carbono de hoy en día dará como resultado una dilución del contenido de pMC de hoy en día. Suponiendo que 107,5 pMC representa el contenido de  $^{14}\text{C}$  de materiales de biomasa de hoy en día y 0 pMC representa el contenido de  $^{14}\text{C}$  de productos basados en el petróleo, el valor de pMC medido para ese material reflejará las proporciones de los dos tipos de componente. Por ejemplo, un material derivado al 100% de soja de hoy en día proporcionará una firma de radiocarbono próxima a 107,5 pMC. Si ese material se diluyera al 50% con productos basados en el petróleo, proporcionaría una firma de radiocarbono de aproximadamente 54 pMC. Se deriva un contenido de carbono de base biológica asignando el "100%" igual a 107,5 pMC y el "0%" igual a 0 pMC. Por ejemplo, una muestra que mide 99 pMC proporcionará un contenido de carbono de base biológica equivalente del 93%. Este valor se denomina el resultado de carbono de base biológica medio y supone que todos los componentes dentro del material analizado se originan o bien a partir de material

biológico de hoy en día o bien a partir de material basado en el petróleo. Un bioproducto que comprende uno o más derivados de ácido graso tal como se describe en el presente documento puede tener un pMC de al menos aproximadamente 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100. En otros casos, un bioproducto descrito en el presente documento puede tener un pMC de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100; entre aproximadamente 60 y aproximadamente 100; entre aproximadamente 70 y aproximadamente 100; entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100; entre aproximadamente 85 y aproximadamente 100; entre aproximadamente 87 y aproximadamente 98; o entre aproximadamente 90 y aproximadamente 95. En aún otros casos, una composición de éteres grasos descrita en el presente documento puede tener un pMC de aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94 ó 94,2.

#### Composiciones de ésteres grasos

Los ejemplos de ésteres grasos incluyen ésteres de ácidos grasos, tales como los derivados de alcoholes de cadena corta, incluyendo FAEE y FAME, y los derivados de alcoholes grasos de cadena más larga. Los ésteres grasos y/o composiciones de ésteres grasos que se producen pueden usarse, individualmente o en combinaciones adecuadas, como biocombustible (por ejemplo, un biodiesel), compuesto químico industrial, o componente de, o materia prima para, biocombustible o producto químico industrial. En algunos aspectos, la divulgación se refiere a un método de producción de una composición de ésteres grasos que comprende uno o más ésteres de ácidos grasos, incluyendo, por ejemplo, FAEE, FAME y/u otros derivados de ésteres de ácidos grasos de alcoholes de cadena más larga. En aspectos relacionados, el método comprende un huésped de producción modificado por ingeniería genética adecuado para preparar ésteres grasos y composiciones de ésteres grasos incluyendo, pero sin limitarse a, FAME, FAEE, ésteres propílicos de ácidos grasos, ésteres isopropílicos de ácidos grasos, ésteres butílicos de ácidos grasos, monoglicéridos, ésteres isobutílicos de ácidos grasos, ésteres 2-butílicos de ácidos grasos y ésteres terc-butílicos de ácidos grasos, y similares.

Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación presenta un método de preparación de una composición de ésteres grasos que puede comprender un porcentaje disminuido de beta-hidroxiésteres y ácidos grasos libres en relación con composiciones de ésteres grasos producidas por una enzima éster sintasa silvestre, tal como '377. El polipéptido o la enzima de '377 variante con actividad de éster metílico de ácidos grasos mejorada tiene propiedades mejoradas incluyendo, pero sin limitarse a, beta-hidroxiésteres aumentados, beta-hidroxiésteres disminuidos, longitudes de cadena aumentadas de ésteres de ácidos grasos y longitudes de cadenas disminuidas de ésteres de ácidos grasos. El método incluye expresar en una célula huésped un gen que codifica para un polipéptido que tiene actividad éster sintasa. En otro aspecto, la divulgación presenta un método de preparación de una composición de ésteres grasos que puede comprender o no ácidos grasos libres, en el que el método incluye expresar en una célula huésped un gen que codifica para un polipéptido de *Ppro* que tiene actividad éster sintasa. En algunas realizaciones, el gen que codifica para el polipéptido de éster sintasa o polipéptido de tioesterasa con actividad éster sintasa se selecciona de las enzimas clasificadas como EC 2.3.1.75 o EC 3.1.2, respectivamente, y cualquier otro polipéptido que pueda catalizar la conversión aciltioéster en ésteres grasos, incluyendo, sin limitación, tioesterasas, éster sintasas, acil-CoA:alcohol transacilasas, alcohol O-ácido graso-acil-transferasa, aciltransferasas y acil graso-coA:alcohol graso aciltransferasas, o una variante adecuada de las mismas.

En determinadas realizaciones, una tioesterasa endógena de la célula huésped, si está presente, no está modificada. En otras determinadas realizaciones, la célula huésped expresa un nivel atenuado de una actividad tioesterasa o la tioesterasa está funcionalmente delecionada. En algunas realizaciones, la célula huésped no tiene actividad tioesterasa detectable. Tal como se usa en el presente documento el término "detectable" significa que puede determinarse su existencia o presencia. Por ejemplo, la producción de un producto a partir de un reactante (por ejemplo, producción de un determinado tipo de ésteres de ácidos grasos) puede detectarse usando los métodos conocidos en la técnica o proporcionados en el presente documento. En determinadas realizaciones, la célula huésped expresa un nivel atenuado de una enzima de degradación de ácidos grasos, tal como, por ejemplo, una acil-CoA sintasa, o la enzima de degradación de ácidos grasos está funcionalmente delecionada. En algunas realizaciones, la célula huésped no tiene actividad de enzima de degradación de ácidos grasos detectable. En realizaciones particulares, la célula huésped expresa un nivel atenuado de una tioesterasa, una enzima de degradación de ácidos grasos, o ambas. En otras realizaciones, la tioesterasa, la enzima de degradación de ácidos grasos, o ambas, están funcionalmente delecionadas. En algunas realizaciones, la célula huésped puede convertir una acil-ACP o acil-CoA en ácidos grasos y/o derivados de los mismos tales como ésteres, en ausencia de una tioesterasa, una enzima de derivado de ácido graso, o ambas. Alternativamente, la célula huésped puede convertir un ácido graso libre en un éster graso en ausencia de una tioesterasa, una enzima de derivado de ácido graso, o ambas. En determinadas realizaciones, el método incluye además aislar una composición de ésteres grasos, un éster graso o un ácido graso libre de la célula huésped o del cultivo de células huésped. En realizaciones preferidas de la divulgación, la composición de derivado de ácido graso comprende un alto porcentaje de ésteres grasos. En determinadas realizaciones, el éster graso o la composición de ésteres grasos se deriva de un sustrato de alcohol adecuado tal como un alcohol de cadena corta o larga.

En general, el éster graso o la composición de ésteres grasos se aísla del entorno extracelular de la célula huésped. En algunas realizaciones, el éster graso o la composición de ésteres grasos se secreta de manera espontánea, parcial o completamente, de la célula huésped. En realizaciones alternativas, el éster graso o la composición de ésteres grasos se transporta al entorno extracelular, opcionalmente con la ayuda de una o más proteínas de

transporte. En todavía otras realizaciones, el éster graso o la composición de ésteres grasos se transporta de manera pasiva al entorno extracelular.

En algunas realizaciones, la divulgación comprende un método de producción de un éster de ácido graso o una composición de ésteres de ácidos grasos, composición que puede comprender un porcentaje disminuido de beta-hidroxiésteres y/o ácidos grasos libres cultivando una célula huésped modificada por ingeniería genética en condiciones que permiten la expresión o sobreexpresión de un polipéptido de '377 mutante o variante. En una realización alternativa, la divulgación comprende un método de producción de un éster de ácido graso o una composición de ésteres de ácidos grasos, composición que puede comprender un porcentaje aumentado de beta-hidroxiésteres y/o ácidos grasos libres cultivando una célula huésped modificada por ingeniería genética en condiciones que permiten la expresión o sobreexpresión de un polipéptido de '377 mutante o variante. En algunas realizaciones, el método comprende además cultivar la célula huésped modificada por ingeniería genética en medio que comprende una fuente de carbono (tal como un hidrato de carbono) en condiciones que permiten la producción de un éster de ácido graso o una composición de ésteres de ácidos grasos que puede comprender un porcentaje aumentado o disminuido de beta-hidroxiésteres y/o ácidos grasos libres. En otras realizaciones, la divulgación comprende un método de producción de un éster de ácido graso o una composición de ésteres de ácidos grasos, composición que puede comprender ácidos grasos libres cultivando una célula huésped modificada por ingeniería genética en condiciones que permiten la expresión o sobreexpresión de un polipéptido de *Ppro* que tiene actividad éster sintasa. En algunas realizaciones, el método comprende además cultivar la célula huésped modificada por ingeniería genética en medio que comprende una fuente de carbono tal como un hidrato de carbono en condiciones que permiten la producción de un éster de ácido graso o una composición de ésteres de ácidos grasos que puede comprender ácidos grasos libres.

La divulgación se refiere a un polipéptido de éster sintasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, con una o más sustituciones, adiciones, inserciones o delecciones de aminoácidos en el que el polipéptido tiene actividad éster sintasa. Un polipéptido de '377 mutante o variante tiene mayor actividad éster sintasa que el polipéptido de '377 silvestre correspondiente. Por ejemplo, un polipéptido de '377 mutante o variante puede, o tiene una capacidad mejorada, catalizar la conversión de tioésteres, por ejemplo, acil graso-CoA o acil graso-ACP, en ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos. En realizaciones particulares, el polipéptido de '377 mutante o variante puede, o tiene una capacidad mejorada, catalizar la conversión de sustratos de tioéster en ácidos grasos y/o derivados de los mismos, tales como ésteres grasos, en ausencia de una actividad tioesterasa, una actividad de enzima de degradación de ácidos grasos, o ambas. Por ejemplo, un polipéptido de '377 mutante o variante puede convertir acil graso-ACP y/o acil graso-CoA en ésteres grasos *in vivo*, en ausencia de una tioesterasa o una actividad acil-CoA sintasa.

En algunas realizaciones, el polipéptido de '377 mutante o variante o polipéptido de *Ppro* mutante o variante comprende una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos conservadas: reemplazo de un aminoácido alifático, tal como alanina, valina, leucina e isoleucina, por otro aminoácido alifático; reemplazo de una serina por una treonina; reemplazo de una treonina por una serina; reemplazo de un residuo ácido, tal como ácido aspártico y ácido glutámico, por otro residuo ácido; reemplazo de un residuo que porta un grupo amida; intercambio de un residuo básico, tal como lisina y arginina, por otro residuo básico; y reemplazo de un residuo aromático, tal como fenilalanina y tirosina, por otro residuo aromático. En algunas realizaciones, el polipéptido de '377 mutante o variante o polipéptido de *Ppro* mutante o variante que tiene actividad éster sintasa tiene aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más sustituciones, adiciones, inserciones o delecciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, la variante de polipéptido tiene actividad éster sintasa y/o aciltransferasa. Por ejemplo, el polipéptido de '377 mutante o variante o polipéptido de *Ppro* mutante o variante puede catalizar la conversión de tioésteres en ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos, usando alcoholes como sustratos. En un ejemplo no limitativo, el polipéptido de '377 mutante o variante polipéptido de *Ppro* mutante o variante puede catalizar la conversión de un acil graso-CoA y/o un acil graso-ACP en un ácido graso y/o un éster de ácido graso, usando un sustrato de alcohol adecuado, tal como, por ejemplo, un metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, decanol, dodecanol, tetradecanol o hexadecanol.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos pretenden ilustrar la divulgación y no deben interpretarse como limitativos del alcance de las reivindicaciones. Los solicitantes han empleado un sistema de un gen para la producción de ésteres de ácidos grasos en células huésped recombinantes. Esto incluye expresar en células huésped adecuadas polipéptidos de '377 mutantes o variantes que se han modificado por ingeniería genética para que tengan actividad éster sintasa mejorada con el fin de producir composiciones de ésteres grasos a un rendimiento o título aumentado. Las composiciones de ésteres grasos obtenidas incluyen FAME así como cantidades aumentadas y disminuidas de beta-hidroxiésteres. Se usó la misma estrategia para preparar polipéptidos de *Ppro* con actividad éster sintasa potenciada para la producción de ésteres grasos a un rendimiento o título aumentado.

### Protocolos:

Todos los protocolos usan placas de 96 pocillos, bloque maestro, de 2 ml (Greiner Bio-One, Monroe, NC o Corning, Amsterdam, Países Bajos) para hacer crecer los cultivos y placas Costar para extraer especies de ácidos grasos del

caldo de cultivo. Los protocolos a continuación incluyen las condiciones de fermentación y pueden usarse para evaluar la producción de especies de ácidos grasos. También pueden usarse protocolos alternativos para evaluar la producción de especies de ácidos grasos.

Protocolo 1 (FA4P, 32°C):

- 5 A partir de un cultivo en LB que se hace crecer en una placa de 96 pocillos: se usaron 30 µl de cultivo en LB para inocular 270 µl de FA2P (tabla 4), que se incubó entonces durante aproximadamente 16 horas a 32°C en agitador. Entonces se usaron 30 µl de la simiente durante la noche para inocular 300 µl de FA4P + MeOH al 2% + IPTG 1 mM (tabla 4). Entonces se incubaron los cultivos a 32°C en agitador durante 24 horas, cuando se extrajeron siguiendo el protocolo de extracción convencional detallado a continuación (protocolo 5).

- 10 Protocolo 2 (BP3G2P, 32°C):

Se descongelaron reservas en glicerol de biblioteca y se transfirieron 10 µl a 150 µl de LB + espectinomicina 100 µg/ml en placas de 96 pocillos poco profundos, que se incubaron a 32°C durante 20 horas. Se usaron 20 µl de este cultivo para inocular 280 µl de medio BSiG4P (tabla 4), que se incubó a 32°C con agitación a 250 rpm durante 20 horas. Se usaron 20 µl de este cultivo para inocular 380 µl de medio BP3G2P (tabla 4). Se incubaron los cultivos a 32°C con agitación durante 24 horas, cuando o bien se sometieron al ensayo de rojo Nilo siguiendo el protocolo convencional detallado a continuación o bien se extrajeron siguiendo el protocolo de extracción convencional detallado a continuación (protocolo 5).

Protocolo 3 (FA2, 32°C):

- 20 A partir de un cultivo en LB que se hace crecer en una placa de 96 pocillos: se usaron 30 µl del cultivo en LB para inocular 270 µl de FA2, que entonces se incubaron durante aproximadamente 16 horas a 32°C en un agitador. Entonces se usaron 30 µl de la simiente durante la noche para inocular 300 µl de FA2 + MeOH al 2% + IPTG 1 mM. Entonces se incubaron los cultivos a 32°C en un agitador durante 24 horas, cuando se extrajeron siguiendo el protocolo de extracción convencional detallado a continuación (protocolo 5).

Protocolo 4 (FA2P, 32°C):

- 25 A partir de un cultivo en LB que se hace crecer en una placa de 96 pocillos: se usaron 30 µl de cultivo en LB para inocular 270 µl de FA2P, que entonces se incubó durante aproximadamente 16 horas a 32°C en agitador. Entonces se usaron 30 µl de la simiente durante la noche para inocular 300 µl de FA2P + MeOH al 2% + IPTG 1 mM. Entonces se incubaron los cultivos a 32°C en agitador durante 24 horas, cuando se extrajeron siguiendo el protocolo de extracción convencional detallado a continuación (protocolo 5).

- 30 Protocolo 5 (extracción convencional de especies de ácidos grasos):

A cada pocillo que iba a extraerse se le añadieron 40 µl de HCl 1 M, luego 300 µl de acetato de butilo con C11-FAME 500 mg/l como patrón interno. Entonces se termoselló la placa de 96 pocillos usando una selladora de placas (ALPS-300; Abgene, Thermo Scientific, Rockford, IL), y se agitó durante 15 minutos a 2000 rpm usando un instrumento MixMate (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Tras agitar, se centrifugó la placa durante 10 minutos a 4500 rpm a temperatura ambiente (Allegra X-15R, rotor SX4750A, Beckman Coulter, Brea, CA) para separar las fases acuosa y orgánica. Se transfirieron 50 µl de la fase orgánica a una placa de 96 pocillos (placa de 96 pocillos, polipropileno, Corning, Ámsterdam, Países Bajos). Se termoselló la placa, luego se almacenó a -20°C hasta que se evaluó mediante CG-FID empleando métodos automatizados convencionales.

Protocolo 6 (ensayo de rojo Nilo convencional de especies de ácidos grasos):

- 40 Tras 24 horas de fermentación, se realizó el ensayo de rojo Nilo añadiendo 70 µl de caldo de fermentación a 130 µl de rojo Nilo 1,54 µg/ml en el 84,6% de agua y el 15,4% de disolución de acetonitrilo (para una concentración de ensayo final de rojo Nilo 1 µg/ml) en una placa Greiner MicroLonFluotrac 200 y se mezclaron pipeteando arriba y abajo. Se midieron las unidades de fluorescencia relativa a una excitación de 540 nm y emisión de 630 nm usando el instrumento SpectraMax M2.

- 45 Protocolo 7 (construcción de una biblioteca de saturación):

Se usaron técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica para preparar bibliotecas de saturación. Por ejemplo, la estructura principal de vector puede prepararse usando endonucleasas de restricción en el vector, mientras que la creación de diversidad en el inserto de ADN puede generarse usando cebadores degenerados. Por ejemplo, la clonación de la estructura principal de vector y un inserto de ADN con diversidad puede realizarse usando el sistema de clonación InFusion (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) según el protocolo del fabricante.

Protocolo 8 (construcción de una biblioteca de combinación):

Se combinaron mutaciones identificadas como beneficiosas para proporcionar variantes de *Ppro* o 377 con mejoras adicionales en la producción de especies de ácidos grasos o FAME. Se usaron técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica para preparar las bibliotecas de combinación. Por ejemplo, la estructura principal de vector puede prepararse usando endonucleasas de restricción en el vector, mientras que la creación de diversidad en el inserto de ADN puede generarse usando cebadores para introducir las mutaciones deseadas. Por ejemplo, la clonación de la estructura principal de vector y un inserto de ADN con diversidad puede realizarse usando el sistema de clonación InFusion (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA), según el protocolo del fabricante. Por ejemplo, pueden generarse bibliotecas de combinación usando el protocolo de PCR de transferencia (tPCR) (Erijman *et al.*, 2011. J Structural Bio.175, 171-177).

#### Protocolo 9 (examen de bibliotecas):

Una vez generada la diversidad de bibliotecas en una biblioteca de saturación o biblioteca de combinación, se examinó usando uno de los métodos descritos anteriormente (protocolos 1-4). Cuando se examinan variantes de éster sintasa, se identificaron tres tipos de aciertos: (1) título aumentado de especies de ésteres de ácidos grasos (título de "FAS"); (2) cantidad aumentada de FAME producido; por ejemplo, C14-FAME; y/o (3) cantidad disminuida de beta-hidroxíéster producido. Las mutaciones en las variantes de '377 dentro de cada acierto se identificaron mediante secuenciación usando técnicas convencionales empleadas de manera rutinaria por los expertos en la técnica. Las mutaciones en las variantes de '377 dentro de cada acierto se identificaron mediante secuenciación usando técnicas convencionales empleadas por los expertos en la técnica. Las tablas 1 y 2 enumeran las mutaciones ("aciertos") identificadas como beneficiosas en bibliotecas de saturación y la tabla 5 enumera las mutaciones ("aciertos") identificadas como beneficiosas en bibliotecas de combinación. Cuando se examinan variantes de *Ppro*, se identificaron dos tipos de aciertos (1) especies de ésteres de ácidos grasos aumentadas; (2) aumento en la cantidad de FAME producido. Las mutaciones en las variantes de *Ppro* dentro de cada acierto se identificaron mediante secuenciación y usando técnicas convencionales empleadas de manera rutinaria por los expertos en el campo relevante. Las tablas 8 a 11 enumeran las mutaciones ("aciertos") identificados como beneficiosos en bibliotecas de saturación y las tablas 12 y 14 enumeran las mutaciones ("aciertos") identificados como beneficiosos en bibliotecas de combinación.

#### EJEMPLO 1

##### Biblioteca de saturación preparada usando WS377 como molde

Se construyó una biblioteca de saturación completa de la éster sintasa de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ("377") y se examinó para detectar variantes que mostraban mejora con respecto a WS377 silvestre (protocolo 7). El plásmido usado para preparar la biblioteca de saturación completa se designó pKEV027 que expresaba SEQ ID NO: 1 (es decir, la secuencia de ácido nucleico silvestre de WS377). Se examinó la biblioteca de saturación completa en una cepa de *E. coli* (BD64) que se modificó por ingeniería genética para bloquear la beta-oxidación (por medio de delección de FadE) y sobreexpresar varias enzimas de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos (por ejemplo, FabA, FabB, FabF, FabG, FabI, FabH, FabV, FabZ, accABCD) a través de técnicas de manipulación convencionales. Se examinaron las bibliotecas usando uno de los protocolos convencionales (protocolos 1-2) descritos anteriormente. Las mejoras se clasificaron originalmente como o bien mejora del título de FAME o bien reducción de la fracción de beta-hidroxíésteres (denominados en el presente documento "β-OH-ésteres" o "β-OH-FAME" o "beta-OH" o "beta-hidroxilo") sin afectar necesariamente al título de FAME. Los resultados del examen de bibliotecas de saturación se muestran en las tablas 1 y 2 a continuación. La tabla 1 presenta los resultados para mutaciones que muestran todas las mejoras de éster graso aumentados cuando se usa '377 como molde (SEQ ID NO: 1). La tabla 2 presenta los resultados para mutaciones que condujeron a una disminución en el % de β-OH-FAME usando '377 como molde. Notablemente, algunos mutantes mostraron ambos, un título mejorado de FAME así como una disminución en β-OH-FAME, lo que es beneficioso si el producto deseado final es principalmente FAME. Algunos mutantes mostraron un título mejorado de FAME así como un aumento en β-OH-FAME. Además, algunos mutantes dieron como resultado un aumento o una disminución de ésteres de cadena corta.

Tal como puede observarse en la tabla 1 a continuación, las mutaciones de las bibliotecas de saturación de '377 se correlacionaban con un título de éster graso mejorado en todos los mutantes, mientras que la producción de β-OH-ésteres y éster de longitud de cadena más corta variaba de mutante a mutante. Por ejemplo, una sustitución del aminoácido en la posición 15 (de serina a glicina) cambió el título de FAME total desde el nivel inicial 1 hasta 2,402. Por tanto, el título aumentó en 2,4 veces en comparación con el nivel inicial (es decir, silvestre). En este mutante particular, los β-OH-ésteres aumentaron en aproximadamente 2,66 veces. La producción de ésteres con una longitud de cadena de carbono de 14 con respecto a ésteres con una longitud de cadena de carbono de 16 aumentó en 1,48 veces con respecto al nivel inicial (es decir, silvestre). Por otro lado, una sustitución de la posición de aminoácido 393 (glutamato a glicina) aumentó el título de FAME en 2,3 veces y disminuyó los β-OH-ésteres hasta el 70% del control mientras que la producción de ésteres C14/C16 permaneció aproximadamente igual.

| TABLA 1    |               |                      |         |
|------------|---------------|----------------------|---------|
| Mutaciones | Promedio      |                      |         |
|            | FAME<br>total | % de $\beta$ -<br>OH | C14/C16 |
| S15G       | 2.402         | 2.664                | 1.476   |
| Q26T       | 1.356         | 2.233                | 1.163   |
| L39M       | 1.64          | 2.82                 | 0.936   |
| L39S       | 2.228         | 2.368                | 1.127   |
| L39A       | 1.876         | 2.412                | 0.94    |
| R40S       | 1.328         | 2.587                | 1.259   |
| D41H       | 2.225         | 2.344                | 1.312   |
| D41G       | 2.031         | 3.474                | 1.217   |
| D41A       | 1.792         | 2.38                 | 2.074   |
| V43K       | 2.109         | 1.617                | 0.421   |
| V43S       | 1.768         | 2.283                | 1.053   |
| T44F       | 2.007         | 1.577                | 0.872   |
| A73Q       | 2.195         | 1.877                | 0.915   |
| V76L       | 1.553         | 1.255                | 0.76    |
| D77A       | 1.952         | 1.645                | 0.887   |
| K78W       | 1.758         | 1.469                | 0.826   |
| K78F       | 1.794         | 1.984                | 0.767   |
| I80V       | 2.961         | 2.903                | 1.028   |
| R93T       | 1.649         | 1.587                | 0.734   |
| G101L      | 1.787         | 1.294                | 1.288   |

|       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|
| I102R | 1.718 | 1.418 | 0.928 |
| N110R | 1.582 | 2.038 | 0.957 |
| P111S | 2.05  | 1.09  | 1.176 |
| P111G | 1.855 | 1.228 | 1.154 |
| G126D | 1.963 | 1.065 | 0.751 |
| R131M | 2.139 | 1.857 | 1.115 |
| V155G | 2.267 | 0.865 | 1.127 |
| N164R | 1.692 | 1.114 | 0.806 |
| V171R | 2.657 | 2.152 | 0.815 |
| V171E | 1.472 | 1.065 | 1.042 |
| R172W | 1.499 | 6.244 | 0.922 |
| D182G | 1.89  | 1.18  | 1.147 |
| E184L | 2.352 | 1.055 | 1.157 |
| E184F | 1.589 | 1.026 | 1.108 |
| E184S | 1.566 | 0.937 | 1.147 |
| E184R | 1.733 | 1.185 | 1.242 |
| E184G | 1.647 | 1.463 | 1.138 |
| A185M | 1.518 | 1.134 | 1.131 |
| A185L | 1.754 | 2.777 | 1.176 |
| P188R | 2.519 | 1.138 | 1.108 |
| A190R | 1.86  | 1.204 | 1.314 |
| A190W | 1.559 | 1.645 | 1.196 |
| S192V | 3.748 | 2.086 | 1.148 |
| S192A | 1.518 | 0.998 | 0.902 |
| Q193R | 1.735 | 1.2   | 1.344 |
| Q201W | 1.748 | 1.357 | 1.176 |
| Q201V | 1.79  | 1.289 | 1.32  |
| Q201A | 1.929 | 1.154 | 1.191 |
| A202L | 2.571 | 1.224 | 1.192 |
| D203R | 1.998 | 1.042 | 1.552 |
| P206F | 1.466 | 1.726 | 1.043 |
| G212L | 1.919 | 1.179 | 1.167 |
| V219L | 2.017 | 1.396 | 0.737 |
| T242R | 1.879 | 0.894 | 1.072 |
| T242K | 1.678 | 2.272 | 1.115 |
| A243R | 2.56  | 1.232 | 0.912 |
| R246Q | 3.571 | 0.692 | 0.412 |
| R246L | 2.083 | 0.746 | 0.711 |

|            |       |       |       |
|------------|-------|-------|-------|
| V272A      | 1.984 | 1.511 | 0.78  |
| Q287S      | 1.723 | 1.275 | 0.646 |
| D292F      | 1.827 | 1.162 | 0.814 |
| P294G      | 1.649 | 1.692 | 0.874 |
| G298G      | 1.511 | 1.383 | 0.796 |
| I303G      | 3.36  | 0.388 | 0.21  |
| I303W      | 2.075 | 0.578 | 0.58  |
| R304W      | 1.578 | 0.425 | 0.354 |
| F317W      | 2.208 | 2.076 | 1.529 |
| I319G      | 2.515 | 0.89  | 0.721 |
| A323G      | 1.766 | 1.188 | 0.751 |
| D328F      | 1.816 | 1.055 | 0.671 |
| Q334S      | 1.573 | 0.935 | 0.821 |
| Q348A      | 1.442 | 3.247 | 2.463 |
| P351G      | 1.875 | 1.211 | 1.312 |
| S353T      | 2.123 | 2.007 | 0.957 |
| M360W      | 2.303 | 0.634 | 0.582 |
| M360S      | 1.502 | 0.397 | 0.394 |
| Y366W      | 1.506 | 0.969 | 1.175 |
| Y366G      | 1.407 | 1.378 | 0.91  |
| G375A      | 1.96  | 1.821 | 1.24  |
| M378A      | 1.877 | 1.616 | 0.834 |
| E393G      | 2.305 | 0.723 | 0.932 |
| T395E      | 1.655 | 1.224 | 0.719 |
| V409L      | 2.314 | 0.796 | 0.295 |
| I420V      | 1.474 | 1.119 | 0.828 |
| S442G      | 1.947 | 1.166 | 1.226 |
| A447C      | 1.775 | 1.819 | 1.132 |
| A447L      | 1.545 | 1.341 | 1.021 |
| A447I      | 1.867 | 1.459 | 1.117 |
| L454V      | 1.804 | 1.137 | 0.672 |
| R2S, Q348A | 1.628 | 3.976 | 2.475 |
| R2R, S235S | 1.178 | 1.949 | 1.213 |
| G4R, N331G | 2.262 | 2.431 | 1.324 |
| T5P, S186T | 1.6   | 2.837 | 1.198 |
| T5S, R98D  | 2.287 | 2.01  | 1.277 |
| T5P, G310H | 1.711 | 2.141 | 1.217 |
| L6Q, Q193S | 1.529 | 2.069 | 2.878 |

|                           |       |       |       |
|---------------------------|-------|-------|-------|
| L6Q, A279V                | 1.414 | 3.573 | 1.003 |
| D7N, T170R                | 3.163 | 1.079 | 0.853 |
| G33S, S442E               | 2.28  | 1.453 | 1.199 |
| R150P, A279G              | 1.702 | 1.434 | 0.769 |
| E184G, K472T              | 2.619 | 1.022 | 1.269 |
| V187G, *474Y              | 1.678 | 1.481 | 1.028 |
| P188R, A197V              | 2.944 | 1.078 | 1.146 |
| M195G, A197T              | 1.291 | 4.127 | 1.223 |
| R207A, P366P              | 1.877 | 1.164 | 0.685 |
| D307V, T470P              | 1.858 | 1.094 | 1.026 |
| Repetición de 24pb        | 1.996 | 2.34  | 0.944 |
| Repetición de 24pb, R177V | 2.553 | 2.516 | 1.518 |
| Repetición de 24pb, V171R | 2.724 | 2.338 | 0.821 |

Algunas mutaciones en las tablas tienen asteriscos, por ejemplo, \*474Y, lo que significa que la posición tiene un codón de terminación.

- 5 Los solicitantes descubrieron una repetición de 24 pb en una de las secuencias de ácido nucleico mutantes variantes (es decir, SEQ ID NO: 28). La repetición de 24 pb es una duplicación de la región de ácido nucleico ATGAAACGTCTCGGAACCCTGGAC (SEQ ID NO: 27) y está ubicada al inicio del gen antes del codón de iniciación ATG. Por tanto, SEQ ID NO: 28 es una secuencia de ácido nucleico de '377 variante (esta secuencia es el resultado de SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 1 combinadas sin mutaciones adicionales) que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29. SEQ ID NO: 29 dio un título sorprendentemente bueno tal como se muestra en la
- 10 tabla 1. Sin embargo, se detectaron dos mutantes adicionales que incluían SEQ ID NO: 29 como secuencia de molde con mutaciones adicionales en la misma, en los que las mutaciones aumentaron el título incluso adicionalmente (véase la tabla 1). (La numeración de las mutaciones no incluye la repetición de 24 pb). Notablemente, la repetición de 24 pb condujo a un aumento en el título de FAS y el % de beta-OH-FAME, tal como se observa en la tabla 1 que representa el título obtenido cuando se expresa SEQ ID NO: 29 en una cepa huésped.
- 15 Tal como puede observarse en la tabla 2 a continuación, algunas de las mutaciones a partir de las bibliotecas de saturación de '377 se correlacionaban con una disminución en el % de  $\beta$ -OH-FAME mientras que todavía aumentaban el título de FAME total en un menor grado en comparación con la tabla 1 (anteriormente). Sin embargo, algunos mutantes disminuyeron significativamente el % de  $\beta$ -OH-FAME mientras que todavía aumentaban significativamente el título de FAME total.

| TABLA 2    |            |                  |         |
|------------|------------|------------------|---------|
|            | Promedio   |                  |         |
| Mutaciones | FAME total | % de $\beta$ -OH | C14/C16 |
| T24W       | 1.141      | 0.533            | 1.024   |
| V69W       | 1.154      | 0.661            | 0.657   |
| S105G      | 1.146      | 0.875            | 1.109   |
| P111D      | 1.271      | 0.802            | 0.822   |
| D113V      | 1.242      | 0.687            | 0.629   |
| D113A      | 1.279      | 0.740            | 0.580   |
| S115R      | 1.118      | 0.880            | 0.925   |
| C121S      | 1.088      | 0.756            | 0.969   |
| H122S      | 1.186      | 0.905            | 0.780   |
| L127G      | 1.455      | 0.644            | 0.507   |
| L134T      | 1.350      | 0.495            | 0.611   |
| T136G      | 1.090      | 0.591            | 0.472   |
| I146K      | 1.523      | 0.381            | 0.342   |
| I146R      | 1.328      | 0.199            | 0.220   |
| S147A      | 1.233      | 0.796            | 0.945   |
| T158R      | 1.694      | 0.749            | 0.855   |
| M165K      | 1.260      | 0.889            | 0.569   |
| V171H      | 1.168      | 0.677            | 0.902   |
| V171W      | 1.168      | 0.091            | 0.812   |
| R172S      | 1.590      | 0.505            | 0.897   |
| P173W      | 1.189      | 0.647            | 0.652   |
| S192L      | 1.215      | 0.898            | 1.176   |
| A228G      | 1.147      | 0.787            | 0.503   |
| V234C      | 1.059      | 0.185            | 0.775   |
| H239G      | 1.318      | 0.833            | 0.874   |
| Q244G      | 1.397      | 0.601            | 0.923   |
| R246W      | 1.191      | 0.312            | 0.323   |
| R246Q      | 3.571      | 0.692            | 0.412   |
| R246G      | 1.660      | 0.669            | 0.431   |
| R246V      | 1.130      | 0.454            | 0.838   |
| R246L      | 2.083      | 0.746            | 0.711   |
| R246A      | 1.470      | 0.757            | 0.559   |
| Q250W      | 1.061      | 0.850            | 0.860   |
| Q253G      | 1.186      | 0.772            | 0.877   |
| L254R      | 1.409      | 0.647            | 0.900   |
| L254T      | 1.089      | 0.704            | 0.868   |
| K258R      | 1.098      | 0.657            | 0.759   |
| S264D      | 1.220      | 0.876            | 0.549   |

|       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|
| S264V | 1.411 | 0.730 | 0.489 |
| S264W | 1.772 | 0.646 | 0.491 |
| G266S | 1.121 | 0.846 | 0.613 |
| S267G | 1.214 | 0.262 | 0.263 |
| Y274G | 1.115 | 0.789 | 0.556 |
| A285R | 1.273 | 0.864 | 0.893 |
| V301A | 1.500 | 0.755 | 0.440 |
| N302G | 1.355 | 0.254 | 0.182 |
| I303G | 3.360 | 0.388 | 0.210 |
| I303W | 2.075 | 0.578 | 0.580 |
| I303R | 1.257 | 0.373 | 0.857 |
| R304W | 1.578 | 0.425 | 0.354 |
| A306G | 1.103 | 0.808 | 1.164 |
| D307G | 1.079 | 0.645 | 1.095 |
| D307L | 1.197 | 0.817 | 1.279 |
| D307R | 1.537 | 0.679 | 0.848 |
| D307V | 1.273 | 0.585 | 0.984 |
| E309A | 1.190 | 0.544 | 0.775 |
| E309G | 1.392 | 0.735 | 0.667 |
| E309S | 1.249 | 0.730 | 0.768 |
| G310R | 1.801 | 0.886 | 1.146 |
| G310V | 1.098 | 0.732 | 0.879 |
| T311S | 1.163 | 0.634 | 0.297 |
| T313S | 1.208 | 0.587 | 0.903 |
| Q314G | 1.140 | 0.347 | 0.694 |
| I315F | 1.345 | 0.178 | 0.182 |
| S316G | 1.079 | 0.000 | 0.413 |
| A320C | 1.387 | 0.777 | 0.595 |
| A327I | 1.057 | 0.373 | 0.889 |
| K349C | 1.145 | 0.781 | 0.481 |
| K349Q | 1.105 | 0.637 | 0.693 |
| K349H | 1.243 | 0.663 | 0.458 |
| K349A | 1.200 | 0.484 | 0.472 |
| K352I | 1.207 | 0.576 | 0.418 |
| K352N | 1.084 | 0.783 | 0.679 |
| T356W | 1.153 | 0.345 | 0.727 |
| T356G | 1.135 | 0.688 | 1.019 |
| M360R | 1.238 | 0.375 | 0.487 |
| M360S | 1.502 | 0.397 | 0.394 |
| M360W | 2.303 | 0.634 | 0.582 |
| M360Q | 1.062 | 0.735 | 0.865 |

|                     |       |       |       |
|---------------------|-------|-------|-------|
| M363W               | 1.218 | 0.000 | 0.497 |
| P365G               | 1.102 | 0.611 | 0.376 |
| I367M               | 1.274 | 0.704 | 0.768 |
| M371R               | 1.297 | 0.073 | 0.554 |
| G373R               | 1.440 | 0.720 | 0.436 |
| G375S               | 1.146 | 0.609 | 0.816 |
| G375V               | 1.429 | 0.770 | 0.833 |
| T385G               | 1.215 | 0.875 | 0.609 |
| E393R               | 1.290 | 0.234 | 0.478 |
| E393W               | 1.768 | 0.817 | 0.852 |
| E393G               | 2.305 | 0.723 | 0.932 |
| E404K               | 1.350 | 0.762 | 0.603 |
| E404R               | 1.089 | 0.793 | 0.529 |
| V409L               | 2.314 | 0.796 | 0.295 |
| S410G               | 1.576 | 0.786 | 0.653 |
| L411A               | 1.274 | 0.735 | 1.060 |
| C422G               | 1.067 | 0.581 | 0.572 |
| S424G               | 1.755 | 0.538 | 0.657 |
| S424Q               | 1.268 | 0.395 | 0.629 |
| D455E               | 1.096 | 0.737 | 0.749 |
| E458W               | 1.428 | 0.654 | 0.503 |
| I461G               | 1.259 | 0.927 | 0.584 |
| K1T, L1_355_L3      | 1.183 | 0.874 | 0.732 |
| K1N, I146L          | 1.269 | 0.695 | 0.692 |
| L30H, K472*         | 1.054 | 0.872 | 1.139 |
| D41Y, D307F         | 1.604 | 0.664 | 0.633 |
| E99Q, D307N         | 1.610 | 0.801 | 0.969 |
| V149L, N430G        | 1.232 | 0.569 | 0.900 |
| R150P, A190P, E286H | 1.186 | 0.614 | 0.338 |
| V171F, R469R        | 1.085 | 0.619 | 0.713 |
| L457Y, R467T        | 1.111 | 0.544 | 0.594 |

## EJEMPLO 2

### Biblioteca de combinación preparada usando WS377 como molde

- Se emplearon técnicas convencionales para preparar bibliotecas de combinación (protocolo 8). Las mutaciones sometidas a prueba en bibliotecas de combinación (tablas 3A y 3B) se identificaron originalmente en la biblioteca de saturación completa de '377 (tal como se describe en el ejemplo 1). El plásmido usado para preparar las bibliotecas de combinación fue pKEV38, que se construyó eliminando la accABCD\_birA de pKEV027. Sin querer restringirse a la teoría, se cree que la eliminación de accABCD\_birA reduce los niveles intermedios de los ácidos grasos en la ruta de biosíntesis de manera que la afinidad de la enzima mutante por el sustrato puede detectarse más fácilmente. Se sembraron en placa las células en agar 2NBT + rojo Nilo (tabla 4). Se observaron las colonias usando el transiluminador Dark Reader DR88X a un intervalo de excitación de 400 nm-500 nm y un filtro ámbar permisivo a 580-620 nm, se recogieron a mano en LB+ espectinomicina 100 µg/ml, se hicieron crecer durante la noche y se examinaron usando uno de los protocolos convencionales (protocolos 1-2) descritos anteriormente. Tal como se muestra en la figura 4, una de las variantes de esta biblioteca mostró un aumento drástico en FAS con respecto al control (BD64/pKEV038, SEQ ID NO: 2). La figura 4 muestra los resultados de una fermentación en placa de aciertos de biblioteca de combinación. Varios aciertos de biblioteca tuvieron un mejor rendimiento que el control (es decir, BD64/pKEV038) mostrando que las variantes de '377 pueden soportar una alta producción de FAS. El plásmido de la variante con la mayor producción, denominado pSHU10 (que expresa la variante '377 de SEQ ID NO: 14), se aisló y se usó como molde para bibliotecas de combinación posteriores.

Se examinaron las bibliotecas de combinación en la cepa BD64 (anteriormente) usando uno de los protocolos convencionales (protocolos 1-2; anteriormente). Los resultados del examen de las bibliotecas de combinación de '377 se muestran en la tabla 5.

5 La tabla 3A a continuación muestra las sustituciones de aminoácidos que se introdujeron en la primera ronda de bibliotecas de combinación.

| TABLA 3           |                                                                                                                                                                |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Mutaciones</b> | T5S; S15G; G33S; L39S; L39A; D41A; V43K; I102R; P111S; R131M; V171R; P188R; S192V; Q201V; R246Q; R246L; I303W; I303G; F317W; I319G; S353T; E393G; V409L; S442G |

La tabla 3B a continuación muestra las sustituciones de aminoácidos que se introdujeron en la segunda ronda de bibliotecas de combinación.

| TABLA 3B   |              |              |              |              |              |              |
|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>K1T</b> | <b>G101L</b> | <b>R172S</b> | <b>D203R</b> | <b>A285R</b> | <b>A327I</b> | <b>T385G</b> |
| <b>K1N</b> | <b>I102R</b> | <b>R172W</b> | <b>P206F</b> | <b>E286H</b> | <b>D328F</b> | <b>E393G</b> |
| <b>G4R</b> | <b>S105G</b> | <b>P173W</b> | <b>R207A</b> | <b>Q287S</b> | <b>N331G</b> | <b>E393R</b> |
| <b>S5P</b> | <b>N110R</b> | <b>R177V</b> | <b>G212L</b> | <b>D292F</b> | <b>Q334S</b> | <b>E393W</b> |

|      |       |       |       |       |       |       |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| S5T  | SI11P | A179V | G212A | P294G | Q348A | T395E |
| L6Q  | SI11G | D182G | V219L | V301A | Q348R | E404K |
| D7N  | SI11D | E184L | A228G | N302G | K349C | E404R |
| G15S | D113V | E184G | V234C | I303W | K349Q | L409V |
| T24W | D113A | E184R | H239G | I303G | K349H | S410G |
| Q26T | SI15R | E184F | T242R | I303R | K349A | L411A |
| L30H | C121S | E184S | T242K | R304W | P351G | I420V |
| G33S | H122S | A185L | A243R | A306G | K352I | C422G |
| L39A | G126D | A185M | Q244G | D307F | K352N | S424G |
| L39M | L127G | S186T | R246Q | D307N | T353S | S424Q |
| L39S | R131M | V187G | R246L | D307G | T356G | N430G |
| R40S | L134T | V187R | R246G | D307L | T356W | G442S |
| D41A | T136G | R188P | R246W | D307R | Q357V | G442E |
| D41H | I146K | A190R | R246V | D307V | M360R | M443G |
| D41G | I146R | A190P | R246A | E309A | M360W | A447C |
| D41Y | I146L | A190W | Q250W | E309G | M360S | A447L |
| V43K | S147A | S192V | Q253G | E309S | M360Q | A447I |
| V43S | V149L | S192L | L254R | G310R | M363W | L454V |
| T44F | R150P | S192A | L254T | G310H | P365G | D455E |
| V69W | V155G | Q193S | K258R | G310V | Y366W | L457Y |
| A73Q | T158R | Q193R | S264D | T311S | Y366G | E458W |
| V76L | N164R | M195G | S264V | T313S | I367M | I461G |
| D77A | M165K | A197V | S264W | Q314G | M371R | R467T |
| K78W | T170R | A197T | G266S | I315F | G373R | K472T |
| K78F | R171V | L200R | S267G | S316G | G375S | K472* |
| I80V | R171H | Q201V | V272A | W317F | G375V |       |
| R93T | R171E | Q201W | Y274G | I319G | G375A |       |
| R98D | R171F | Q201A | A279G | A320C | M378A |       |
| E99Q | R171W | A202L | A279V | A323G | V381F |       |

La tabla 4 a continuación muestra los nombres de medios y formulaciones que se usaron.

| TABLA 4                  |             |       |                                                     |
|--------------------------|-------------|-------|-----------------------------------------------------|
| Nombre del medio         | Formulación |       |                                                     |
| Agar 2NBT +<br>rojo Nilo | 1           | X     | Dis. sal. de P-lim con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ |
|                          | 1           | mg/ml | Tiamina                                             |
|                          | 1           | mM    | $\text{MgSO}_4$                                     |
|                          | 1           | mM    | $\text{CaCl}_2$                                     |

| TABLA 4 |     |       |                                                                          |
|---------|-----|-------|--------------------------------------------------------------------------|
|         | 30  | g/L   | glucosa                                                                  |
|         | 1   | X     | TM2                                                                      |
|         | 5   | g/L   | casaminoácidos                                                           |
|         | 15  | g/L   | Agarosa                                                                  |
|         | 2%  |       | Metanol                                                                  |
|         | 0.5 | mg/L  | Rojo Nilo                                                                |
|         | 10  | mg/L  | Citrato de Fe                                                            |
|         | 100 | mg/L  | espectinomicina                                                          |
|         | 100 | mM    | BisTris (pH7.0)                                                          |
| BS1G4P  | 1   | X     | Disol. sal. de P-lim con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |
|         | 1   | mg/ml | Tiamina                                                                  |
|         | 1   | mM    | MgSO <sub>4</sub>                                                        |
|         | 0.1 | mM    | CaCl <sub>2</sub>                                                        |
|         | 10  | g/L   | glucosa                                                                  |
|         | 1   | X     | TM2                                                                      |
|         | 10  | mg/L  | Citrato de Fe                                                            |
|         | 100 | μg/mL | espectinomicina                                                          |
|         | 100 | mM    | BisTris (pH7.0)                                                          |
| BP3G2P  | 0.5 | X     | Disol. sal. de P-lim con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |
|         | 1   | mg/ml | Tiamina                                                                  |
|         | 1   | mM    | MgSO <sub>4</sub>                                                        |
|         | 0.1 | mM    | CaCl <sub>2</sub>                                                        |
|         | 50  | g/L   | glucosa                                                                  |
|         | 1   | X     | TM2                                                                      |
|         | 10  | mg/L  | Citrato de Fe                                                            |
|         | 100 | μg/mL | espectinomicina                                                          |
|         | 100 | mM    | BisTris (pH7.0)                                                          |
|         | 2.5 | g/L   | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                          |
|         | 2%  |       | MeOH                                                                     |
|         | 1   | mM    | IPTG                                                                     |
| FA2P    | 1   | X     | Disol. sal. de P-lim                                                     |
|         | 2   | g/L   | NH <sub>4</sub> Cl                                                       |
|         | 1   | mg/ml | Tiamina                                                                  |
|         | 1   | mM    | MgSO <sub>4</sub>                                                        |
|         | 0.1 | mM    | CaCl <sub>2</sub>                                                        |
|         | 30  | g/L   | glucosa                                                                  |
|         | 1   | X     | TM2                                                                      |

| TABLA 4                                                                                   |       |       |                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|----------------------|
| FA4P                                                                                      | 10    | mg/L  | Citrato de Fe        |
|                                                                                           | 100   | mM    | BisTris (pH7.0)      |
|                                                                                           | 0.5   | X     | Disol. sal. de P-lim |
|                                                                                           | 2     | g/L   | NH <sub>4</sub> Cl   |
|                                                                                           | 1     | mg/ml | Tiamina              |
|                                                                                           | 1     | mM    | MgSO <sub>4</sub>    |
|                                                                                           | 0.1   | mM    | CaCl <sub>2</sub>    |
|                                                                                           | 50    | g/L   | glucosa              |
|                                                                                           | 1     | X     | TM2                  |
|                                                                                           | 10    | mg/L  | Citrato de Fe        |
|                                                                                           | 100   | mM    | BisTris (pH7.0)      |
| FA2 (NH <sub>4</sub> Cl 2 g/l)<br>para examen en<br>placa de 96<br>pocillos               | 1     | X     | Disol. sal.          |
|                                                                                           | 1     | g/L   | NH <sub>4</sub> Cl   |
|                                                                                           | 1     | mg/ml | Tiamina              |
|                                                                                           | 1     | mM    | MgSO <sub>4</sub>    |
|                                                                                           | 0.1   | mM    | CaCl <sub>2</sub>    |
|                                                                                           | 30    | g/L   | glucosa              |
|                                                                                           | 1     | X     | TM2                  |
|                                                                                           | 10    | mg/L  | Citrato de Fe        |
|                                                                                           | 100   | mM    | BisTris (pH7.0)      |
| FA2 (NH <sub>4</sub> Cl 2 g/l)<br>con Triton para<br>validación en<br>frasco de agitación | 1     | X     | Disol. sal.          |
|                                                                                           | 1     | g/L   | NH <sub>4</sub> Cl   |
|                                                                                           | 1     | mg/ml | Tiamina              |
|                                                                                           | 1     | mM    | MgSO <sub>4</sub>    |
|                                                                                           | 0.1   | mM    | CaCl <sub>2</sub>    |
|                                                                                           | 30    | g/L   | glucosa              |
|                                                                                           | 1     | X     | TM2                  |
|                                                                                           | 10    | mg/L  | Citrato de Fe        |
|                                                                                           | 0.05% |       | Triton X-100         |
|                                                                                           | 100   | mM    | BisTris (pH7.0)      |

La tabla 5 a continuación representa el examen secundario, que muestra las mutaciones con respecto a pSHU10 (que contiene las mutaciones T5S, S15G, P111S, V171R, P188R, F317W, S353T, V409L, S442G) y los resultados de CG-FID normalizados. Los resultados representados son relativos al control (es decir, pSHU10, SEQ ID NO: 14).

5 Cada línea en la tabla representa un mutante de combinación diferente que se preparó. Se midieron todos los mutantes para que tuviesen distintas propiedades para que o bien afectaran a los FAME totales producidos, los FAS totales producidos, el tanto por ciento de FAME producidos, o bien las especies de éster en la composición final (con longitud de cadena C12/C14 o C14/C16), o una combinación de estas propiedades. Tal como puede observarse en la tabla 5, algunos mutantes se comportaron de manera similar a otros mutantes en cuanto a sus propiedades.

10 Por ejemplo, tal como se muestra en la primera línea en la tabla 5 a continuación, el mutante que contiene las

mutaciones A190P, N302G, T313S y Q348R produjo un tanto por ciento de FAME superior (y reducción de  $\beta$ -OH-FAME), y también aumentó la producción de ésteres de longitud de cadena C14/C16, lo que significa que produjo más ésteres C14 que ésteres C16 en el producto final. Esto es deseable puesto que los ésteres de cadena más corta pueden usarse para muchos productos incluyendo biodiesel. Los resultados también muestran que los solicitantes pudieron alterar la longitud de cadena final de especies de éster en la composición final.

Las siguientes combinaciones de mutaciones se refieren a los resultados mostrados en el presente documento; su rendimiento es en relación con el control (pSHU10; SEQ ID NO: 14). KASH008 (SEQ ID NO: 16) aumentó el % de FAME en 1,4 veces, mientras que aumentó el título en 1,06 veces. KASH032 (SEQ ID NO: 18) aumentó el % de FAME en 1,29 veces, mientras que afectó al título. KASH040 (SEQ ID NO: 20) aumentó el % de FAME en 1,16 veces, mientras que el título disminuyó hasta 0,91 veces el control. KASH078 (SEQ ID NO: 26) aumentó el % de FAME en 1,25 veces, mientras que disminuyó los títulos hasta 0,76 del control. KASH060 (SEQ ID NO: 22) y KASH061 (SEQ ID NO: 24) son de especial interés porque afectaron no sólo al % de FAME, sino que también produjeron productos de cadena de éster significativamente más corta, tal como se muestra por un aumento en C12/C14 (6,8 veces para KASH060 y 3,1 veces para KASH061) y C14/C16 (4,0 veces para KASH060 y 3,2 veces para KASH061).

| TABLA 5                                        |            |           |           |         |         |
|------------------------------------------------|------------|-----------|-----------|---------|---------|
| Mutación                                       | FAME total | FAS total | % de FAME | C12/C14 | C14/C16 |
| A190P, N302G, T313S, Q348R                     | 0.545      | 0.475     | 1.146     | 0.945   | 1.486   |
| A190P, S264V, A327I, Q348A                     | 0.444      | 0.807     | 0.556     | 2.441   | 3.171   |
| A197T, V219L, R467L                            | 0.409      | 0.473     | 0.865     | 1.491   | 1.821   |
| A197V, Q250W, G442S                            | 0.663      | 0.647     | 1.024     | 1.130   | 1.610   |
| A228G, D328F, L409V                            | 0.922      | 1.385     | 0.701     | 1.254   | 1.918   |
| A279V, K472T                                   | 0.904      | 1.286     | 0.732     | 0.643   | 1.733   |
| A327I                                          | 0.682      | 0.923     | 0.738     | 1.225   | 2.259   |
| A327I, Q348R, V381F, I420V                     | 0.473      | 0.974     | 0.485     | 2.536   | 3.363   |
| A73Q, G101L, H122S, R172S, Q201W, Q357V        | 0.947      | 0.881     | 1.103     | 0.448   | 1.539   |
| A73Q, G101L, H122S, V187G, Q201V, N331G, A447L | 0.530      | 0.525     | 1.009     | 0.838   | 1.651   |
| A73Q, H122S, V187G, Q201A, V234C, G375S,       | 0.484      | 0.390     | 1.242     | 0.647   | 1.231   |

| TABLA 5                                              |       |       |       |       |       |
|------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A447L                                                |       |       |       |       |       |
| A73Q, Q201W, I315F, G375V, A447I                     | 0.437 | 0.350 | 1.242 | 0.081 | 0.951 |
| C121S, A228G, A279V, K472*                           | 0.912 | 0.989 | 0.962 | 0.799 | 1.389 |
| C121S, H122Q, S147A, L200R                           | 0.654 | 0.608 | 1.122 | 0.244 | 1.164 |
| C121S, R171H, I303R                                  | 0.901 | 0.805 | 1.199 | 2.550 | 1.812 |
| C121S, S147A                                         | 1.016 | 1.172 | 0.945 | 2.072 | 1.144 |
| D113V, E184F, G212L, H239G, V272A, T395E, N430G      | 0.528 | 0.506 | 1.044 | 1.278 | 1.557 |
| D113V, E184F, N430G, I461G                           | 0.818 | 0.784 | 1.042 | 0.923 | 1.411 |
| D113V, E184R, D203E, D307N, N430G, I461G             | 0.918 | 0.957 | 0.965 | 0.867 | 1.652 |
| D307F                                                | 0.991 | 1.122 | 0.886 | 0.835 | 1.563 |
| D307N                                                | 0.379 | 0.393 | 0.973 | 1.675 | 1.700 |
| D328F, K472T                                         | 1.068 | 1.580 | 0.742 | 2.931 | 1.740 |
| D328F, T356G, L409V, A468T, K472T                    | 0.971 | 1.303 | 0.772 | 0.786 | 1.645 |
| D41G, Q193R, Q244G, G310V, Y366G, S424G              | 0.669 | 0.569 | 1.176 | 0.000 | 0.576 |
| D41H, I80V, D182G, Q193S, R207A, S267G, G310V, S424Q | 0.535 | 0.414 | 1.296 | 1.056 | 0.598 |
| D41Y, I80V, A320C                                    | 0.579 | 0.558 | 1.043 | 1.109 | 1.219 |
| D41Y, N110R, Q193S, Y366W                            | 0.641 | 1.214 | 0.528 | 1.179 | 2.665 |
| D455E                                                | 0.671 | 0.842 | 0.800 | 1.188 | 2.183 |
| D77A, A190W, T242K, N302G, T313S                     | 0.560 | 0.436 | 1.285 | 2.048 | 0.554 |
| D77A, L127G, V155G, A190R, D455E                     | 0.304 | 0.237 | 1.292 | 0.670 | 1.216 |
| D77A, L127G, V155G, V381F                            | 0.699 | 0.646 | 1.084 | 1.291 | 1.415 |
| D77A, N302G, T313S, Q348R, M363W, V381F, I420V       | 0.357 | 0.300 | 1.192 | 7.037 | 1.598 |
| D77A, S105G, A190P                                   | 0.593 | 0.657 | 0.925 | 1.077 | 1.678 |
| D77A, T170M, R177V, T242R, S264D                     | 0.832 | 1.206 | 0.689 | 1.095 | 1.851 |
| D77A, V155G, A190P, T242K                            | 0.640 | 0.589 | 1.088 | 1.105 | 1.726 |
| D7N, D41Y, R207A, G310V, Y366G                       | 0.762 | 0.649 | 1.174 | 0.886 | 0.767 |
| D7N, N164R, D182G, R207A, G310R, P351G, S424Q, T470A | 0.509 | 0.405 | 1.258 | 0.000 | 0.391 |
| D7N, Q193R, Y366W, E393G, S424Q, E458G               | 0.655 | 0.603 | 1.086 | 1.653 | 0.719 |
| D7N, Q193R, Y366W, E393G, S424Q, E458W               | 0.658 | 0.561 | 1.172 | 0.637 | 0.538 |
| E184F, A323G, T395E, I461G                           | 0.960 | 1.009 | 0.952 | 0.868 | 1.404 |
| E184G, I461G                                         | 0.994 | 1.164 | 0.854 | 0.829 | 1.631 |
| E184G, M195G, G212A, T311S, N430G, I461G             | 0.870 | 0.933 | 0.932 | 0.809 | 1.705 |
| E184L, M195G, G212A, H239G, T311S, K352I             | 0.769 | 0.654 | 1.178 | 0.943 | 1.229 |
| E184R, I461G                                         | 0.375 | 0.438 | 0.857 | 0.930 | 2.234 |
| E184S, G212A, V272A, I367M, I461G                    | 0.707 | 0.635 | 1.118 | 1.175 | 1.660 |
| E184S, G212L, H239G, K352N, I461G                    | 0.734 | 0.763 | 0.964 | 1.112 | 1.735 |
| E458W                                                | 0.894 | 1.126 | 0.794 | 1.125 | 1.692 |
| E99Q, A228G, A279G, I303R, L409V, K472T              | 0.788 | 0.709 | 1.193 | 2.434 | 1.496 |
| E99Q, C121S, T356G, K472T                            | 1.360 | 1.552 | 0.946 | 2.043 | 1.292 |
| E99Q, I303W, T356G, K472T                            | 1.286 | 1.260 | 1.096 | 1.966 | 1.049 |
| E99Q, R171V, M443G                                   | 0.734 | 0.790 | 0.971 | 0.805 | 1.602 |
| E99Q, S147A, R171W, L200R, K472*                     | 1.019 | 1.540 | 0.696 | 1.224 | 1.863 |
| G101L, G375A, S410G                                  | 0.642 | 0.577 | 1.113 | 0.604 | 0.973 |
| G101L, H122S, V187R, G375S, A447I                    | 0.280 | 0.237 | 1.187 | 0.520 | 1.544 |
| G101L, Q201V, I315F, G375V, A447L                    | 0.481 | 0.400 | 1.199 | 0.730 | 1.359 |
| G126D, A202L, A306G, S316G, M360S                    | 0.528 | 0.410 | 1.286 | 0.248 | 0.549 |
| G126D, A306G, M360W                                  | 0.443 | 0.353 | 1.258 | 0.000 | 0.972 |

| TABLA 5                                                    |       |       |       |       |       |
|------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| G126D, M378A                                               | 0.489 | 0.456 | 1.076 | 0.364 | 1.146 |
| G126D, R188P, A306G, M360W                                 | 0.526 | 0.439 | 1.207 | 0.000 | 1.109 |
| G15S, D113A, E184G, T395E, N430G, I461G                    | 0.921 | 0.865 | 1.065 | 0.867 | 1.348 |
| G15S, E184G, G212A, K352N, I461G                           | 1.006 | 1.045 | 0.962 | 0.856 | 1.465 |
| G15S, E184L, H239G, V272A, I461G                           | 0.788 | 0.701 | 1.124 | 1.109 | 1.713 |
| G15S, E184L, T311S, K352N, I461G                           | 0.769 | 0.646 | 1.193 | 1.202 | 1.150 |
| G15S, H239G, I461G                                         | 0.465 | 0.468 | 0.995 | 1.504 | 1.768 |
| G15S, I461G                                                | 1.159 | 1.314 | 0.883 | 0.819 | 1.431 |
| G15S, M165K, E184F, G212A                                  | 0.649 | 0.767 | 0.846 | 1.151 | 1.541 |
| G15S, M165K, E184S, A323G, I367M, N430G, I461G             | 0.554 | 0.484 | 1.145 | 1.915 | 1.062 |
| G15S, M195G, H239G, I461G                                  | 0.783 | 0.698 | 1.120 | 1.166 | 1.523 |
| G15S, R93T, T136G, G212L, H239G, I461G                     | 0.594 | 0.528 | 1.125 | 0.788 | 1.466 |
| G15S, V272A, I461G                                         | 0.536 | 0.468 | 1.144 | 1.304 | 1.875 |
| G212A, D307F, K352N, I461G                                 | 0.794 | 0.693 | 1.146 | 1.172 | 1.432 |
| G33S, I102R                                                | 0.777 | 1.150 | 0.675 | 0.742 | 1.702 |
| G33S, I102R, M360W, M378A                                  | 0.577 | 0.528 | 1.101 | 0.298 | 1.542 |
| G33S, L454V                                                | 0.459 | 0.577 | 0.797 | 0.844 | 2.063 |
| G33S, P173R, R188P, R246P, A306G                           | 0.414 | 0.354 | 1.168 | 0.449 | 2.310 |
| G33S, R188P, M360S, L454V                                  | 0.466 | 0.378 | 1.232 | 0.139 | 1.564 |
| G33S, R246V, A306G, M360R                                  | 0.597 | 0.457 | 1.306 | 0.000 | 0.599 |
| G33S, T470S                                                | 0.680 | 1.044 | 0.654 | 0.792 | 1.749 |
| G373R                                                      | 1.159 | 1.332 | 0.943 | 2.117 | 1.109 |
| G375S, A447I                                               | 0.765 | 0.863 | 0.886 | 0.753 | 1.631 |
| G442E                                                      | 0.566 | 0.688 | 0.824 | 0.944 | 1.738 |
| G4R, G33S, G126D, P173S, R188P, R246V, Q334S, M360W, L411P | 0.524 | 0.400 | 1.311 | 0.000 | 0.382 |
| G4R, P173W, Q175E, R246Q, K258R, M360S                     | 0.171 | 0.133 | 1.286 | 0.000 | 0.434 |
| G4R, R188P, R246Q                                          | 0.603 | 0.500 | 1.209 | 0.000 | 1.093 |
| H122S, G375S                                               | 0.482 | 0.405 | 1.193 | 0.717 | 1.483 |
| H122S, I315F                                               | 0.461 | 0.423 | 1.091 | 0.724 | 1.575 |
| H122S, L254T, N331G                                        | 0.436 | 0.371 | 1.173 | 0.441 | 1.113 |
| H122S, Q201V                                               | 0.522 | 0.898 | 0.590 | 0.741 | 4.476 |
| H122S, R172S, Q201W, A447I                                 | 0.567 | 0.496 | 1.140 | 1.294 | 2.362 |
| H122S, V187R, L254T, N331G                                 | 0.389 | 0.329 | 1.176 | 0.357 | 1.554 |
| H122S, V234C, L254R, I315F                                 | 0.456 | 0.365 | 1.242 | 0.101 | 1.069 |
| H239G, K352I, T395E, I461G                                 | 0.795 | 0.703 | 1.131 | 1.024 | 1.636 |
| H239G, T311S, K352N, I461G                                 | 0.913 | 0.782 | 1.168 | 1.066 | 1.125 |
| I102L, R246W, K258R, A306G, M360R, L411A, L454V            | 0.559 | 0.464 | 1.205 | 0.000 | 0.493 |
| I102R, P173W, A202L, Q334S, M360R                          | 0.495 | 0.405 | 1.225 | 0.175 | 0.795 |
| I102R, R246A, Q334S, M360R                                 | 0.580 | 0.451 | 1.286 | 0.000 | 0.519 |
| I102R, R246L, K258R, A306G, M360R, L411A, L454V            | 0.664 | 0.517 | 1.286 | 0.000 | 0.360 |
| I102R, R246Q, K258R, M360S                                 | 0.709 | 0.448 | 1.502 | 0.052 | 0.194 |
| I102R, R246W, L454V                                        | 0.772 | 0.668 | 1.157 | 0.000 | 0.940 |
| I146K, V219L, D307N                                        | 0.357 | 0.305 | 1.170 | 2.470 | 1.551 |
| I146K, V219L, D307N, G442S                                 | 0.356 | 0.286 | 1.248 | 3.212 | 0.932 |
| I146L, A185L, D307R, G442S                                 | 0.358 | 0.276 | 1.294 | 2.393 | 0.529 |
| I146L, V219L, D307R, G442S                                 | 0.361 | 0.284 | 1.272 | 4.822 | 0.565 |
| I146R, A197T, D307G                                        | 0.281 | 0.221 | 1.274 | 4.844 | 0.902 |

| TABLA 5                                              |       |       |       |       |       |
|------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| I146R, A197T, D307N, G442E                           | 0.315 | 0.255 | 1.234 | 3.768 | 1.213 |
| I303R, D328F                                         | 0.619 | 0.531 | 1.212 | 1.228 | 1.882 |
| I303W                                                | 1.192 | 1.188 | 1.088 | 1.898 | 1.235 |
| I315F                                                | 0.529 | 0.483 | 1.099 | 0.715 | 1.406 |
| I315F, N331G, G375S, A447C                           | 0.606 | 0.532 | 1.135 | 0.389 | 1.283 |
| I420V                                                | 0.567 | 0.864 | 0.656 | 1.033 | 2.097 |
| I461G                                                | 0.914 | 1.151 | 0.794 | 0.770 | 1.821 |
| K472T                                                | 0.974 | 1.088 | 0.894 | 1.215 | 1.442 |
| K78F, R131M, S192V, G266S, K349H                     | 0.754 | 0.540 | 1.327 | 0.660 | 0.537 |
| K78F, S192V, A243R, K349H                            | 1.501 | 1.055 | 1.417 | 0.695 | 0.629 |
| K78W, S111G, C422G                                   | 0.788 | 0.538 | 1.387 | 0.839 | 0.495 |
| L127G, A190W, D203R, A327I, I420V, D455E             | 0.547 | 0.565 | 0.968 | 1.198 | 1.590 |
| L127G, A190W, S264D, V381F                           | 0.292 | 0.260 | 1.124 | 0.994 | 1.950 |
| L134T                                                | 0.745 | 1.165 | 0.639 | 1.364 | 2.156 |
| L200R, A228G, M443G                                  | 0.537 | 0.569 | 0.980 | 0.610 | 1.696 |
| L200R, A228G, T356W, G373R                           | 1.224 | 1.167 | 1.126 | 1.326 | 0.904 |
| L200R, I303R, Q314G, T356G                           | 1.280 | 1.092 | 1.163 | 0.651 | 0.703 |
| L30H, Q201V, V234C, G265D, R304W, G375V              | 0.271 | 0.217 | 1.242 | 0.784 | 0.696 |
| L30H, R304W, I315F                                   | 0.507 | 0.397 | 1.282 | 0.626 | 0.650 |
| L30H, V187G, Q201V, L254T, I315F, Q357V, G375V       | 0.456 | 0.353 | 1.294 | 0.746 | 0.710 |
| L30H, V234C, S410G, A447L                            | 0.862 | 1.035 | 0.833 | 1.022 | 1.401 |
| L39A, D77A, S105G, V155G, T242K, V381F, T470S        | 0.595 | 0.557 | 1.071 | 4.219 | 1.897 |
| L39A, D77A, T242R, S264D, A327I, M363W, D455E        | 0.392 | 0.307 | 1.276 | 0.332 | 0.710 |
| L39A, L127G, A190W, T242R, S264V, V381F, D455E       | 0.382 | 0.313 | 1.221 | 0.000 | 1.181 |
| L39A, T313S, Q348R, V381F                            | 0.434 | 0.547 | 0.794 | 2.921 | 1.846 |
| L39M, D77A, L127G, A190W, T313S                      | 0.437 | 0.366 | 1.200 | 0.158 | 1.553 |
| L39M, D77A, S105G, V155G, S264V, A327I, Q348R, D455E | 0.542 | 0.628 | 0.862 | 2.186 | 2.129 |
| L39M, L127G, A190R, D203R, Q348R, M363W, I420V       | 0.462 | 0.469 | 0.987 | 1.428 | 1.732 |
| L39M, L127G, A190W, V381F, D455E                     | 0.490 | 0.591 | 0.836 | 1.222 | 2.070 |
| L39M, R177V, A190R, I420V                            | 0.428 | 0.565 | 0.768 | 1.079 | 1.827 |
| L39M, R177V, A190W, S264D, N302G, A327I              | 0.544 | 0.424 | 1.285 | 0.000 | 0.902 |
| L39M, S105G, A190P, T242R, T313S, M363W              | 0.954 | 0.819 | 1.163 | 0.549 | 0.790 |
| L39M, S105G, L127G, A190W, D203R, Q348R              | 0.480 | 0.525 | 0.917 | 8.297 | 2.700 |
| L39S, A190P, T242R, N302G, T313S, A327I, Q348R       | 0.500 | 0.389 | 1.276 | 0.000 | 0.787 |
| L39S, R177V, D203R, T242R, S264D, A327I, M363W       | 0.485 | 0.411 | 1.181 | 0.000 | 1.013 |
| L39S, S105G, R177V, N302G, A327I, V381F              | 0.324 | 0.255 | 1.269 | 0.000 | 0.980 |
| L39S, V155G, A190P, A327I, Q348R, V381F              | 0.239 | 0.287 | 0.837 | 1.552 | 2.340 |
| L39S, V155G, A190R, T242R, S264D, A327I, Q348R       | 0.419 | 0.431 | 0.976 | 1.159 | 1.695 |
| L411A                                                | 0.828 | 1.016 | 0.764 | 1.327 | 0.522 |
| L454V                                                | 0.799 | 1.000 | 0.798 | 0.572 | 1.528 |
| L6Q, K78W, S111G, T158R, S192L, E309S, L457Y         | 0.167 | 0.104 | 1.526 | 0.000 | 0.282 |

| TABLA 5                                                    |       |       |       |        |        |
|------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|
| L6Q, K78W, S111P, R131M, A243R, G266S, C422G               | 1.111 | 0.728 | 1.445 | 0.458  | 0.253  |
| L6Q, R40S, S192A, K349Q, T385G, C422G                      | 0.786 | 0.496 | 1.500 | 0.027  | 0.171  |
| M165K, E184L, I461G                                        | 0.672 | 0.594 | 1.133 | 1.490  | 1.269  |
| M165K, I367M, I461G                                        | 0.544 | 0.471 | 1.155 | 1.572  | 1.386  |
| M360Q                                                      | 0.844 | 0.961 | 0.880 | 0.227  | 1.282  |
| M360Q, L454V                                               | 0.259 | 0.219 | 1.236 | 0.000  | 11.652 |
| M360S                                                      | 0.596 | 0.548 | 1.090 | 0.159  | 0.956  |
| M360S, M378A, L411A                                        | 0.596 | 0.514 | 1.160 | 0.000  | 1.039  |
| M363W, V381F, D455E                                        | 0.711 | 1.021 | 0.697 | 14.861 | 2.109  |
| M378A                                                      | 0.525 | 0.554 | 0.947 | 0.553  | 1.676  |
| M378A, L411A                                               | 0.626 | 0.727 | 0.860 | 0.482  | 1.566  |
| N110R, L134T, N164R, Q193R                                 | 0.526 | 0.805 | 0.655 | 1.535  | 1.835  |
| N164R, G310V, P351G, S424Q, A468T                          | 0.615 | 0.519 | 1.186 | 1.215  | 0.870  |
| N331G                                                      | 0.630 | 0.667 | 0.942 | 0.811  | 1.503  |
| P173W, R246V                                               | 0.515 | 0.393 | 1.311 | 0.000  | 0.880  |
| P294G, G310H, A320C, P351G, E393G, S424G                   | 0.585 | 0.454 | 1.289 | 1.376  | 0.633  |
| Q193R, G310H, E458W                                        | 0.778 | 0.909 | 0.864 | 1.161  | 1.435  |
| Q193R, P351G, E393W, S424Q, E458W                          | 0.552 | 0.449 | 1.228 | 0.000  | 0.873  |
| Q193S, Q244G, G310H, P351G, E458W                          | 0.789 | 0.727 | 1.085 | 1.045  | 1.192  |
| Q193S, Q244G, P294G, G310R, S424G                          | 0.764 | 0.637 | 1.199 | 1.015  | 0.859  |
| Q201A, G375S, S410G, A447L                                 | 0.930 | 0.964 | 0.959 | 0.792  | 1.251  |
| Q201A, I315F, G375A, A447L                                 | 0.527 | 0.464 | 1.139 | 1.059  | 1.250  |
| Q201A, R304W, S410G                                        | 0.508 | 0.402 | 1.265 | 0.708  | 0.831  |
| Q201V, I315F, A447I                                        | 0.622 | 0.591 | 1.047 | 1.053  | 1.398  |
| Q201V, I315F, G375S, A447C                                 | 0.652 | 0.568 | 1.149 | 0.739  | 0.981  |
| Q201W, R304W, S410G                                        | 0.643 | 0.524 | 1.227 | 0.669  | 0.837  |
| Q244G, G310R, A320C, P351G, S424Q                          | 0.664 | 0.534 | 1.245 | 1.226  | 0.610  |
| Q244G, G310V, P351G, Y366W, E458W                          | 0.849 | 0.892 | 0.951 | 1.220  | 1.673  |
| Q244G, P294G, G310H, P351G, Y366W, E393W, S424G            | 0.507 | 0.457 | 1.108 | 1.205  | 1.023  |
| Q244G, S267G, G310V, A320C, Y366W                          | 1.052 | 0.905 | 1.161 | 0.820  | 0.649  |
| Q244G, Y366G, S424Q                                        | 0.601 | 0.491 | 1.224 | 0.895  | 0.724  |
| Q26P, R171E, A228G, L268F                                  | 0.540 | 0.964 | 0.635 | 4.918  | 3.527  |
| Q26T, C121S                                                | 0.740 | 0.886 | 0.837 | 0.599  | 1.366  |
| Q26T, C121S, R171F, A228G, K472*                           | 0.892 | 0.973 | 0.996 | 1.552  | 1.839  |
| Q26T, C121S, R171W, A228G, K472*                           | 0.542 | 0.553 | 0.983 | 1.047  | 2.189  |
| Q26T, E99Q, R171W, I303W                                   | 0.618 | 0.563 | 1.184 | 0.529  | 1.472  |
| Q26T, E99Q, S147T, R171V, S186T, I303G, K472T              | 0.285 | 0.316 | 0.958 | 2.050  | 2.607  |
| Q26T, K472*                                                | 0.826 | 1.343 | 0.618 | 0.880  | 2.071  |
| Q26T, L200R, I303R, K472*                                  | 0.909 | 1.148 | 0.825 | 0.997  | 1.672  |
| Q26T, Q314G                                                | 1.151 | 1.386 | 0.830 | 0.921  | 1.448  |
| Q26T, R171E, I303W, K472T                                  | 0.618 | 0.602 | 1.054 | 0.527  | 1.840  |
| Q26T, R171F, Q253G, T356G                                  | 0.890 | 1.075 | 0.831 | 1.079  | 1.930  |
| Q26T, R171H, S186T, I303G, K472T                           | 0.709 | 0.697 | 1.064 | 0.780  | 1.558  |
| Q26T, R171V, A228G, I303R, K472T                           | 0.792 | 0.995 | 0.807 | 1.668  | 2.166  |
| Q26T, S147A, R171E, I303R                                  | 0.632 | 0.614 | 1.027 | 0.844  | 1.988  |
| Q26T, V69L, E99Q, C121S, R171L, A228G, I303W, Q314R, D328F | 0.479 | 0.460 | 1.130 | 0.000  | 1.484  |
| Q26T, V69W, C121S                                          | 0.671 | 0.608 | 1.097 | 0.383  | 1.046  |

| TABLA 5                                         |       |       |       |       |       |
|-------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Q26T, V69W, E99Q, A279G, T356G, K472*           | 0.771 | 0.712 | 1.077 | 0.454 | 0.984 |
| Q26T, V69W, E99Q, K472*                         | 0.685 | 0.694 | 1.019 | 0.565 | 1.141 |
| Q26T, V69W, E99Q, R171F, D328F                  | 0.650 | 0.549 | 1.174 | 0.071 | 1.241 |
| Q26T, V69W, S186T, L200R, I303W                 | 1.307 | 1.374 | 1.030 | 1.840 | 0.943 |
| Q348R                                           | 0.447 | 0.961 | 0.467 | 2.033 | 3.548 |
| Q348R, M363W                                    | 0.647 | 1.004 | 0.646 | 1.613 | 2.385 |
| R171F, I303W                                    | 0.883 | 0.741 | 1.236 | 0.407 | 1.274 |
| R171F, M443G                                    | 0.557 | 0.450 | 1.228 | 0.494 | 1.719 |
| R171F, Q314G, G373R                             | 0.710 | 0.573 | 1.251 | 0.424 | 1.208 |
| R171H, S186T, A228G, I303G, D328F               | 0.594 | 0.479 | 1.230 | 0.432 | 1.791 |
| R171V, L200R, Q253G, I303W, M443G, K472T        | 0.961 | 0.804 | 1.186 | 0.339 | 1.358 |
| R171V, L200R, T356W, G373R, K472T               | 0.800 | 0.930 | 0.957 | 2.087 | 1.442 |
| R171W, I303W, K472*                             | 0.864 | 0.765 | 1.175 | 1.049 | 1.629 |
| R171W, K472T                                    | 0.897 | 1.313 | 0.712 | 0.975 | 2.490 |
| R172S, V187G                                    | 0.557 | 0.609 | 0.945 | 1.058 | 1.874 |
| R172S, V187G, Q201W, R304W                      | 0.639 | 0.529 | 1.211 | 0.691 | 1.149 |
| R172W, V234C, A447L                             | 0.544 | 0.848 | 0.646 | 1.245 | 2.495 |
| R188P                                           | 0.583 | 0.648 | 0.897 | 0.491 | 1.794 |
| R188P, A202L, R246G, K258R, Q334S, M360R        | 0.416 | 0.317 | 1.311 | 0.000 | 0.512 |
| R188P, A202L, S316G, M360Q                      | 0.513 | 0.401 | 1.286 | 0.000 | 1.088 |
| R188P, L411A                                    | 0.526 | 0.539 | 0.979 | 0.672 | 1.468 |
| R207A, Q244G, P294G, Y366W, E393W, S424G        | 0.873 | 0.751 | 1.161 | 0.932 | 0.952 |
| R246L, K258R, M360R, L454V, A468S               | 0.521 | 0.397 | 1.311 | 0.000 | 0.390 |
| R246V, A306G, M360R, L411V, L454V               | 0.743 | 0.566 | 1.311 | 0.000 | 0.419 |
| R246V, K258R, M360R                             | 0.590 | 0.520 | 1.143 | 0.000 | 0.778 |
| R304W, I315F                                    | 0.422 | 0.330 | 1.280 | 0.977 | 0.648 |
| R467T                                           | 0.440 | 0.526 | 0.848 | 1.399 | 1.791 |
| R87W, K349Q, C422G                              | 0.349 | 0.217 | 1.522 | 0.333 | 0.281 |
| R93T, E184F, I461G                              | 0.474 | 0.491 | 0.974 | 1.611 | 1.770 |
| R93T, G212A, K352I, I461G                       | 0.869 | 0.917 | 0.955 | 0.999 | 1.782 |
| R93T, I461G                                     | 1.124 | 1.474 | 0.762 | 0.791 | 1.740 |
| R98D, I146K, T170R, A185L, D307L, R467T         | 0.354 | 0.292 | 1.208 | 3.175 | 1.166 |
| R98D, I146L, A185M, A197V, Q250W, D307G         | 0.312 | 0.253 | 1.236 | 3.559 | 1.030 |
| R98D, I146R, T170R, D307F, T353S                | 0.331 | 0.271 | 1.224 | 3.074 | 1.073 |
| S105G, A190P, Q348R                             | 0.415 | 0.616 | 0.831 | 1.917 | 2.888 |
| S105G, A190P, S264D, M363W                      | 0.403 | 0.311 | 1.295 | 0.000 | 1.122 |
| S105G, L127G                                    | 0.413 | 0.358 | 1.155 | 0.438 | 1.411 |
| S105G, L127G, D203R, T242R, A327I, Q348A, V381F | 0.364 | 0.446 | 0.818 | 2.635 | 2.283 |
| S105G, L127G, T242K, Q348A, I420V               | 0.320 | 0.313 | 1.024 | 1.097 | 1.840 |
| S105G, V155G, A190P, T242K                      | 0.555 | 0.446 | 1.244 | 1.520 | 1.507 |
| S105G, V155G, R177V, A190W, T242R, Q348A        | 0.464 | 0.488 | 0.950 | 3.447 | 1.568 |
| S111G, E309A, C422G                             | 1.407 | 0.951 | 1.402 | 0.605 | 0.299 |
| S111P, S192L, E309S, K349Q                      | 1.111 | 0.858 | 1.230 | 0.681 | 0.399 |
| S115R, I146R, D307F, R467T                      | 0.325 | 0.255 | 1.272 | 5.998 | 0.542 |
| S147A, A228G, A279V, K472*                      | 0.920 | 1.143 | 0.806 | 0.887 | 1.905 |
| S147A, D328F, G373R, K472T                      | 0.883 | 0.822 | 1.120 | 0.245 | 1.198 |
| S147A, I303R, D328F, K472*                      | 0.400 | 0.349 | 1.232 | 2.937 | 2.254 |

| TABLA 5                                                                  |       |       |       |        |       |
|--------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|--------|-------|
| S147A, R171E, A279G, I303W                                               | 0.624 | 0.546 | 1.187 | 1.400  | 1.972 |
| S147A, R171E, I303R, T356G                                               | 0.980 | 1.052 | 1.008 | 4.987  | 2.253 |
| S147A, S186T, I303R, D328F                                               | 0.504 | 0.428 | 1.226 | 0.819  | 1.923 |
| S147A, T356G                                                             | 0.669 | 0.751 | 0.901 | 0.660  | 1.404 |
| S186T, A228G, T231S                                                      | 0.662 | 0.914 | 0.760 | 0.610  | 2.169 |
| S192A, L457Y                                                             | 0.612 | 0.654 | 0.916 | 0.962  | 1.490 |
| S264D, A327I                                                             | 0.612 | 0.729 | 0.840 | 1.113  | 1.916 |
| S264D, Q348R, M363W, V381F, D455E                                        | 0.483 | 0.905 | 0.536 | 2.198  | 3.734 |
| S264V, A327I, D455E                                                      | 0.768 | 0.960 | 0.800 | 1.008  | 1.472 |
| S264W                                                                    | 0.690 | 0.804 | 0.855 | 0.584  | 1.686 |
| S316G, L411A, L454V                                                      | 0.606 | 0.525 | 1.155 | 0.000  | 0.842 |
| S5P, D77A, S105G, A190P, S264W, N302G, Q348A, I420V                      | 0.329 | 0.259 | 1.267 | 0.669  | 1.892 |
| S5P, D77A, V155G, A190R, T242K, N302G, A327I, A426V                      | 0.435 | 0.328 | 1.326 | 0.000  | 0.976 |
| S5P, D77A, V155G, S264D, A327I, I420V                                    | 0.501 | 0.474 | 1.078 | 0.695  | 1.865 |
| S5P, D77A, V155G, S264V, A327I                                           | 0.885 | 1.117 | 0.788 | 1.552  | 1.805 |
| S5P, G15D, L39S, A190R, S264D, Q348R, V381F                              | 0.482 | 1.085 | 0.444 | 2.533  | 3.606 |
| S5P, L39A, D77A, A190W, D203R, S264W, N302G, A327I, Q348A, I420V         | 0.752 | 0.721 | 1.039 | 1.437  | 1.514 |
| S5P, L39A, D77A, V155G, A190P, T242K, L268M                              | 0.652 | 0.770 | 0.849 | 1.549  | 1.840 |
| S5P, L39A, V155G, A190W, T242R, N302G, T313S, A320C, Q348A               | 0.591 | 0.580 | 1.019 | 2.749  | 1.365 |
| S5P, L39A, V155G, Q348R, I420V                                           | 0.496 | 1.177 | 0.421 | 2.953  | 3.910 |
| S5P, L39M, D77A, A190P, T242K, S264D, Q348R, M363W, I420V                | 0.610 | 0.602 | 1.013 | 0.874  | 1.485 |
| S5P, L39M, D77A, S105G, A190P, S264W, Q348A                              | 0.359 | 0.568 | 0.799 | 2.419  | 2.998 |
| S5P, L39M, G50S, D77A, V155G, A190P, T242R, S264D, A327I, V381F, D455E   | 0.600 | 0.599 | 0.996 | 1.610  | 1.898 |
| S5P, L39M, S264D, I420V, D455E                                           | 0.604 | 0.643 | 0.939 | 1.494  | 3.014 |
| S5P, L39M, V155G, A190W, D203R, T242R, S264W, N302G, T313S, Q348A, R469L | 0.549 | 0.490 | 1.172 | 3.399  | 1.640 |
| S5P, L39S, D77A, V155G, A190P, T242K, M363W, V381F                       | 0.486 | 0.393 | 1.238 | 0.000  | 1.277 |
| S5P, L39S, S105G, A190R, N302G, M363W                                    | 0.441 | 0.339 | 1.295 | 0.000  | 0.472 |
| S5P, R177V, D203R, T242R, S264D, N302G, A327I, Q348A, M363W, I420V       | 0.592 | 0.498 | 1.182 | 1.497  | 1.203 |
| S5P, S264V, Q348A, I420V                                                 | 0.261 | 0.432 | 0.605 | 2.409  | 2.984 |
| S5P, S264W, N302G, T313S                                                 | 0.469 | 0.365 | 1.285 | 0.000  | 0.524 |
| S5P, V155G, S264V, G265D                                                 | 0.622 | 0.525 | 1.183 | 0.827  | 1.540 |
| S5P, V381F                                                               | 0.503 | 1.148 | 0.437 | 15.293 | 3.054 |
| S5T                                                                      | 0.876 | 1.151 | 0.761 | 2.978  | 1.548 |
| S5T, A190W, T242K, V381F                                                 | 0.476 | 0.555 | 0.859 | 2.342  | 1.950 |
| S5T, D77A                                                                | 0.722 | 0.804 | 0.899 | 0.508  | 1.186 |
| S5T, D77A, S105G, V155G, A190R, S264D                                    | 0.640 | 0.508 | 1.261 | 9.479  | 1.589 |
| S5T, D77A, V155G, N302G, A327I                                           | 0.399 | 0.306 | 1.303 | 1.174  | 0.961 |
| S5T, L127G, A190R, V381F                                                 | 0.405 | 0.382 | 1.080 | 3.787  | 2.108 |
| S5T, L127G, A327I, Q348A, D455E                                          | 0.485 | 0.736 | 0.656 | 2.040  | 2.847 |

| TABLA 5                                                     |       |       |       |       |       |
|-------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| S5T, L39A, A190P, S264D, A327I, Q348A, V381F, D455E         | 0.486 | 0.750 | 0.647 | 2.195 | 2.743 |
| S5T, L39A, L127G, A190P, D203R, Q348R                       | 0.347 | 0.352 | 0.986 | 0.000 | 1.415 |
| S5T, L39A, L127G, D203R                                     | 0.704 | 0.665 | 1.055 | 0.283 | 1.068 |
| S5T, L39M, A190P, D203R, S264W, N302G, I420V                | 0.463 | 0.356 | 1.295 | 0.000 | 0.425 |
| S5T, L39M, D77A, S105G, S264W, N302G, T313S, Q348R, V381F   | 0.614 | 0.508 | 1.211 | 0.000 | 0.794 |
| S5T, L39M, L127G, A190R, T242K, A327I, Q348R, V381F         | 0.442 | 0.477 | 0.922 | 2.084 | 1.958 |
| S5T, L39M, L127G, D203R, T242R, Q348R, V381F                | 0.592 | 0.832 | 0.708 | 1.814 | 2.556 |
| S5T, L39M, R177V, A190P, T242R                              | 0.511 | 0.522 | 0.978 | 2.163 | 3.546 |
| S5T, L39S, D77A, A190P                                      | 0.620 | 0.634 | 0.976 | 0.000 | 1.243 |
| S5T, L39S, D77A, S264V, Q348R, V381F, I420V                 | 0.476 | 0.483 | 0.978 | 0.000 | 1.463 |
| S5T, L39S, D77A, T313S, Q348A, V381F, I420V                 | 0.377 | 0.733 | 0.518 | 3.052 | 3.172 |
| S5T, L39S, D77A, V155G, A190P, N302G, Q348R, V381F          | 0.394 | 0.306 | 1.284 | 0.886 | 1.282 |
| S5T, N302G                                                  | 0.621 | 0.490 | 1.269 | 0.166 | 0.692 |
| S5T, S105G, A190P, S264D, Q348A                             | 0.445 | 0.603 | 0.741 | 2.077 | 2.668 |
| S5T, T242K, N302G, V381F                                    | 0.486 | 0.383 | 1.269 | 0.000 | 0.836 |
| S5T, V155G, N302G, A327I, Q348A, D455E                      | 0.470 | 0.372 | 1.255 | 3.417 | 1.789 |
| S5T, V155G, N302G, Q348R                                    | 0.497 | 0.391 | 1.269 | 2.115 | 1.577 |
| S5T, V155G, P166S, Q348A, V381F                             | 0.314 | 0.651 | 0.479 | 6.776 | 3.952 |
| T170R, T353S, E404R                                         | 0.733 | 0.992 | 0.744 | 0.913 | 2.173 |
| T24W, D307N, G442E                                          | 0.353 | 0.331 | 1.067 | 2.003 | 1.690 |
| T24W, D307N, T353S, E404K, G442S                            | 0.746 | 0.659 | 1.132 | 1.526 | 1.666 |
| T24W, R98D, A185L, A197V, D307V                             | 0.404 | 0.336 | 1.201 | 2.744 | 1.495 |
| T24W, R98D, A185M, A197T, D307L                             | 0.363 | 0.329 | 1.102 | 2.617 | 1.579 |
| T24W, R98D, A197T, D307G                                    | 0.426 | 0.363 | 1.172 | 2.189 | 1.579 |
| T24W, R98D, S115R, I146L, A197V, V219L, T353S, G442E, R467T | 0.904 | 0.732 | 1.235 | 2.231 | 1.040 |
| T24W, T170R, A197T, D307L, T311S, G442S                     | 0.913 | 0.745 | 1.227 | 1.561 | 1.357 |
| T24W, T44F, I146L, D307N                                    | 0.947 | 0.755 | 1.254 | 2.211 | 1.086 |
| T24W, T44F, R98D, A185L, R467T                              | 0.376 | 0.335 | 1.128 | 2.119 | 1.709 |
| T24W, T44F, R98D, T170R, A185L, V219L, R467T                | 0.400 | 0.392 | 1.023 | 2.218 | 1.768 |
| T311S, A323G, I367M                                         | 0.505 | 0.446 | 1.133 | 1.633 | 1.220 |
| T311S, K352N, T395E, N430G, I461G                           | 0.807 | 0.736 | 1.096 | 1.059 | 1.506 |
| T313S, I420V                                                | 0.800 | 1.036 | 0.772 | 0.877 | 1.459 |
| T44F, D307F                                                 | 0.496 | 0.529 | 0.948 | 1.440 | 1.705 |
| T44F, I146R, A197T, G442E, R467T                            | 0.356 | 0.316 | 1.127 | 2.923 | 1.128 |
| T44F, I146R, Q287S, D307R, G442S                            | 0.826 | 0.649 | 1.274 | 1.907 | 0.450 |
| T44F, R98D, A185M, G442E                                    | 0.604 | 0.717 | 0.844 | 1.168 | 1.904 |
| T44F, R98D, I146R, A197T, D307G, T311S, T353S, G442E        | 0.350 | 0.274 | 1.272 | 4.569 | 0.678 |
| T44F, R98D, S115R, A197T                                    | 0.717 | 0.715 | 1.003 | 1.045 | 1.417 |
| T44F, S115R, A185M, A197V, D307N, E404R                     | 0.609 | 0.593 | 1.040 | 1.139 | 1.301 |
| T44F, S115R, I146R, A197T, V219L, D307F                     | 0.266 | 0.205 | 1.294 | 3.144 | 0.518 |

| TABLA 5                                  |       |       |       |        |       |
|------------------------------------------|-------|-------|-------|--------|-------|
| V149L, I315F, A447C                      | 0.533 | 0.422 | 1.263 | 0.929  | 1.104 |
| V149L, Q201W, A285R, Q357V, A447C        | 0.505 | 0.406 | 1.245 | 0.962  | 0.731 |
| V155G, A190P                             | 0.517 | 0.471 | 1.097 | 1.254  | 1.680 |
| V155G, A190P, S264V, Q348R, I420V        | 0.371 | 0.376 | 0.989 | 17.841 | 2.093 |
| V155G, A190W, S264D, I420V, D455E        | 0.802 | 0.851 | 0.943 | 3.273  | 1.703 |
| V155G, D203R, N302G, I420V               | 0.792 | 0.608 | 1.295 | 1.038  | 0.969 |
| V155G, M363W                             | 0.628 | 0.517 | 1.216 | 10.265 | 1.556 |
| V155G, V381F, I420V, D455E               | 0.408 | 0.554 | 0.880 | 1.907  | 2.389 |
| V187G, I315F, G375A, A447L               | 0.606 | 0.539 | 1.126 | 0.960  | 1.331 |
| V187G, Q201R, V234C, I315F, Q357V, A447I | 0.556 | 0.465 | 1.190 | 0.270  | 1.186 |
| V187G, Q201V, L254R, A285R, S410G, A447L | 0.535 | 0.538 | 1.006 | 0.510  | 1.467 |
| V187G, Q201W, I315F, Q357V, A447I        | 0.545 | 0.492 | 1.114 | 0.484  | 1.801 |
| V187R, Q201V, I315F, G375A               | 0.377 | 0.305 | 1.229 | 0.161  | 0.809 |
| V187R, Q201V, L254R, R304W, N331G, G375A | 0.516 | 0.413 | 1.242 | 0.376  | 0.768 |
| V219L                                    | 0.327 | 0.347 | 0.952 | 1.786  | 1.657 |
| V234C, I315F, Q357V, G375V               | 0.542 | 0.441 | 1.225 | 0.090  | 1.181 |
| V381F, I420V                             | 0.617 | 1.147 | 0.538 | 1.503  | 2.596 |
| V43S, M165K, E184S, G212A                | 0.957 | 1.228 | 0.779 | 0.809  | 1.414 |
| V43S, N430G                              | 0.888 | 1.429 | 0.623 | 0.800  | 2.242 |
| V43S, R93T, E184S, T395V, I461G          | 0.809 | 0.785 | 1.029 | 1.010  | 1.450 |
| V69W                                     | 0.702 | 0.709 | 0.990 | 0.304  | 1.214 |
| V69W, C121S, R171E, K472*                | 0.719 | 0.742 | 1.015 | 1.734  | 2.123 |
| V69W, C121S, S147A                       | 1.407 | 1.333 | 1.131 | 0.448  | 0.887 |
| V69W, C121S, S186T, A279G, K472*         | 1.286 | 1.225 | 1.126 | 0.959  | 1.033 |
| V69W, E99Q, Q253G, A279G, K472T          | 1.161 | 1.142 | 1.034 | 0.453  | 1.051 |
| V69W, Q314G                              | 0.684 | 0.593 | 1.200 | 0.298  | 0.847 |
| V69W, R171E, S186T, I303W                | 0.915 | 0.763 | 1.190 | 0.691  | 1.652 |
| V69W, R171E, S186T, I303W, K472*         | 0.933 | 0.838 | 1.193 | 1.431  | 1.585 |
| V69W, R171W                              | 1.147 | 1.263 | 0.983 | 3.002  | 1.738 |
| V76L, K258R, S316G, M360R                | 0.713 | 0.555 | 1.286 | 0.000  | 0.657 |
| V76L, L454V                              | 0.736 | 1.056 | 0.698 | 0.814  | 1.770 |
| V76L, R246L, Q334S, M360R                | 0.511 | 0.407 | 1.258 | 0.393  | 0.485 |
| Y366G                                    | 0.720 | 0.907 | 0.793 | 1.015  | 1.657 |

### EJEMPLO 3

#### Cepas mutantes de éster sintasa con propiedades beneficiosas.

5 Tal como se describe en los ejemplos 1 y 2, se identificaron varias formas variantes o mutantes de '377 con propiedades beneficiosas. En este experimento, un mutante de '377 particular designado en el presente documento 9B12 (SEQ ID NO: 4), que contiene tres mutaciones diferentes con respecto a 377 silvestre (D7N, A179V, V381F), se clonó en pKEV027, reemplazando al gen de '377 silvestre (SEQ ID NO: 1) que codifica para el polipéptido de '377 silvestre (SEQ ID NO: 2) y creando pKEV018. Cuando se transformó en la cepa BD64 (anteriormente), se creó la cepa KEV040. El plásmido pKEV018 se mutó adicionalmente usando mutagénesis de saturación en el codón 348 del gen (codón de iniciación=0) para producir el plásmido pKEV022, que contiene cuatro mutaciones diferentes con respecto a '377 silvestre (D7N, A179V, Q348R, V381F). Por separado, se combinaron varias mutaciones identificadas previamente con el plásmido pKEV018 para producir el plásmido pKEV028 (que contiene ocho mutaciones con respecto a '377 silvestre (D7N, R87R "mutación silenciosa", A179V, V187R, G212A, Q357V, V381F, M443G). Se transformaron pKEV022 y pKEV028 en la cepa BD64, lo que dio como resultado las cepas designadas KEV075 (SEQ ID NO: 10) y KEV085 (SEQ ID NO: 12), respectivamente. Se observó que estas cepas mutantes producían o bien un aumento significativo en el título de FAME o bien una reducción en el porcentaje de "β-OH"-FAME o ambos (por ejemplo, las cepas mutantes 9B12 y KEV085 lograron ambos).

20 Se examinaron las cepas KEV080 (BD64/pKEV027); KEV040; KEV075 y KEV085 usando uno de los protocolos convencionales (protocolos 1-2) descritos anteriormente. La figura 5 muestra los títulos de FAME relativos y el % de β-OH-FAME de las cepas mutantes KEV040, KEV075 y KEV085 en comparación con una cepa que contiene éster sintasa de '377 silvestre. En el presente documento, la figura 5 ilustra que se observó que las tres variantes tenían un título de FAME significativamente superior al control (silvestre); que el % de β-OH-FAME variaba de una variante

a otra; y que las cepas 9B12 (KEV040) y KEV085 producían menos % de  $\beta$ -OH-FAME que el control (silvestre).

#### EJEMPLO 4

Producción de ésteres por células huésped recombinantes modificadas por ingeniería genética para expresar una éster sintasa de '377 variante y una Ppro variante

- 5 Tal como se demuestra en los ejemplos 1, 2 y 3, se modificó por ingeniería genética una éster sintasa de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (WS377) para que produjera niveles superiores de ésteres de ácidos grasos y un porcentaje inferior de  $\beta$ -OH-ésteres. Al llevar a cabo la presente divulgación, se modificó por ingeniería genética WS377 silvestre (SEQ ID NO: 1) dando como resultado nuevas cepas, tales como 9B12, que producen niveles superiores de FAME directamente a partir de acil-ACP.
- 10 Se modificó por ingeniería genética la 'tesA de *Photobacterium profundum* (Ppro) para que tuviese actividad éster sintasa. Se sometió a prueba una variante de Ppro Vc7P6F9 (SEQ ID NO: 31) en el plásmido pBD207 en BD64 (designada en el presente documento becos.128). De manera similar, se sometió a prueba la variante 9B12 de '377 (SEQ ID NO: 4) en pKEV18 en BD64 (designada en el presente documento KEV040). Se sometieron a prueba cultivos de becos.128 (BD64/pBD207) y KEV040 (BD64/pKEV018) en medios mínimos con el 2% de alcohol. Tras la
- 15 producción durante aproximadamente 24 horas, se extrajeron y se analizaron mediante CG/FID o CG/EM para la identificación del éster de acilo graso (siguiendo los protocolos enumerados anteriormente).

La figura 6 muestra la producción de ésteres de acilo graso a partir de KEV040 (éster sintasa de *M. hydrocarbonoclasticus*) (mostrada como cera en la figura 6) y especies de ácidos grasos a partir de becos.128 ('tesA de *P. profundum*) (mostrada como Ppro en la figura 6) cuando se alimentaron metanol, etanol, 1-propanol, isopropanol, 1-butanol o glicerol. Como control negativo, se añadió agua (la falta de alcohol exógeno significa que cualquier producción de éster se basaría en la producción endógena de alcohol por *E. coli*). Mientras que no se produjeron ácidos grasos por KEV040, becos.128 produjo una mezcla de ésteres de ácidos grasos y ácidos grasos. La figura 8 muestra las cantidades de ésteres de ácidos grasos y ácidos grasos producidos por becos.128. Debe indicarse que los resultados *in vitro* presentados en Holtzapple y Schmidt-Dannert (véase Journal of Bacteriology (2007) 189(10):3804-3812) mostraron que la éster sintasa de *M. hydrocarbonoclasticus* ('377) tiene una preferencia por alcoholes de cadena más larga produciendo principalmente ceras. Los datos de Holtzapple sugieren que '377 no podría usar alcoholes de cadena más corta. En cambio, el trabajo de los solicitantes se realizó *in vivo* y estableció que la enzima de '377 variante puede utilizar alcoholes de cadena más corta (C1, C2, C3 y C4), conduciendo a ésteres de cadena más corta que pueden usarse para una variedad de productos valiosos (por ejemplo, biodiesel, tensioactivos, etc.). Los solicitantes usaron acil-ACP como sustrato, lo que se cree que provoca una reducción de la implicación del ciclo fútil (es decir, hace que la célula sea más eficiente energéticamente). Además, los solicitantes mostraron que no todos los alcoholes necesitan tener el grupo OH en la posición 1, por ejemplo, el grupo OH para el propanol podría estar en la posición 1 ó 2. La figura 6 muestra la producción de ésteres de acilo graso con diversas longitudes de cadena usando una célula huésped recombinante modificada genéticamente para expresar una única éster sintasa de '377 variante. Se observó este resultado para formas modificadas por ingeniería genética de tanto una variante de tesA de *P. profundum* (Ppro) como una variante de la éster sintasa de '377. Merece la pena destacar que los mutantes modificados por ingeniería genética pueden convertir no sólo alcoholes primarios sino también alcoholes secundarios en una variedad de diferentes productos, incluyendo FAME, FAEE, monoglicéridos de acilo graso, y otros. Pueden usarse bacterias, levaduras, algas u otras células huésped recombinantes para la producción de ésteres grasos.

#### EJEMPLO 5

Cepas mutantes de éster sintasa que expresan mutantes de combinación

- Se usaron técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica para preparar bibliotecas de combinación (protocolo 8). Las mutaciones sometidas a prueba en bibliotecas de combinación (tablas 3A y 3B) se identificaron originalmente en la biblioteca de saturación completa de '377 (tal como se describe en el ejemplo 1).

Se examinaron las bibliotecas de combinación en la cepa GLPH077 que es similar a BD64 pero expresaba niveles ligeramente diferentes de enzimas de la ruta de biosíntesis (anteriormente) y usando uno de los protocolos convencionales (protocolos 1-2) (anteriormente). Los resultados del examen de bibliotecas de combinación de pKASH008 (SEQ ID NO: 16) se muestran en la tabla 6. Tal como puede observarse en la tabla 6, las variantes de éster sintasa de '377 resultantes tenían 24 mutaciones en comparación con 377 silvestre. Se usaron dos cepas, KASH280 (SEQ ID NO: 33) y KASH281 (SEQ ID NO: 35) para someter a prueba la variante de '377. Sin embargo, KASH280 expresó una variante de '377 que difería de la expresada en KASH280 en una mutación de sustitución. KASH280 expresó una variante de '377 en la que se intercambió una glutamina en la posición 348 por una arginina (Q348R), permitiendo que la cepa produjera un título superior de FAME y un mayor número de ésteres de cadena corta. A la inversa, KASH281 expresó una variante de '377 en la que se intercambió una lisina en la posición 349 por una histidina (K349H), conduciendo a que la cepa produjera un título inferior de FAME en comparación con KASH008. Además, KASH281 produjo un título inferior de FAME y un menor número de ésteres de cadena corta en comparación con KASH280. Globalmente, la comparación es con KASH008, que es mejor que pSHU10, que es

mejor que el silvestre (véanse los ejemplos anteriores).

| TABLA 6 |                                                                                                                                                                            |                                                  |            |           |           |         |         |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------|-----------|-----------|---------|---------|
| Cepa    | Mutaciones con respecto al tipo silvestre                                                                                                                                  | N.º de mutaciones con respecto al tipo silvestre | FAME total | FAS total | % de FAME | C12/C14 | C14/C16 |
| KASH280 | T5S, S15G, K78F, P111S, V171R, P188R, S192V, R207A, A243R, D255E, L257I, N259Q, L260V, H262Q, G265N, A285V, N288D, N289G, F317W, <b>Q348R</b> , S353T, V381F, V409L, S442G | 24                                               | 1.59       | 0.66      | 0.42      | 1.65    | 2.36    |
| KASH281 | T5S, S15G, K78F,                                                                                                                                                           | 24                                               | 0.80       | 0.87      | 0.92      | 1.38    | 1.22    |
|         | P111S, V171R, P188R, S192V, R207A, A243R, D255E, L257I, N259Q, L260V, H262Q, G265N, A285V, N288D, N289G, F317W, <b>K349H</b> , S353T, V381F, V409L, S442G                  |                                                  |            |           |           |         |         |

#### EJEMPLO 6

##### 5 Cepas mutantes de éster sintasa con propiedades beneficiosas a partir de diversidad natural

Tal como se describe en los ejemplos 1 y 2, se identificaron varias formas variantes o mutantes de '377 con propiedades beneficiosas. Se usó una alineación del polipéptido de éster sintasa de diferentes organismos de *Marinobacter*, tales como *Marinobacter adhaerens* HP15 (YP\_005886638.1, SEQ ID NO: 45), *Marinobacter algicola* DG893 (ZP\_01893763.1, SEQ ID NO: 47), *Marinobacter sp.* ELB17 (ZP\_01736818.1, SEQ ID NO: 49) con el de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798 (SEQ ID NO: 2) usando procedimientos de alineación convencionales para identificar mutaciones que ya existen en la naturaleza, ya que esto revelaría mutaciones específicas así como posiciones de aminoácido que tienen de manera natural diversidad y, por tanto, podrían usarse para estabilizar la proteína variante. Se llevó a cabo la alineación y el análisis identificó diversidad natural dentro de los polipéptidos homólogos de éster sintasa. La tabla 7 a continuación ilustra un resumen de un grupo de mutaciones de este tipo. Cuando se combinan esas mutaciones con una éster sintasa modificada por ingeniería genética de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, pueden observarse variantes beneficiosas si se examinan usando uno de los protocolos convencionales (protocolos 1-2) descritos anteriormente. Se describen ejemplos de tales variantes como SEQ ID NO: 37, 39, 41 y 43.

La tabla 7 a continuación muestra una lista de diversidad natural observada alineando *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *M. adhaerens*, *M. algicola* y *M. sp.* ELB17.

TABLA 7

| Posición AA | Mutación | M. adhaerens | M. algicola | M. sp. ELB17 |
|-------------|----------|--------------|-------------|--------------|
| 24          | T24N     | X            | X           | X            |
| 33          | G33D     |              |             | X            |
| 33          | G33N     |              | X           |              |

| Posición AA | Mutación | M. adhaerens | M. algicola | M. sp. ELB17 |
|-------------|----------|--------------|-------------|--------------|
| 236         | V236A    |              | X           |              |
| 236         | V236K    | X            |             | X            |
| 237         | L237I    | X            |             | X            |

|     |       |   |   |   |
|-----|-------|---|---|---|
| 44  | T44K  |   |   | X |
| 44  | T44A  |   | X |   |
| 48  | E48Q  |   |   | X |
| 48  | E48A  |   | X |   |
| 49  | A49D  |   | X |   |
| 49  | A49T  | X |   |   |
| 58  | Y58C  |   |   | X |
| 58  | Y58L  | X |   |   |
| 70  | I70V  |   | X |   |
| 70  | I70L  | X |   | X |
| 73  | A73S  |   | X |   |
| 73  | A73T  |   |   | X |
| 73  | A73G  | X |   |   |
| 79  | D79K  | X | X |   |
| 79  | D79H  |   |   | X |
| 123 | V123I |   | X |   |
| 123 | V123M |   |   | X |
| 157 | T157S |   | X | X |
| 158 | T158E |   | X |   |
| 158 | T158K |   |   | X |
| 161 | E161G |   | X |   |
| 161 | E161D | X |   | X |
| 162 | R162E |   | X | X |
| 162 | R162K | X |   |   |
| 163 | C163I |   | X |   |
| 163 | C163R | X |   | X |
| 164 | N164D | X |   | X |
| 166 | P166L |   | X | X |
| 170 | T170S | X | X | X |
| 174 | H174E | X | X | X |
| 175 | Q175R | X | X |   |
| 175 | Q175S |   |   | X |
| 176 | R176T |   | X | X |
| 179 | A179S | X | X |   |
| 179 | A179K |   |   | X |
| 183 | K183S | X | X | X |
| 189 | A189G | X |   | X |
| 191 | V191L |   | X |   |
| 191 | V191I |   |   | X |
| 196 | D196E | X | X | X |
| 212 | G212M |   | X |   |
| 212 | G212S |   |   | X |
| 216 | V216I |   | X | X |

|     |       |   |   |   |
|-----|-------|---|---|---|
| 243 | A243G | X | X | X |
| 255 | D255E |   | X | X |
| 257 | L257I | X | X |   |
| 257 | L257M |   |   | X |
| 259 | N259Q |   | X |   |
| 259 | N259A |   |   | X |
| 259 | N259E | X |   |   |
| 260 | L260V |   | X |   |
| 260 | L260M |   |   | X |
| 262 | H262Q |   | X |   |
| 262 | H262R |   |   | X |
| 263 | A263V | X |   |   |
| 265 | G265N |   | X |   |
| 266 | G266S |   |   | X |
| 266 | G266A | X |   |   |
| 285 | A285V |   | X |   |
| 285 | A285L | X |   | X |
| 288 | N288D |   | X | X |
| 289 | N289G |   | X |   |
| 289 | N289E | X |   |   |
| 293 | T293I |   |   | X |
| 293 | T293A | X |   |   |
| 306 | A306S | X | X |   |
| 331 | N331K |   | X |   |
| 331 | N331T | X |   | X |
| 334 | Q334K |   | X | X |
| 335 | Q335S |   | X |   |
| 335 | Q335C |   |   | X |
| 335 | Q335N | X |   |   |
| 338 | T338H |   | X |   |
| 338 | T338E |   |   | X |
| 338 | T338A | X |   |   |
| 353 | S353K |   | X | X |
| 393 | E393G |   | X |   |
| 393 | E393T |   |   | X |
| 393 | E393Q | X |   |   |
| 394 | G394E |   | X | X |
| 394 | G394R | X |   |   |
| 402 | R402K | X |   | X |
| 413 | A413T | X |   | X |
| 461 | I461L |   |   | X |
| 461 | I461V |   | X |   |

## EJEMPLO 7

Modificación por ingeniería genética de 'tesA de *P. profundum* (*Ppro*)

Se modificó por ingeniería genética la *tesA* de *P. profundum* (*Ppro*) para que actuase como una éster sintasa. Cuando se examinó en placas de 96 pocillos, la *Ppro* silvestre produjo aproximadamente el 15-18% de FAME de los productos de acilo totales (FAME + ácidos grasos libres). Se identificaron mutaciones que aumentaron el contenido en FAME hasta el 42-44% cuando se sometieron a prueba las variantes en placas de 96 pocillos. Cuando se sometieron a prueba los mismos mutantes en un frasco de agitación, produjeron el 62-65% de FAME en comparación con el 30% de FAME producido por la enzima silvestre. Se identificaron mutaciones basándose en técnicas convencionales, tales como PCR propensa a errores o bibliotecas de saturación de *Ppro* (protocolo 7). Se combinaron las mutaciones identificadas generando bibliotecas de combinación, que también se sometieron a prueba. Entonces se examinaron las bibliotecas usando uno de los protocolos convencionales (protocolos 1-4) descritos anteriormente.

Basándose en el examen de bibliotecas de combinación, se seleccionaron mutaciones para que o bien (1) se fijaran para la siguiente ronda de examen de bibliotecas de combinación; (2) volvieran a someterse a prueba en la siguiente ronda de examen de bibliotecas de combinación; o bien (3) no se sometieran a prueba en ese momento. Las mutaciones que se identificaron como beneficiosas se fijaron para futuras bibliotecas. Los procesos pueden llevarse a cabo mediante examen usando placas de 96 pocillos, validación en placas de 96 pocillos y validación de seguimiento en frascos de agitación.

Los que tienen el mejor rendimiento en frascos de agitación pueden entonces someterse a prueba en fermentadores para verificar que hay una mejora de la *Ppro* modificada por ingeniería genética que es consecuente con aumento a escala. Algunos de los aciertos superiores de las bibliotecas de combinación pueden someterse a prueba en frascos de agitación para confirmar que las variantes de *Ppro* tienen rendimiento mejorado a mayor escala que el de placas de 96 pocillos. Puede llevarse a cabo una validación en matraz de agitación tal como sigue. Se siembran en estría mutantes deseados en agar LB + espectinomicina para obtener colonias individuales y se incubaron durante la noche a 37°C. Se recogen tres colonias individuales de cada mutante en 4 ml de LB + espectinomicina y se incuban a 37°C en agitador durante aproximadamente 6 horas. Se usaron 1,5 ml del cultivo en LB para inocular 15 ml de FA2 (NH<sub>4</sub>Cl 2 g/l) + Triton X-100 al 0,05% + espectinomicina en un frasco de 125 ml con deflectores y se incubó durante la noche a 32°C. Se usan 3 ml del cultivo durante la noche para inocular 15 ml de FA2 (NH<sub>4</sub>Cl 2 g/l) + Triton X-100 al 0,05% + IPTG 1 mM, metanol al 2% + espectinomicina en un frasco de 125 ml con deflectores y se incubó durante aproximadamente 24 horas a 32°C. En el momento de la extracción se toman muestras de 300 µl del cultivo del frasco en una placa de 96 pocillos y se extraen usando un protocolo de extracción convencional (protocolo 5).

Se llevó a cabo un protocolo de extracción convencional tal como se describió anteriormente (protocolo 5). Los resultados del examen de bibliotecas de saturación se muestran en las tablas 8 a 11. La tabla 8 presenta los resultados de mutaciones individuales beneficiosas encontradas usando el tipo silvestre como molde, es decir, SEQ ID NO: 51. La tabla 9 presenta los resultados para mutantes de combinación encontrados usando el tipo silvestre como molde. La tabla 10 presenta los resultados de mutaciones individuales beneficiosas encontradas usando SEQ ID NO: 53 (denominada PROF 1) como molde (SEQ ID NO: 53 ya contenía dos mutaciones beneficiosas en su secuencia incluyendo las mutaciones S46V e Y116H). Para PROF1, las mutaciones S46V y Y116H se "fijaron" en el molde, de modo que se iniciarían futuras rondas de saturación/combinación a partir de esa variante en vez de a partir de la secuencia silvestre. La tabla 11 presenta los resultados de mutaciones dobles encontradas como beneficiosas usando PROF1 como molde. La tabla 12 presenta los resultados de mutantes de combinación encontrados usando el tipo silvestre como molde. La tabla 13 presenta los resultados de mutantes de combinación encontrados usando PIB9v2.0 (SEQ ID NO: 58) como molde en BD64.

La tabla 8 a continuación muestra una lista de mutaciones individuales beneficiosas encontradas usando *Ppro* silvestre (SEQ ID NO: 51) como molde.

Tabla 8

| Mutación | FAME norm. | FFA norm. | Título norm. | % de FAME norm. |
|----------|------------|-----------|--------------|-----------------|
| T3L      | 0.911      | 0.882     | 0.889        | 1.023           |
| P29A     | 1.015      | 1.088     | 1.071        | 0.947           |
| P29F     | 0.984      | 0.984     | 0.984        | 1.000           |
| P29G     | 1.008      | 1.009     | 1.009        | 0.999           |
| P29S     | 1.018      | 1.030     | 1.027        | 0.992           |
| I38Y     | 0.765      | 0.592     | 0.632        | 1.211           |
| I45A     | 0.420      | 0.304     | 0.320        | 1.317           |
| I45G     | 0.311      | 0.109     | 0.137        | 2.242           |
| I45K     | 1.205      | 1.145     | 1.154        | 1.046           |
| I45R     | 1.313      | 1.257     | 1.265        | 1.038           |
| I45S     | 0.398      | 0.242     | 0.264        | 1.509           |
| I45V     | 1.162      | 1.096     | 1.105        | 1.050           |
| I45W     | 0.281      | 0.202     | 0.213        | 1.322           |

|      |       |       |       |       |
|------|-------|-------|-------|-------|
| S46K | 0.387 | 0.224 | 0.247 | 1.556 |
| S46V | 1.166 | 0.899 | 0.937 | 1.250 |
| S46W | 0.346 | 0.211 | 0.230 | 1.517 |
| D48A | 1.297 | 1.417 | 1.396 | 0.929 |
| D48E | 1.267 | 1.278 | 1.276 | 0.993 |
| D48F | 0.892 | 0.773 | 0.794 | 1.123 |
| D48G | 0.921 | 0.835 | 0.851 | 1.083 |
| D48H | 1.081 | 0.955 | 0.977 | 1.106 |
| D48L | 1.774 | 1.816 | 1.808 | 0.980 |
| D48M | 1.880 | 2.159 | 2.109 | 0.891 |
| D48V | 0.626 | 0.535 | 0.551 | 1.136 |
| D48W | 1.263 | 1.252 | 1.254 | 1.010 |
| T49D | 0.556 | 0.378 | 0.408 | 1.364 |
| T49G | 0.273 | 0.263 | 0.265 | 1.024 |
| T49L | 0.595 | 0.425 | 0.453 | 1.311 |
| T49M | 0.461 | 0.334 | 0.356 | 1.292 |
| T49R | 0.402 | 0.214 | 0.244 | 1.651 |
| T49S | 0.447 | 0.360 | 0.374 | 1.194 |
| T49V | 0.503 | 0.336 | 0.362 | 1.389 |
| T49W | 0.678 | 0.542 | 0.565 | 1.203 |
| G51A | 1.079 | 1.068 | 1.070 | 1.009 |
| G51E | 1.025 | 0.938 | 0.952 | 1.076 |
| G51F | 0.921 | 0.830 | 0.844 | 1.091 |
| G51H | 1.083 | 1.087 | 1.086 | 0.997 |
| G51L | 0.956 | 0.871 | 0.887 | 1.076 |
| G51M | 1.013 | 0.952 | 0.962 | 1.053 |
| G51P | 0.460 | 0.308 | 0.332 | 1.385 |
| G51Q | 1.047 | 1.082 | 1.075 | 0.972 |
| G51R | 1.377 | 1.452 | 1.440 | 0.955 |
| G51S | 1.088 | 1.046 | 1.053 | 1.033 |
| G51T | 1.062 | 1.115 | 1.107 | 0.959 |
| G51V | 1.003 | 1.036 | 1.031 | 0.973 |
| G51Y | 0.852 | 0.833 | 0.837 | 1.016 |
| N52A | 0.970 | 0.856 | 0.883 | 1.099 |
| N52C | 0.825 | 0.676 | 0.710 | 1.161 |
| N52F | 0.797 | 0.668 | 0.697 | 1.141 |
| N52G | 1.026 | 1.093 | 1.078 | 0.951 |
| N52H | 0.959 | 1.035 | 1.017 | 0.943 |
| N52L | 0.974 | 0.848 | 0.877 | 1.110 |
| N52M | 1.040 | 1.045 | 1.044 | 0.996 |
| N52R | 1.405 | 1.641 | 1.587 | 0.885 |
| N52S | 0.903 | 0.810 | 0.832 | 1.084 |
| N52T | 0.874 | 0.785 | 0.806 | 1.084 |
| N52V | 0.812 | 0.699 | 0.725 | 1.118 |
| N76I | 0.518 | 0.285 | 0.326 | 1.584 |
| N76L | 0.366 | 0.160 | 0.200 | 1.834 |
| N76V | 0.642 | 0.336 | 0.395 | 1.624 |
| S92A | 1.001 | 1.054 | 1.042 | 0.960 |

|       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|
| S92H  | 1.026 | 1.106 | 1.087 | 0.943 |
| S92S  | 1.002 | 0.972 | 0.979 | 1.022 |
| S92Y  | 1.022 | 1.199 | 1.158 | 0.881 |
| I95V  | 0.910 | 0.876 | 0.884 | 1.028 |
| Y116A | 0.923 | 0.889 | 0.895 | 1.032 |
| Y116F | 1.077 | 1.035 | 1.042 | 1.034 |
| Y116I | 1.392 | 1.303 | 1.318 | 1.055 |
| Y116L | 1.203 | 1.246 | 1.239 | 0.971 |
| Y116N | 1.430 | 1.424 | 1.425 | 1.003 |
| Y116P | 0.628 | 0.460 | 0.488 | 1.284 |
| Y116R | 1.442 | 1.701 | 1.657 | 0.872 |
| Y116S | 0.876 | 0.757 | 0.777 | 1.127 |
| Y116T | 1.079 | 0.939 | 0.963 | 1.121 |
| Y120R | 0.490 | 0.399 | 0.420 | 1.164 |
| N156A | 1.048 | 1.090 | 1.082 | 0.969 |
| N156C | 0.903 | 0.858 | 0.866 | 1.042 |
| N156G | 0.984 | 1.070 | 1.055 | 0.933 |
| N156L | 0.841 | 0.821 | 0.825 | 1.018 |
| N156R | 1.477 | 1.942 | 1.856 | 0.796 |
| N156W | 0.824 | 0.678 | 0.705 | 1.168 |
| L159G | 0.399 | 0.245 | 0.273 | 1.455 |
| L159M | 1.254 | 1.651 | 1.577 | 0.795 |
| L159N | 0.513 | 0.323 | 0.358 | 1.433 |
| L159R | 0.554 | 0.540 | 0.542 | 1.021 |
| L159S | 0.390 | 0.237 | 0.265 | 1.466 |
| L159Y | 0.476 | 0.318 | 0.347 | 1.368 |

La tabla 9 a continuación muestra una lista de mutantes de combinación encontrados usando *Ppro* silvestre (SEQ ID NO: 51) como molde.

Tabla 9

| Mutación | Mutación  | FAME norm. | FFA norm. | Título norm. | % de FAME norm. |
|----------|-----------|------------|-----------|--------------|-----------------|
| E37D     | I45R      | 1.189      | 1.255     | 1.246        | 0.953           |
| P29A     | Stop_182I | 1.014      | 1.058     | 1.047        | 0.967           |
| I38L     | V41I      | 0.843      | 0.760     | 0.779        | 1.082           |
| Y116I    | Q146H     | 1.554      | 1.906     | 1.846        | 0.841           |
| Y116P    | E175D     | 0.341      | 0.231     | 0.252        | 1.350           |
| Y116Q    | G117R     | 0.438      | 0.350     | 0.365        | 1.202           |
| G8V      | T49S      | 0.405      | 0.277     | 0.299        | 1.358           |
| A30T     | G51C      | 0.566      | 0.483     | 0.499        | 1.134           |
| T49Q     | Y116H     | 0.383      | 0.247     | 0.269        | 1.417           |
| T49R     | Y116H     | 0.441      | 0.303     | 0.324        | 1.362           |
| N156K    | L159K     | 1.456      | 1.955     | 1.862        | 0.782           |
| G158D    | L159V     | 0.334      | 0.224     | 0.244        | 1.362           |

La tabla 10 a continuación muestra una lista de mutaciones individuales beneficiosas encontradas usando PROF1 (SEQ ID NO: 53) como molde.

Tabla 10

| <b>Mutación</b> | <b>FAME norm.</b> | <b>FFA norm.</b> | <b>Título norm.</b> | <b>% de FAME norm.</b> |
|-----------------|-------------------|------------------|---------------------|------------------------|
| V41D            | 0.394             | 0.310            | 0.330               | 1.195                  |
| V41E            | 0.891             | 0.855            | 0.863               | 1.033                  |
| V41K            | 0.999             | 1.016            | 1.012               | 0.989                  |
| V41Q            | 1.015             | 1.048            | 1.040               | 0.976                  |
| V41R            | 0.996             | 1.019            | 1.014               | 0.983                  |
| V41S            | 0.577             | 0.495            | 0.515               | 1.122                  |
| V41T            | 0.732             | 0.669            | 0.684               | 1.070                  |
| V41W            | 0.856             | 0.778            | 0.797               | 1.075                  |
| F82A            | 1.036             | 0.940            | 0.963               | 1.077                  |
| F82E            | 0.861             | 0.747            | 0.775               | 1.111                  |
| F82G            | 0.770             | 0.577            | 0.625               | 1.233                  |
| F82K            | 1.167             | 1.220            | 1.207               | 0.967                  |
| F82Q            | 0.996             | 0.927            | 0.944               | 1.054                  |
| F82R            | 1.426             | 1.552            | 1.521               | 0.938                  |
| F82V            | 0.975             | 0.883            | 0.906               | 1.076                  |
| F82W            | 1.089             | 1.141            | 1.128               | 0.966                  |
| Q84A            | 0.989             | 0.936            | 0.949               | 1.043                  |
| Q84E            | 0.990             | 1.050            | 1.036               | 0.957                  |
| Q84G            | 0.822             | 0.774            | 0.785               | 1.047                  |

5 La tabla 11 muestra una lista de mutaciones dobles encontradas como beneficiosas usando PROF1 (SEQ ID NO: 53) como molde.

Tabla 11

| <b>Mutación</b> | <b>Mutación</b> | <b>FAME norm.</b> | <b>FFA norm.</b> | <b>Título norm.</b> | <b>% de FAME norm.</b> |
|-----------------|-----------------|-------------------|------------------|---------------------|------------------------|
| V41L            | D48G            | 0.684             | 0.601            | 0.621               | 1.103                  |
| F82G            | T86P            | 0.589             | 0.399            | 0.446               | 1.323                  |

10 Se comentan en el presente documento los resultados de la alimentación de etanol a una de las bibliotecas de *Ppro*. Se alimentó una de las bibliotecas de combinación con o bien metanol o bien etanol, con el fin de someter a prueba si los genes que tenían actividad éster sintasa mejorada usando metanol también mostraban actividad éster sintasa mejorada en presencia de etanol. Tal como puede observarse en las figuras 7A y 7B, se observó la actividad éster sintasa mejorada con alimentación con o bien metanol o bien etanol, aunque se obtuvo un porcentaje superior de ésteres usando metanol. La tabla 12 muestra una lista de mutantes de combinación encontrados usando *Ppro* silvestre (SEQ ID NO: 51) como molde.

15

Tabla 12

| Mutaciones                                   | FAME norm. | FFA norm. | Título norm. | % de FAME norm. |
|----------------------------------------------|------------|-----------|--------------|-----------------|
| D48E, R119C                                  | 1.119      | 1.116     | 1.117        | 1.001           |
| D48E, R88H, Y116H                            | 1.265      | 1.559     | 1.506        | 0.839           |
| G51R, D102V                                  | 1.012      | 1.026     | 1.023        | 0.988           |
| G51R, R88H, R119C, L159M                     | 1.597      | 1.818     | 1.778        | 0.897           |
| I45T, D48E, S92R, Y116H                      | 1.060      | 0.991     | 1.004        | 1.055           |
| I45T, D48E, Y116H                            | 1.027      | 1.019     | 1.020        | 1.007           |
| I45T, D48E, Y116H, R119C                     | 0.812      | 0.766     | 0.774        | 1.046           |
| I45T, R88H                                   | 0.643      | 0.490     | 0.518        | 1.237           |
| I45T, S46V, R119C                            | 0.635      | 0.565     | 0.578        | 1.099           |
| I45T, S46V, Y116H                            | 1.004      | 0.891     | 0.912        | 1.100           |
| I45T, Y116H                                  | 1.158      | 1.223     | 1.211        | 0.957           |
| K32M, L159M                                  | 1.400      | 1.717     | 1.659        | 0.843           |
| K32M, N156Y, L159M                           | 1.345      | 1.278     | 1.290        | 1.042           |
| R18C, G51R, N52T, D102V, N115I, P129L, L159M | 1.377      | 1.524     | 1.497        | 0.918           |
| R88H, Y116H                                  | 1.131      | 1.258     | 1.235        | 0.915           |
| S46V, D48E, Y116H                            | 1.209      | 1.052     | 1.081        | 1.117           |
| S46V, D48E, Y116H, R119C                     | 1.118      | 0.993     | 1.016        | 1.101           |
| S46V, R88H                                   | 1.086      | 0.820     | 0.868        | 1.249           |
| S46V, T86S, Y116H                            | 1.401      | 1.092     | 1.149        | 1.219           |
| S46V, Y116H                                  | 1.321      | 1.203     | 1.224        | 1.079           |
| T2_50_T4, R88H, R119C                        | 0.833      | 0.806     | 0.811        | 1.026           |
| V41I, I45T, Y116H                            | 1.057      | 1.129     | 1.116        | 0.945           |
| V41L, S46V, R119C                            | 0.897      | 0.631     | 0.680        | 1.318           |
| Y116H, R119C                                 | 1.107      | 1.277     | 1.246        | 0.888           |
| D48E, G51R, R88H, R119C, L159M               | 1.403      | 1.389     | 1.391        | 1.010           |
| D48E, Y116H, R119C                           | 1.493      | 1.570     | 1.558        | 0.958           |
| G51R, N156Y                                  | 1.097      | 1.133     | 1.127        | 0.972           |
| G51R, R119C, N156Y, L159M                    | 1.364      | 1.566     | 1.534        | 0.888           |
| G51R, R88H, Y116H, S121R, L159M              | 1.562      | 1.631     | 1.621        | 0.962           |
| G51R, V112A, N115I, N156Y                    | 0.317      | 0.216     | 0.230        | 1.339           |

| Mutaciones                                      | FAME<br>norm. | FFA<br>norm. | Título<br>norm. | % de FAME<br>norm. |
|-------------------------------------------------|---------------|--------------|-----------------|--------------------|
| G51R, Y116H, R119C                              | 1.609         | 1.856        | 1.818           | 0.884              |
| H36Q, S46V, R88H, Y116H, R119C,<br>L159M        | 0.843         | 0.652        | 0.682           | 1.236              |
| I45N, S46V, D48E, G51R, Y116H,<br>L159M         | 1.016         | 0.848        | 0.875           | 1.162              |
| K32M, D48E, R88H, Y116H, N156Y                  | 0.920         | 0.811        | 0.828           | 1.110              |
| K32M, D48E, Y116H                               | 1.992         | 1.929        | 1.938           | 1.027              |
| K32M, G51R, Y116H                               | 1.722         | 1.943        | 1.908           | 0.902              |
| K32M, H36Q, G51R, Y116H, L159M                  | 1.629         | 1.651        | 1.648           | 0.988              |
| K32M, S46V, D48E, A55T, R119C                   | 0.710         | 0.518        | 0.547           | 1.294              |
| K32M, S46V, D48E, G51R, Y116H,<br>L159M         | 2.067         | 1.562        | 1.634           | 1.264              |
| K32M, S46V, D48E, Y116H, N156Y,<br>L159M        | 1.211         | 1.007        | 1.039           | 1.165              |
| K32M, S46V, G51R                                | 1.305         | 1.144        | 1.169           | 1.115              |
| K32M, S46V, G51R, F82I, Q84L,<br>Y116H, L159M   | 2.570         | 2.098        | 2.165           | 1.187              |
| K32M, S46V, G51R, L159M                         | 1.646         | 1.512        | 1.533           | 1.073              |
| K32M, S46V, G51R, R88H, L159M                   | 1.730         | 1.552        | 1.579           | 1.097              |
| K32M, S46V, G51R, R88H, Y116H,<br>R119C         | 1.516         | 1.397        | 1.415           | 1.072              |
| K32M, S46V, G51R, R88H, Y116H,<br>R119C, S121R  | 0.601         | 0.532        | 0.543           | 1.116              |
| K32M, S46V, G51R, Y116H                         | 2.066         | 1.634        | 1.695           | 1.219              |
| K32M, S46V, G51R, Y116H, N156Y,<br>L159M        | 1.992         | 1.859        | 1.880           | 1.060              |
| K32M, S46V, G51R, Y116H, R119C,<br>N156Y, L159M | 1.866         | 1.578        | 1.619           | 1.153              |
| K32M, S46V, G51R, Y116H, S121R,<br>N156Y, L159M | 0.774         | 0.664        | 0.681           | 1.137              |
| K32M, S46V, Y116H                               | 1.408         | 1.193        | 1.223           | 1.152              |
| K32M, S46V, Y116H, E152*, L159M                 | 0.441         | 0.385        | 0.394           | 1.136              |
| K32M, S46V, Y116H, L159M                        | 1.845         | 1.695        | 1.718           | 1.073              |
| K32M, S46V, Y116H, N156Y                        | 1.261         | 1.061        | 1.093           | 1.156              |
| K32M, Y116H, R119C, L159M                       | 1.693         | 1.928        | 1.891           | 0.895              |
| P24Q, K32M, S46V, G51R, R88H,<br>L159M          | 0.615         | 0.491        | 0.511           | 1.189              |
| R88H, L159M                                     | 1.414         | 1.525        | 1.507           | 0.939              |
| R88H, N89S, Y116H                               | 1.263         | 1.368        | 1.352           | 0.934              |
| S46V, D48E                                      | 0.975         | 0.755        | 0.790           | 1.234              |
| S46V, D48E, G51R, R119C                         | 1.160         | 0.946        | 0.979           | 1.181              |
| S46V, D48E, G51R, R119C, L159*                  | 0.343         | 0.199        | 0.221           | 1.556              |
| S46V, D48E, G51R, R88H, Y116H,<br>L159M         | 1.527         | 1.329        | 1.360           | 1.123              |
| S46V, D48E, G51R, R88H, Y116H,<br>R119C, N156Y  | 0.818         | 0.655        | 0.681           | 1.201              |

| Mutaciones                                  | FAME norm. | FFA norm. | Título norm. | % de FAME norm. |
|---------------------------------------------|------------|-----------|--------------|-----------------|
| S46V, D48E, G51R, Y116H                     | 1.645      | 1.355     | 1.399        | 1.175           |
| S46V, D48E, G51R, Y116H, L159M              | 1.669      | 1.453     | 1.487        | 1.122           |
| S46V, D48E, G51R, Y116H, N156Y, L159M       | 1.517      | 1.195     | 1.244        | 1.220           |
| S46V, D48E, G51R, Y116H, S121N              | 0.532      | 0.485     | 0.492        | 1.078           |
| S46V, D48E, N156K                           | 1.411      | 1.112     | 1.159        | 1.217           |
| S46V, D48E, N90K, Y116H, L159M              | 0.366      | 0.248     | 0.266        | 1.373           |
| S46V, D48E, R119C                           | 0.946      | 0.725     | 0.759        | 1.245           |
| S46V, D48E, R88H, Y116H                     | 1.199      | 1.016     | 1.044        | 1.148           |
| S46V, D48E, Y116H, L159M                    | 1.534      | 1.232     | 1.279        | 1.198           |
| S46V, D48E, Y116H, N156Y, L159M             | 1.265      | 1.007     | 1.048        | 1.206           |
| S46V, G51R                                  | 1.315      | 1.219     | 1.234        | 1.065           |
| S46V, G51R, L79I, R88H, Y116H, N156Y, L159M | 1.013      | 0.845     | 0.871        | 1.161           |
| S46V, G51R, N156Y                           | 1.285      | 1.073     | 1.106        | 1.161           |
| S46V, G51R, R88H, Y116H                     | 1.561      | 1.389     | 1.416        | 1.103           |
| S46V, G51R, R88H, Y116H, M154K              | 0.520      | 0.413     | 0.430        | 1.210           |
| S46V, G51R, R88H, Y116H, N156Y, L159M       | 1.677      | 1.571     | 1.588        | 1.055           |
| S46V, G51R, R88H, Y116H, R119C              | 1.454      | 1.277     | 1.305        | 1.114           |
| S46V, G51R, R88H, Y116H, R119C, S163F       | 0.554      | 0.392     | 0.417        | 1.327           |
| S46V, G51R, Y116H                           | 1.656      | 1.486     | 1.513        | 1.095           |
| S46V, G51R, Y116H, L159M                    | 1.989      | 1.875     | 1.893        | 1.050           |
| S46V, G51R, Y116H, N156Y                    | 1.788      | 1.461     | 1.508        | 1.186           |
| S46V, G51R, Y116H, R119C                    | 1.869      | 1.480     | 1.535        | 1.216           |
| S46V, G51R, Y116H, R119C, L159M             | 2.256      | 2.015     | 2.050        | 1.101           |
| S46V, L159M                                 | 1.487      | 1.300     | 1.329        | 1.118           |
| S46V, N156Y, L159M                          | 1.360      | 1.113     | 1.148        | 1.184           |
| S46V, R88H, L159M                           | 1.684      | 1.434     | 1.469        | 1.146           |
| S46V, R88H, Y116H                           | 1.219      | 1.024     | 1.054        | 1.157           |
| S46V, R88H, Y116H, L159M                    | 1.647      | 1.439     | 1.471        | 1.119           |
| S46V, R88H, Y116H, N156Y                    | 1.213      | 0.951     | 0.988        | 1.228           |
| S46V, R88H, Y116H, S125I                    | 0.685      | 0.501     | 0.530        | 1.290           |
| S46V, R88Y, Y116H, R119C, L159M             | 1.254      | 1.119     | 1.140        | 1.101           |
| S46V, Y116H, L159M                          | 1.671      | 1.510     | 1.534        | 1.089           |
| S46V, Y116H, N156Y                          | 1.320      | 1.070     | 1.105        | 1.193           |
| S46V, Y116H, R119C                          | 1.191      | 0.964     | 0.999        | 1.192           |
| S46V, Y116H, R119C, L159M                   | 1.588      | 1.397     | 1.427        | 1.113           |
| S46V, Y116H, R119C, N156Y                   | 1.045      | 0.851     | 0.881        | 1.186           |
| S46V, Y116H, R119C, N156Y, L159M            | 1.295      | 1.086     | 1.118        | 1.158           |
| V41E, S46V, D48E, R119C                     | 0.570      | 0.396     | 0.423        | 1.347           |

| Mutaciones                                     | FAME<br>norm. | FFA<br>norm. | Título<br>norm. | % de FAME<br>norm. |
|------------------------------------------------|---------------|--------------|-----------------|--------------------|
| V41L, S46V, R88H, L159M                        | 1.138         | 0.858        | 0.898           | 1.268              |
| Y116H, N156Y, L159M                            | 1.455         | 1.644        | 1.615           | 0.901              |
| S46V, D48F, G51R, Y116H, E152D,<br>L159M       | 1.100         | 0.904        | 0.936           | 1.176              |
| S46V, D48F, G51R, Y116H, G117D,<br>L159M       | 0.695         | 0.439        | 0.482           | 1.444              |
| S46V, D48F, G51R, Y116H, L159M                 | 1.297         | 1.263        | 1.269           | 1.021              |
| S46V, D48F, G51R, N52C, Y116N                  | 0.304         | 0.163        | 0.187           | 1.632              |
| S46V, D48F, G51R, N52C, N76V,<br>Y116S, N156K  | 0.218         | 0.197        | 0.201           | 1.091              |
| S46V, D48F, G51R, N76V, Y116N                  | 0.656         | 0.291        | 0.350           | 1.882              |
| S46V, D48F, G51R, N76V, Y116H,<br>N156K, L159M | 0.838         | 0.360        | 0.434           | 1.941              |
| S46V, D48F, G51R, P114R, Y116H                 | 0.636         | 0.518        | 0.536           | 1.194              |
| S46V, D48L, G51R, Y116S, N156K                 | 0.854         | 0.766        | 0.780           | 1.096              |
| S46V, D48L, G51R, Y116H, M155I,<br>N156S       | 0.606         | 0.461        | 0.483           | 1.254              |
| S46V, D48L, G51R, N52C, N76V,<br>Y116H         | 1.033         | 0.397        | 0.495           | 2.089              |
| S46V, D48L, G51R, N52F, Y116H,<br>N156K        | 1.438         | 1.285        | 1.310           | 1.099              |
| S46V, D48L, G51R, N52F, N76I,<br>Y116N         | 0.446         | 0.272        | 0.298           | 1.492              |
| S46V, D48L, G51R, N52F, N76I,<br>Y116N, L149V  | 0.536         | 0.279        | 0.321           | 1.667              |
| S46V, D48L, G51R, N52F, N76V,<br>Y116H, L159M  | 1.023         | 0.319        | 0.428           | 2.389              |
| S46V, D48L, G51R, N76I, Y116P,<br>L159M        | 0.545         | 0.243        | 0.293           | 1.857              |
| S46V, D48L, G51R, N76I, Y116S                  | 0.398         | 0.238        | 0.265           | 1.501              |
| S46V, D48M, G51R, Y116P                        | 1.353         | 1.209        | 1.233           | 1.098              |
| S46V, D48M, G51R, N52F, Y116H                  | 1.951         | 1.559        | 1.620           | 1.204              |
| S46V, D48M, G51R, N52F, Y116P                  | 0.864         | 0.659        | 0.692           | 1.247              |
| S46V, D48M, G51R, N52F, Y116H,<br>L159M        | 1.432         | 1.225        | 1.260           | 1.136              |
| S46V, D48M, G51R, N76I, Y116N,<br>N156K        | 0.913         | 0.362        | 0.447           | 2.042              |
| S46V, D48M, G51R, N76I, Y116S,<br>L159M        | 0.971         | 0.387        | 0.481           | 2.012              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, Y116P                  | 1.353         | 0.418        | 0.562           | 2.405              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, Y116P,<br>K162R        | 1.179         | 0.377        | 0.501           | 2.356              |
| S46V, D48M, G51R, P114R, Y116H,<br>Q151R       | 1.481         | 1.318        | 1.345           | 1.102              |
| S46V, G47S, D48L, G51R, N52F,<br>Y116H, N156K  | 0.558         | 0.351        | 0.385           | 1.448              |
| S46V, G51R, Y116N, L159M                       | 2.259         | 1.823        | 1.890           | 1.196              |
| S46V, G51R, Y116N, N156K                       | 1.798         | 1.818        | 1.814           | 0.992              |

| Mutaciones                                                 | FAME<br>norm. | FFA<br>norm. | Título<br>norm. | % de FAME<br>norm. |
|------------------------------------------------------------|---------------|--------------|-----------------|--------------------|
| S46V, G51R, Y116P, N156K                                   | 1.257         | 1.000        | 1.039           | 1.211              |
| S46V, G51R, Y116S, N156K                                   | 1.833         | 1.363        | 1.435           | 1.277              |
| S46V, G51R, N52C, Y116H, L159M                             | 2.011         | 1.595        | 1.659           | 1.212              |
| S46V, G51R, N52C, Y116H, N156K                             | 2.141         | 1.869        | 1.913           | 1.119              |
| S46V, G51R, N52C, N76I, Y116H                              | 0.287         | 0.141        | 0.163           | 1.759              |
| S46V, G51R, N52C, N76V, Y116P                              | 0.535         | 0.187        | 0.241           | 2.151              |
| S46V, G51R, N52F, Y116H                                    | 1.296         | 1.006        | 1.051           | 1.234              |
| S46V, G51R, N52F, Y116P, N156K,<br>L159M                   | 0.263         | 0.216        | 0.224           | 1.145              |
| S46V, G51R, N52F, Y116S, L159M                             | 0.271         | 0.215        | 0.224           | 1.210              |
| S46V, G51R, N76I, Y116H                                    | 0.210         | 0.188        | 0.191           | 1.098              |
| S46V, G51R, N76V, Y116H                                    | 0.740         | 0.331        | 0.397           | 1.865              |
| S46V, G51R, N76V, Y116S                                    | 0.653         | 0.252        | 0.317           | 2.065              |
| S46V, G51R, V112M, Y116N, N156K                            | 1.384         | 0.949        | 1.016           | 1.363              |
| I38Y, S46V, D48F, G51R, Y116N,<br>L159M                    | 0.258         | 0.115        | 0.139           | 1.867              |
| I38Y, S46V, D48L, G51R, Y116S                              | 0.218         | 0.127        | 0.142           | 1.510              |
| I38Y, S46V, D48L, G51R, N76I,<br>Y116H, N156K, L159M       | 0.954         | 0.379        | 0.468           | 2.041              |
| I38Y, S46V, D48L, G51R, N76I,<br>R80G, Y116H, N156K, L159M | 0.497         | 0.245        | 0.284           | 1.714              |
| I38Y, S46V, D48M, G51R, N52C,<br>Y116S                     | 0.441         | 0.305        | 0.327           | 1.348              |
| I38Y, S46V, D48M, G51R, N52F,<br>N76V, Y116H               | 1.638         | 0.417        | 0.604           | 2.711              |
| I38Y, S46V, D48M, G51R, N52F,<br>N76V, Y116H, L181S, *182Y | 1.836         | 0.485        | 0.692           | 2.653              |
| I38Y, S46V, D48M, G51R, N76V,<br>Y116N, N156K, L159M       | 1.627         | 0.468        | 0.648           | 2.513              |
| I38Y, S46V, G51R, Y116N                                    | 0.764         | 0.551        | 0.585           | 1.305              |
| I38Y, S46V, G51R, Y116H, L159M                             | 2.024         | 1.801        | 1.835           | 1.103              |
| I38Y, S46V, G51R, N52C, N76I,<br>Y116H, N156K              | 0.170         | 0.138        | 0.144           | 1.190              |
| S46V, D48L, G51R, F82I, Q84L,<br>Y116H, L159M              | 1.663         | 1.293        | 1.373           | 1.211              |
| S46V, D48L, G51R, N76V, Y116H                              | 0.678         | 0.340        | 0.413           | 1.639              |
| S46V, D48L, G51R, N76V, F82I,<br>Q84L, Y116N, L159M        | 0.846         | 0.375        | 0.484           | 1.745              |
| S46V, D48L, G51R, N76V, Y116N                              | 0.899         | 0.395        | 0.513           | 1.754              |
| S46V, D48L, G51R, N76V, Y116N,<br>L159M                    | 0.897         | 0.403        | 0.517           | 1.731              |
| S46V, D48L, G51R, N76V, Y116N,<br>L159M, K162E             | 0.721         | 0.342        | 0.430           | 1.675              |
| S46V, D48L, G51R, N76V, Y116N,<br>N156K                    | 0.888         | 0.382        | 0.492           | 1.805              |
| S46V, D48L, G51R, N76V, Y116N,<br>N156K, L159M             | 0.809         | 0.369        | 0.471           | 1.714              |

| Mutaciones                                           | FAME<br>norm. | FFA<br>norm. | Título<br>norm. | % de FAME<br>norm. |
|------------------------------------------------------|---------------|--------------|-----------------|--------------------|
| S46V, D48L, G51R, N76V, Y116H,<br>L159M              | 1.073         | 0.414        | 0.557           | 1.924              |
| S46V, D48L, G51R, N76V, Y116H,<br>N156K              | 0.874         | 0.401        | 0.511           | 1.712              |
| S46V, D48L, G51R, N76V, Y116H,<br>N156K, L159M       | 0.949         | 0.425        | 0.547           | 1.735              |
| S46V, D48L, G51R, N76V, V112M,<br>Y116N              | 0.696         | 0.347        | 0.429           | 1.623              |
| S46V, D48M, G51R, N52Y, N76V,<br>Y116N, L159M        | 1.153         | 0.424        | 0.594           | 1.941              |
| S46V, D48M, G51R, N52Y, N76V,<br>Y116H, L159M        | 1.157         | 0.437        | 0.605           | 1.914              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, Y116H                        | 1.225         | 0.445        | 0.614           | 1.994              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, Y116N                        | 1.178         | 0.446        | 0.605           | 1.947              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, Y116N,<br>L159M              | 1.267         | 0.480        | 0.663           | 1.908              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, Y116N,<br>N156K              | 1.058         | 0.406        | 0.547           | 1.931              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, Y116N,<br>N156K, L159M       | 1.176         | 0.490        | 0.650           | 1.811              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, Y116H,<br>L159M              | 1.312         | 0.529        | 0.711           | 1.845              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, Y116H,<br>M155R              | 0.799         | 0.352        | 0.449           | 1.779              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, Y116H,<br>N156K              | 1.254         | 0.532        | 0.700           | 1.791              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, Y116H,<br>N156K, L159M       | 1.257         | 0.524        | 0.695           | 1.810              |
| S46V, D48M, G51R, R56P, N76V,<br>Y116H, L159M        | 0.406         | 0.165        | 0.221           | 1.836              |
| S46V, G51R, N76V, Y116N, L159M                       | 0.822         | 0.386        | 0.487           | 1.687              |
| S46V, G51R, N76V, Y116N, N156K,<br>L159M             | 0.942         | 0.386        | 0.515           | 1.826              |
| S46V, G51R, N76V, Y116N, R119H,<br>N156K, L159M      | 0.916         | 0.386        | 0.509           | 1.796              |
| S46V, G51R, N76V, Y116H, L159M                       | 0.935         | 0.373        | 0.504           | 1.854              |
| S46V, G51R, N76V, Y116H, N156K                       | 0.834         | 0.340        | 0.447           | 1.864              |
| S46V, G51R, N76V, Y116H, N156K,<br>L159M             | 0.965         | 0.381        | 0.508           | 1.900              |
| S46V, G51R, N76V, Y116H, R119L,<br>N156K             | 0.761         | 0.326        | 0.420           | 1.809              |
| K32M, S46V, D48L, G51R, F82I,<br>Q84L, Y116H, L159M  | 1.724         | 1.281        | 1.377           | 1.251              |
| K32M, S46V, G51R, F82I, Y116H,<br>L159M,             | 1.956         | 2.094        | 2.064           | 0.947              |
| K32M, S46V, G51R, F82I, Q84L,<br>Y116H, L159M        | 2.066         | 2.023        | 2.032           | 1.016              |
| K32M, S46V, G51R, F82I, Q84L,<br>Y116H, N156K, L159M | 2.050         | 2.348        | 2.284           | 0.897              |
| S46V, T49S, G51R, N76V, Q84I,<br>Y116H, N156K, L159M | 0.674         | 0.298        | 0.379           | 1.774              |

| Mutaciones                                                                      | FAME<br>norm. | FFA<br>norm. | Título<br>norm. | % de FAME<br>norm. |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------|-----------------|--------------------|
| A30E, S46V, D48M, G51R, N76V,<br>F82R, Y116H, I148Y                             | 0.446         | 0.198        | 0.235           | 1.846              |
| E37A, I45R, S46V, D48M, T49W,<br>G51R, N76V, F82G, Y116H, N156K                 | 0.625         | 0.318        | 0.367           | 1.704              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, F82G,<br>Y116H, A136D, I148Y                            | 2.627         | 0.613        | 0.913           | 2.878              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, F82G,<br>Y116H, I148Y                                   | 2.416         | 0.621        | 0.908           | 2.661              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, F82G,<br>Y116H, I148Y, W168C                            | 0.339         | 0.239        | 0.254           | 1.331              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, F82G,<br>Y116H, N156R, L159M                            | 1.381         | 0.438        | 0.579           | 2.387              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, F82G,<br>Q84L, Y116H                                    | 1.602         | 0.483        | 0.650           | 2.467              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, F82I,<br>Y116H, N156K, L159K                            | 1.164         | 0.465        | 0.569           | 2.047              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, F82I,<br>Q84L, Y116H, N156R                             | 1.419         | 0.466        | 0.618           | 2.289              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, F82R,<br>Y116H, L159K                                   | 2.760         | 0.734        | 1.035           | 2.661              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, F82R,<br>N115A, Y116H, N156K, L159K                     | 1.874         | 0.582        | 0.788           | 2.375              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, F82R,<br>Y116H, N156K, L159K                            | 1.907         | 0.647        | 0.848           | 2.229              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, Y116H,<br>I148Y                                         | 2.793         | 0.796        | 1.114           | 2.505              |
| I45R, S46V, D48M, G51R, N76V,<br>F82I, Y116H, N156K, L159K                      | 1.335         | 0.491        | 0.626           | 2.125              |
| I45R, S46V, D48M, G51R, N76V,<br>Q84L, Y116H, N156R, L159K                      | 0.448         | 0.238        | 0.269           | 1.660              |
| I45R, S46V, D48M, T49L, G51R,<br>A67S, N76V, F82G, Y116H, L159K                 | 0.476         | 0.319        | 0.345           | 1.382              |
| I45R, S46V, D48M, T49L, G51R,<br>N76V, F82G, Y116H, L159K                       | 0.532         | 0.335        | 0.366           | 1.451              |
| I45R, S46V, D48M, T49L, G51R,<br>N76V, Q84L, Y116H, N156R, L159M                | 0.318         | 0.201        | 0.220           | 1.444              |
| I45R, S46V, D48M, T49R, G51R,<br>N52D, N76V, F82I, Q84L, Y116H,<br>I148Y, N156Y | 1.056         | 0.383        | 0.490           | 2.152              |
| I45R, S46V, D48M, T49W, G51R,<br>N76V, F82I, Q84L, Y116H, I148Y                 | 0.204         | 0.174        | 0.179           | 1.147              |
| K32M, S46V, D48M, G51R, N76V,<br>F82G, Y116H, N156R, L159M                      | 1.289         | 0.436        | 0.574           | 2.246              |
| K32M, S46V, D48M, G51R, N76V,<br>F82G, Q84L, Y116H                              | 1.565         | 0.493        | 0.664           | 2.353              |
| K32M, S46V, D48M, G51R, N76V,<br>F82I, Y116H, L159M                             | 1.743         | 0.534        | 0.729           | 2.382              |
| K32M, S46V, D48M, G51R, N76V,<br>F82I, Q84L, Y116H, L159M                       | 1.926         | 0.538        | 0.745           | 2.583              |

| Mutaciones                                                                      | FAME<br>norm. | FFA<br>norm. | Título<br>norm. | % de FAME<br>norm. |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------|-----------------|--------------------|
| K32M, I45R, S46V, D48M, T49D,<br>G51R, N76V, F82G, Y116H, L159Q                 | 0.927         | 0.405        | 0.489           | 1.896              |
| K32M, I45R, S46V, D48M, T49D,<br>G51R, N76V, F82I, Y116H, I148Y                 | 1.884         | 0.599        | 0.806           | 2.335              |
| K32M, S46V, D48M, G51R, N76V,<br>Y116H, L159K                                   | 1.289         | 0.472        | 0.603           | 2.138              |
| K32M, S46V, D48M, N76V, F82G,<br>Q84L, Y116H                                    | 0.902         | 0.353        | 0.441           | 2.045              |
| K32M, S46V, D48M, T49D, G51R,<br>N76V, F82I, Q84L, Y116H                        | 0.537         | 0.229        | 0.275           | 1.956              |
| K32M, S46V, D48M, T49D, G51R,<br>N76V, Y116H, I148Y                             | 0.841         | 0.343        | 0.423           | 1.988              |
| K32M, S46V, D48M, T49L, G51R,<br>N76V, F82G, Q84L, Y116H, N156K,<br>L159M       | 2.118         | 0.623        | 0.861           | 2.456              |
| K32M, S46V, D48M, T49L, G51R,<br>N76V, F82R, Y116H, L159K                       | 0.099         | 0.089        | 0.091           | 1.056              |
| K32M, S46V, D48M, T49W, G51R,<br>P58L, L73F, N76V, Q84L, Y116H,<br>N156K, L159K | 0.323         | 0.236        | 0.250           | 1.299              |
| K32M, S46V, D48M, T49W, G51R,<br>N76V, Q84L, Y116H, N156K, L159K                | 1.310         | 0.494        | 0.624           | 2.096              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, Y116H,<br>N156K, L159M                                  | 2.019         | 0.595        | 0.824           | 2.450              |
| Q34R, I45R, S46V, D48M, T49D,<br>G51R, N76V, F82R, Y116H                        | 1.421         | 0.492        | 0.642           | 2.214              |
| S46V, D48M, G51R, N76V, Q84L,<br>Y116H, N156K                                   | 1.631         | 0.522        | 0.701           | 2.325              |
| S46V, D48M, T49D, G51R, N76V,<br>F82G, Y116H, L159K                             | 0.302         | 0.220        | 0.233           | 1.284              |
| S46V, D48M, T49D, G51R, N76V,<br>F82G, Y116H, N156R                             | 0.596         | 0.267        | 0.319           | 1.871              |
| S46V, D48M, T49D, G51R, N76V,<br>F82I, Y116H, L159M                             | 0.554         | 0.284        | 0.327           | 1.691              |
| S46V, D48M, T49D, G51R, N76V,<br>F82R, Y116H, N156R                             | 0.746         | 0.326        | 0.388           | 1.923              |
| S46V, D48M, T49D, G51R, N76V,<br>F82R, Y116H, N156R, L159I                      | 0.679         | 0.305        | 0.361           | 1.882              |
| S46V, D48M, T49D, G51R, N76V,<br>F82R, Q84L, Y116H, N156K                       | 0.822         | 0.358        | 0.427           | 1.927              |
| S46V, D48M, T49D, G51R, N76V,<br>G81C, F82R, Q84L, Y116H, N156K                 | 0.694         | 0.313        | 0.369           | 1.878              |
| S46V, D48M, T49D, G51R, N76V,<br>Y116H, N156K, L159M                            | 0.676         | 0.284        | 0.343           | 1.973              |
| S46V, D48M, T49D, G51R, N76V,<br>Y116H, N156R, L159K                            | 0.563         | 0.284        | 0.329           | 1.711              |
| S46V, D48M, T49D, G51R, N76V,<br>Q84L, Y116H, L159M                             | 0.545         | 0.289        | 0.330           | 1.653              |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V,<br>F82I, N156K                                    | 1.486         | 0.505        | 0.662           | 2.242              |

| Mutaciones                                                    | FAME norm. | FFA norm. | Título norm. | % de FAME norm. |
|---------------------------------------------------------------|------------|-----------|--------------|-----------------|
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, F82I, Y116H, N156K              | 1.729      | 0.569     | 0.754        | 2.292           |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, F82I, Y116H, N156R, L159K       | 0.719      | 0.301     | 0.363        | 1.978           |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, F82R, Y116H                     | 0.854      | 0.345     | 0.427        | 1.998           |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, F82R, Q84L, Y116H, I148Y        | 0.357      | 0.209     | 0.231        | 1.528           |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Y116H, I148Y                    | 3.085      | 0.824     | 1.186        | 2.599           |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Y116H, N156K, L159M             | 2.230      | 0.621     | 0.877        | 2.543           |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Y116H, N156R                    | 1.554      | 0.493     | 0.664        | 2.343           |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84L, Y116H                     | 2.723      | 0.748     | 1.063        | 2.563           |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84L, Y116H, K150I              | 2.411      | 0.699     | 0.972        | 2.480           |
| S46V, D48M, T49W, G51R, N76V, F82G, Q84L, Y116H, I148Y        | 1.432      | 0.483     | 0.634        | 2.259           |
| S46V, D48M, T49W, G51R, N76V, F82G, Q84L, Y116H, N156K, L159K | 0.364      | 0.287     | 0.300        | 1.215           |
| S46V, D48M, T49W, G51R, N76V, F82I, Y116H                     | 0.495      | 0.288     | 0.321        | 1.537           |
| S46V, D48M, T49W, G51R, N76V, F82I, Y116H, N156R, L159M       | 0.466      | 0.270     | 0.302        | 1.543           |
| S46V, D48M, T49W, G51R, N76V, F82R, Y116H, L159M              | 0.282      | 0.261     | 0.265        | 1.063           |
| S46V, D48M, T49W, G51R, N76V, Q84L, Y116H, N156R, L159K       | 1.323      | 0.491     | 0.624        | 2.118           |

La tabla 13 muestra una lista de mutantes de combinación encontrados usando PIB9v2.0 (SEQ ID NO: 58) como molde en BD64.

Tabla 13

| Mutaciones                                                                        | FAME norm. | FFA norm. | Título norm. | % de FAME norm. |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------|--------------|-----------------|
| E37D, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, F82I, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L159M | 3.143      | 2.067     | 2.668        | 1.175           |
| E37D, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115Y, Y116H, I148Y                     | 3.859      | 1.827     | 2.962        | 1.305           |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, F82I, Y116H, I148Y, L159M                           | 1.088      | 1.211     | 1.143        | 0.953           |

|                                                                             |       |       |       |       |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, F82I, Y116H, I148Y, L159M, D164T              | 1.535 | 1.202 | 1.370 | 1.119 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, F82I, M94I, N115C, Y116H, I148Y               | 1.422 | 1.177 | 1.303 | 1.091 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, F82I, N115F, Y116H, I148Y                     | 2.010 | 1.099 | 1.568 | 1.281 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, F82I, V112L, N115F, Y116H, I148Y              | 1.216 | 1.030 | 1.128 | 1.079 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, G85S, N115W, Y116H, I148Y, L159M              | 1.137 | 1.173 | 1.154 | 0.986 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, H64N, N76V, N115F, Y116H, I148Y, D164T              | 1.116 | 0.907 | 1.013 | 1.102 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, I87V, V112L, N115W, Y116H, I148Y              | 1.776 | 1.022 | 1.405 | 1.266 |
| K32I, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115F, Y116H, I148Y, L159M        | 1.591 | 1.126 | 1.366 | 1.166 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, K65M, N76V, F82I, N115W, Y116H, I148Y, N156H        | 1.119 | 0.967 | 1.047 | 1.067 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, K65M, N76V, F82I, V112L, N115F, Y116H, I148Y        | 1.552 | 1.072 | 1.316 | 1.181 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, K65M, N76V, G85S, V112L, N115W, Y116H, I148Y, M155K | 0.755 | 0.722 | 0.739 | 1.017 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, K65M, N76V, Y116H, I148Y, L159M                     | 1.025 | 1.035 | 1.030 | 0.995 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, K65M, N76V, N115F, Y116H, I148Y                     | 1.831 | 1.103 | 1.487 | 1.229 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, K65M, N76V, N89K, V112L, N115Y, Y116H, I148Y        | 1.215 | 1.045 | 1.132 | 1.077 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, K65M, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y              | 1.650 | 0.957 | 1.325 | 1.244 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, K65M, N76V, V112L, N115Y, Y116H, I148Y              | 1.113 | 0.890 | 1.003 | 1.112 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Y116H, I148Y, L159M, D164T                    | 1.498 | 1.249 | 1.375 | 1.088 |
| L31M, Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Y116H, I148Y                | 1.184 | 1.370 | 1.276 | 0.927 |
| S46V, D48M, T49M, G51R, N52K, N76V, F82I, V112L, N115Y, Y116H, I148Y, D164T | 2.161 | 1.375 | 1.780 | 1.217 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, N115F, Y116H, I148Y, L159M                    | 1.358 | 1.100 | 1.230 | 1.103 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, N115W, Y116H, I148Y, D164T                    | 1.337 | 1.013 | 1.184 | 1.126 |

|                                                                                    |       |       |       |       |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, N115W, Y116H, I148Y, L159M                           | 1.906 | 1.118 | 1.537 | 1.240 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, N115Y, Y116H, I148Y, L159M                           | 1.267 | 1.013 | 1.155 | 1.096 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Y116H, I148Y, D164T                            | 1.790 | 1.385 | 1.599 | 1.122 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, F82I, Y116H, I148Y                             | 4.051 | 2.136 | 3.154 | 1.287 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, F82I, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L159M        | 4.148 | 1.636 | 3.039 | 1.359 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, F82I, V112L, N115Y, Y116H, I148Y, D164T        | 2.175 | 1.471 | 1.834 | 1.189 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, K65M, N76V, Y116H, I148Y                             | 1.733 | 1.303 | 1.525 | 1.136 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, K65M, N76V, N115W, Y116H, I148Y                      | 4.254 | 1.591 | 2.944 | 1.441 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, K65M, N76V, N89I, N115W, Y116H, I148Y                | 1.068 | 0.794 | 0.933 | 1.146 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, K65M, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L159M, D164T | 1.721 | 1.094 | 1.426 | 1.205 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, K65M, N76V, V112M, Y116H, I148Y, D164V               | 1.112 | 1.085 | 1.099 | 1.011 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115F, Y116H, I148Y, L159M                     | 2.353 | 1.381 | 1.882 | 1.252 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115W, Y116H, I148Y                            | 4.639 | 1.722 | 3.264 | 1.424 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115Y, Y116H, I148Y                            | 4.403 | 2.051 | 3.365 | 1.311 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115Y, Y116H, I148Y, D164T                     | 4.704 | 1.945 | 3.411 | 1.381 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, T59A, F82I, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L159M  | 1.898 | 1.171 | 1.577 | 1.200 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, Y116H, I148Y                            | 3.675 | 2.069 | 2.966 | 1.245 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y, A165V              | 1.366 | 1.092 | 1.230 | 1.109 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y, L159M              | 3.776 | 2.131 | 2.962 | 1.256 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52S, N76V, V112L, N115Y, Y116H, I148Y                     | 1.737 | 1.039 | 1.394 | 1.250 |
| P29R, Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, F82I, N115F, Y116H, I148Y, D164T   | 3.873 | 2.125 | 3.054 | 1.271 |
| Q28K, Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115F, Y116H, I148Y, D164T         | 4.385 | 2.210 | 3.366 | 1.303 |

|                                                                                         |       |       |       |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Q28K, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, F82I, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L159M | 4.201 | 2.708 | 3.497 | 1.207 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, F82I, N115W, Y116H, I148Y, D164T                    | 1.639 | 1.072 | 1.360 | 1.207 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, K65M, N76V, Y116H, K118R, I148Y                           | 0.987 | 0.985 | 0.986 | 1.003 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, K65M, N76V, V112L, N115Y, Y116H, I148Y                    | 1.168 | 0.979 | 1.084 | 1.077 |
| Q33A, S46V, D48M, T49V, G51R, K65M, N76V, N115Y, Y116H, I148Y, L159M                    | 1.046 | 0.900 | 0.976 | 1.071 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, N115Y                                               | 1.565 | 0.994 | 1.313 | 1.191 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, N115Y, Y116H, I148Y, L159M                          | 1.423 | 1.010 | 1.219 | 1.166 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, D77E, F82I, N115F, Y116H, I148Y               | 0.885 | 0.791 | 0.844 | 1.047 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, F82I, N115F, Y116H, I148Y, D164Y              | 2.639 | 1.713 | 2.230 | 1.187 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, F82I, R88C, N115F, Y116H, I148Y               | 4.148 | 2.157 | 3.269 | 1.270 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, K65M, N76V, F82I, Y116H, I148Y                      | 1.807 | 1.632 | 1.730 | 1.047 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, K65M, N76V, F82I, Y116H, K118Q, I148Y               | 4.314 | 2.663 | 3.585 | 1.204 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115F, Y116H, I148Y                           | 4.458 | 1.534 | 3.079 | 1.447 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, T59S, N76V, F82I, N115F, Y116H, I148Y, K162R, D164E | 4.215 | 2.129 | 3.295 | 1.280 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, T59A, N76V, V112L, Y116H, I148Y, D164T                    | 1.108 | 1.129 | 1.118 | 0.992 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, Y116H, I148Y, D164T                          | 1.265 | 1.119 | 1.196 | 1.059 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y, D164T                   | 1.823 | 1.108 | 1.486 | 1.229 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y, K162N, D164T            | 1.559 | 0.990 | 1.291 | 1.207 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y                          | 1.802 | 1.052 | 1.430 | 1.258 |
| Q33H, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, K65M, N76V, N115W, Y116H, I148Y                     | 2.564 | 1.315 | 1.949 | 1.318 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, F82I, N115W, Y116H, I148Y                           | 1.587 | 1.198 | 1.404 | 1.131 |

|                                                                                   |       |       |       |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, F82I, V112L, N115Y, Y116H, I148Y, L159M       | 1.432 | 1.351 | 1.396 | 1.017 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, I110S, N115W, Y116H, I148Y, L159M             | 0.983 | 0.920 | 0.952 | 1.030 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, K65M, N76V, Y116H, I148Y, L159M                     | 0.986 | 1.054 | 1.019 | 0.965 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, K65M, N76V, F82I, N115W, Y116H, I148Y               | 1.051 | 1.122 | 1.085 | 0.969 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, K65M, N76V, G81C, N115F, Y116H, I148Y, L159M, D164T | 1.027 | 0.746 | 0.894 | 1.142 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, K65M, N76V, N115F, Y116H, I148Y, L159M, D164T       | 1.846 | 1.048 | 1.469 | 1.254 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, L79M, V112L, N115Y, Y116H, I148Y              | 0.761 | 0.725 | 0.743 | 1.024 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, N115W, Y116H, I148Y                           | 1.960 | 1.238 | 1.603 | 1.222 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, N115W, Y116H, I148Y, L159M                    | 1.396 | 1.048 | 1.225 | 1.139 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Y116H, I148Y                            | 3.939 | 2.752 | 3.352 | 1.175 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, F82I, N115F, Y116H, I148Y, D164T        | 3.131 | 2.540 | 2.854 | 1.099 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, G53C, N76V, F82I, N115F, Y116H, I148Y, D164T  | 1.593 | 1.380 | 1.493 | 1.069 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, K65M, N76V, V112L, Y116H, I148Y, L159M        | 3.795 | 2.176 | 2.998 | 1.270 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115F, Y116H, I148Y                     | 5.164 | 2.018 | 3.639 | 1.421 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115Y, Y116H, I148Y                     | 4.774 | 1.710 | 3.289 | 1.454 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115Y, Y116H, I148Y, L159M, D164T       | 2.326 | 1.258 | 1.809 | 1.285 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, Y116H, I148Y                     | 4.278 | 2.041 | 3.230 | 1.330 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, Y116H, I148Y, D164Y              | 2.435 | 1.530 | 2.011 | 1.216 |
| Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q63K, Y68C, N115F, Y116H, I148Y   | 5.192 | 1.873 | 3.583 | 1.451 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, R51S, N52K, K65M, N76V, V112L, Y116H, I148Y, L159M  | 1.149 | 1.087 | 1.118 | 1.027 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y, D164T             | 2.316 | 1.030 | 1.714 | 1.351 |

|                                                                                         |       |       |       |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115Y, Y116H, I148Y                          | 1.243 | 0.982 | 1.114 | 1.115 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, Y68S, N76V, F82I, N115W, Y116H, I148Y, D164A              | 0.938 | 0.912 | 0.925 | 1.011 |
| Q34L, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, K65M, N76V, N115Y, Y116H, I148Y, D164T              | 2.948 | 1.885 | 2.425 | 1.206 |
| Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, F82I, Y116H, I148Y, D164T                           | 1.292 | 1.083 | 1.191 | 1.084 |
| Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, K65M, Y116H, I148Y                                  | 4.561 | 1.912 | 3.277 | 1.391 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, Y116H, I148Y, L159M                                | 1.384 | 1.257 | 1.328 | 1.043 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y                                | 2.333 | 1.105 | 1.729 | 1.351 |
| A30T, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, T86P, V112L, N115F, Y116H, I148Y                    | 1.158 | 0.762 | 0.983 | 1.178 |
| K32I, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y                    | 4.584 | 2.512 | 3.624 | 1.264 |
| K32N, S46V, D48R, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84V, N115W, Y116H, I148Y, L149F              | 3.361 | 2.327 | 2.888 | 1.164 |
| L5V, S22R, Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, I87V, N115F, Y116H, I148Y, L149M   | 3.457 | 1.962 | 2.765 | 1.250 |
| N2T, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84T, V112L, N115F, Y116H, K118Q, I148Y, L149M | 1.784 | 1.178 | 1.503 | 1.186 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, G81C, N115W, Y116H, I148Y                           | 3.148 | 1.848 | 2.546 | 1.236 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115F, Y116H, I148Y                                 | 4.305 | 3.298 | 3.839 | 1.125 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115F, Y116H, K118Q, I148Y                          | 4.547 | 2.847 | 3.743 | 1.214 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84A, V112L, N115F, Y116H, I148Y                    | 4.872 | 2.567 | 3.767 | 1.291 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84T, N115W, Y116H, I148Y, L149F                    | 4.840 | 2.692 | 3.809 | 1.270 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84T, V112L, N115F, Y116H, I148Y                    | 3.710 | 2.244 | 3.054 | 1.213 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84V, N115W, Y116H, I148Y, L149F                    | 2.744 | 1.925 | 2.369 | 1.159 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84V, V112L, N115F, Y116H, I148Y                    | 3.042 | 1.847 | 2.518 | 1.208 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84V, V112L, N115W, Y116H, K118Q, I148Y             | 1.944 | 1.219 | 1.608 | 1.208 |

|                                                                                                    |       |       |       |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y                                     | 4.686 | 2.599 | 3.719 | 1.259 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, N115F, Y116H, K118Q, I148Y                              | 5.314 | 2.799 | 4.163 | 1.276 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y                                     | 4.977 | 2.155 | 3.714 | 1.344 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, Q84A, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149M                        | 5.972 | 2.734 | 4.541 | 1.315 |
| P29L, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84T, V112L, N115F, Y116H, I148Y                         | 2.850 | 1.792 | 2.377 | 1.200 |
| P29L, Q33A, Q34R, I45M, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, F82L, R88H, V112L, N115W, Y116H, I148Y | 1.803 | 1.458 | 1.652 | 1.091 |
| Q28H, Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84T, V112L, N115W, Y116H, I148Y             | 3.820 | 1.882 | 2.889 | 1.322 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, L54M, N76V, Q84V, V112L, N115F                                       | 1.590 | 1.032 | 1.326 | 1.199 |
| Q33A, S46V, D48I, T49L, G51R, N52K, N76V, N115W, Y116H, I148Y, L149M                               | 1.458 | 1.126 | 1.306 | 1.116 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115F, Y116H, I148Y, L149M                               | 4.373 | 2.843 | 3.664 | 1.193 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115F, Y116H, I148Y, L149T                               | 4.515 | 3.220 | 3.947 | 1.144 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115W, Y116H, I148Y, L149M                               | 4.499 | 2.757 | 3.702 | 1.215 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84A, V112L, N115W, Y116H, K118Q, I148Y, L149T           | 2.859 | 1.522 | 2.226 | 1.284 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84A, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149M                  | 3.673 | 2.095 | 2.982 | 1.232 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84T, N115W, Y116H, I148Y                                | 3.231 | 1.937 | 2.610 | 1.235 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84V, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149F                  | 3.489 | 1.854 | 2.741 | 1.273 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y                               | 4.389 | 2.814 | 3.699 | 1.187 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, Y116H, I148Y, L149T                                      | 3.791 | 3.302 | 3.557 | 1.069 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N52S, N76V, Q84V, V112L, N115F, Y116H, I148Y                         | 1.751 | 0.996 | 1.393 | 1.256 |
| Q33A, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V                                                     | 4.215 | 4.136 | 4.181 | 1.008 |
| Q33A, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, P83R, Q84A, V112L, N115F, Y116H, K118Q, I148Y      | 3.306 | 2.121 | 2.782 | 1.189 |

|                                                                                         |       |       |       |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Q33A, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84A, V112L, N115F, Y116H, K118Q, I148Y | 4.736 | 3.094 | 4.010 | 1.181 |
| Q33A, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y              | 5.554 | 3.159 | 4.504 | 1.234 |
| Q33A, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, Y116H, I148Y, L149F                     | 3.728 | 3.273 | 3.510 | 1.062 |
| Q33A, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, Q84V, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149T | 5.915 | 2.816 | 4.427 | 1.335 |
| Q33A, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y, L149F       | 4.973 | 2.606 | 3.839 | 1.295 |
| Q33A, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84A, N115F, Y116H, I148Y                     | 1.535 | 0.921 | 1.254 | 1.224 |
| Q33A, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84V, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149T       | 1.508 | 1.013 | 1.270 | 1.187 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84A, V112L, N115W, Y116H, I148Y                    | 1.676 | 1.063 | 1.407 | 1.192 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84T, V112L, N115W, Y116H, I148Y                    | 1.373 | 0.956 | 1.186 | 1.158 |
| Q33A, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115F, Y116H, K118Q, I148Y, L149T            | 2.007 | 1.269 | 1.653 | 1.222 |
| Q33P, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y                    | 2.207 | 1.365 | 1.804 | 1.238 |
| Q33R, E37D, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, G81C, Q84A, V112L, N115W, Y116H, I148Y  | 3.331 | 1.850 | 2.645 | 1.259 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, N115F, Y116H, I148Y                                 | 1.776 | 1.148 | 1.485 | 1.195 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, N115F, Y116H, K118Q, I148Y, L149F                   | 1.966 | 1.146 | 1.599 | 1.230 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, F82V, V112L, N115F, Y116H, I148Y              | 3.586 | 2.808 | 3.242 | 1.106 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, G81C, N115F, Y116H, I148Y                     | 3.470 | 1.980 | 2.780 | 1.248 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, G81C, Q84A, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149M | 3.143 | 1.816 | 2.535 | 1.240 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, L79M, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149T       | 2.892 | 1.774 | 2.392 | 1.209 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115W, Y116H, I148Y                           | 3.279 | 2.324 | 2.852 | 1.149 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84A, V112L, N115F, Y116H, I148Y, L149F       | 3.751 | 2.345 | 3.134 | 1.197 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84A, V112L, N115F, Y116H, I148Y, L149F       | 1.426 | 1.098 | 1.282 | 1.113 |

|                                                                                          |       |       |       |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| M154I                                                                                    |       |       |       |       |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84A, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149M        | 6.010 | 2.759 | 4.521 | 1.329 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84A, V112L, N115W, Y116H, I148H               | 1.968 | 1.221 | 1.622 | 1.212 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84K, V112L, N115F, Y116H, I148Y               | 2.521 | 1.712 | 2.164 | 1.166 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84T, N115F, Y116H, I148Y, L149M               | 3.052 | 2.022 | 2.591 | 1.178 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84T, V112L, N115F, Y116H, I148Y               | 3.220 | 1.947 | 2.630 | 1.224 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84T, V112L, N115F, Y116H, K118Q, I148Y, L149T | 4.980 | 2.989 | 4.068 | 1.224 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84T, V112L, N115W, Y116H, I148Y               | 3.012 | 1.832 | 2.490 | 1.210 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84V, V112L, N115F, Y116H, K118Q, I148Y, L149F | 4.921 | 2.656 | 3.834 | 1.283 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84V, V112L, N115W, Y116H, K118Q, I148Y        | 2.999 | 1.686 | 2.398 | 1.249 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84V, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149F        | 3.750 | 1.961 | 2.931 | 1.279 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y                     | 4.702 | 2.750 | 3.839 | 1.225 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y                     | 5.424 | 2.806 | 4.253 | 1.276 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149M              | 6.026 | 2.682 | 4.477 | 1.345 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149T              | 4.563 | 2.572 | 3.672 | 1.242 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, Y116H, I148Y, L149F                            | 4.017 | 3.432 | 3.736 | 1.075 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, N115W, Y116H, I148Y                            | 5.463 | 2.558 | 4.068 | 1.343 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, Q84A, N115F, Y116H, I148Y, L149F               | 4.830 | 2.877 | 3.893 | 1.241 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, Q84A, V112L, N115F, Y116H, K118Q, I148Y, L149M | 2.939 | 1.666 | 2.381 | 1.235 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, Q84T, V112L, N115F, Y116H, I148Y               | 3.105 | 1.992 | 2.607 | 1.191 |

|                                                                                                |       |       |       |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, T86P, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149T              | 5.372 | 2.835 | 4.251 | 1.265 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y                           | 4.105 | 2.503 | 3.388 | 1.211 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, V112L, N115F, Y116H, K118Q, I148Y, L149M             | 3.385 | 2.212 | 2.871 | 1.175 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149T                    | 6.042 | 2.468 | 4.462 | 1.354 |
| Q33R, Q34K, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84V, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149T              | 1.484 | 0.957 | 1.231 | 1.205 |
| Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115W                                          | 1.665 | 1.313 | 1.497 | 1.112 |
| Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, A67T, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y, L149M, M155I | 1.891 | 1.298 | 1.610 | 1.174 |
| Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115W, Y116H, K118Q, I148Y                     | 4.801 | 2.910 | 3.895 | 1.231 |
| Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84A, V112L, N115F, Y116H, I148Y, L149F        | 5.024 | 2.719 | 4.005 | 1.254 |
| Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84T, V112L, N115W, Y116H, I148Y               | 5.007 | 2.275 | 3.695 | 1.354 |
| Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84V, N115F, Y116H, I148Y, K133R, L149T        | 3.340 | 2.027 | 2.711 | 1.231 |
| Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84V, N115F, Y116H, I148Y, L149T               | 3.305 | 2.106 | 2.730 | 1.210 |
| Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y                     | 4.894 | 2.294 | 3.645 | 1.343 |
| Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y, L149M              | 4.942 | 2.527 | 3.799 | 1.300 |
| Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149F              | 6.145 | 2.696 | 4.566 | 1.346 |
| Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, Q84V, N115W, Y116H, K118Q, I148Y, L149M        | 5.301 | 2.946 | 4.223 | 1.255 |
| Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y                     | 5.818 | 2.358 | 4.270 | 1.363 |
| Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84A, V112L, N115F, Y116H, I148Y, L149F, G158C       | 1.854 | 1.113 | 1.527 | 1.215 |
| Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y                     | 2.840 | 1.559 | 2.225 | 1.275 |
| Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y                           | 1.685 | 0.926 | 1.346 | 1.253 |
| Q33R, Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115W, Y116H, K118Q, I148Y                    | 1.501 | 1.097 | 1.314 | 1.142 |

|                                                                                    |       |       |       |       |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84A, N115F, Y116H, I148Y, L149F               | 1.737 | 1.143 | 1.452 | 1.196 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84A, N115W, Y116H, K118Q, I148Y               | 1.967 | 1.441 | 1.726 | 1.140 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84A, N89H, N115W, Y116H, K118Q, I148Y         | 1.225 | 1.050 | 1.145 | 1.070 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84T, V112L, N115F, Y116H, I148Y               | 1.695 | 1.019 | 1.382 | 1.226 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84V, N115F, Y116H, I148Y, L149T               | 1.640 | 1.024 | 1.348 | 1.216 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84V, T86P, V112L, N115F, Y116H, I148Y, L149M  | 2.225 | 1.168 | 1.717 | 1.295 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, R56H, N76V, N115F, Y116H, K118Q, I148Y, L149F        | 0.986 | 0.818 | 0.911 | 1.083 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y                     | 4.155 | 2.220 | 3.289 | 1.262 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y, L149M              | 2.305 | 1.130 | 1.742 | 1.322 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y, L149T              | 1.756 | 1.057 | 1.447 | 1.213 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y                     | 1.825 | 1.178 | 1.529 | 1.194 |
| Q33R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149M              | 1.821 | 1.164 | 1.530 | 1.190 |
| Q34K, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84V, V112L, N115F, Y116H, I148Y         | 1.571 | 1.126 | 1.376 | 1.142 |
| Q34K, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y               | 2.881 | 1.734 | 2.374 | 1.214 |
| Q34L, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, N115F, Y116H, K118Q, I148Y               | 5.058 | 2.819 | 3.998 | 1.264 |
| Q34R, G35A, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84A, V112L, N115F, Y116H, I148Y, L149T  | 1.792 | 1.116 | 1.493 | 1.200 |
| Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, N115W, Y116H, I148Y                            | 2.409 | 1.476 | 1.961 | 1.205 |
| Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52K, N76V, Q84A, V112L, N115F, Y116H, I148Y, L149T  | 5.576 | 2.923 | 4.304 | 1.294 |
| Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, N115W, Y116H, I148Y                      | 5.448 | 2.512 | 4.039 | 1.348 |
| Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N52R, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149F        | 3.948 | 1.967 | 3.080 | 1.282 |
| Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84A, V112L, N115F, Y116H, I147L, I148Y, L149T | 1.061 | 0.669 | 0.888 | 1.195 |

|                                                                             |       |       |       |       |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84A, V112L, N115F, Y116H, I148Y, L149T | 1.961 | 1.090 | 1.576 | 1.244 |
| Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84T, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149F | 1.823 | 1.156 | 1.531 | 1.191 |
| Q34R, S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84V, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149M | 1.684 | 1.102 | 1.429 | 1.179 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84T, N115W, Y116H, I148Y, L149T              | 1.146 | 0.904 | 1.034 | 1.108 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, Q84V, V112L, N115F, Y116H, K118Q, I148Y       | 1.599 | 0.886 | 1.257 | 1.271 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115F, Y116H, I148Y                    | 2.233 | 1.193 | 1.735 | 1.287 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115W, Y116H, K118Q, I148Y, L149F      | 1.649 | 1.026 | 1.370 | 1.204 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149F             | 2.150 | 1.111 | 1.652 | 1.301 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149M             | 1.810 | 1.166 | 1.525 | 1.187 |
| S46V, D48M, T49L, G51R, N76V, V112L, N115W, Y116H, I148Y, L149T             | 1.657 | 1.059 | 1.395 | 1.188 |

**Lista de secuencias**

&lt;110&gt; REG Life sciences, LLC

5 &lt;120&gt; VARIANTES ENZIMÁTICAS CON PROPIEDADES DE ÉSTER SINTASA MEJORADAS

&lt;130&gt; EP92586FZRPpau

&lt;140&gt; 13714142.0

10 &lt;141&gt; 15-03-2013

&lt;150&gt; PCT/US2013/032564

&lt;151&gt; 15-03-2013

15 &lt;150&gt; 61/708.424

&lt;151&gt; 01-10-2012

&lt;150&gt; 61/701.191

&lt;151&gt; 14-09-2012

20

&lt;160&gt; 66

&lt;170&gt; PatentIn versión 3.5

25 &lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1422

&lt;212&gt; ADN

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

30 &lt;400&gt; 1

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| atgaaacgtc tcggaaccct ggacgcctcc tggctggcgg ttgaatctga agacaccccg  | 60   |
| atgcatgtgg gtacgcttca gattttctca ctgccggaag gcgcaccaga aaccttcctg  | 120  |
| cgtgacatgg tcactcgaat gaaagaggcc ggcgatgtgg caccaccctg gggatacaaa  | 180  |
| ctggcctggg ctggtttcct cgggcgcgtg atcgcccccg cctggaaagt cgataaggat  | 240  |
| atcgatctgg attatcacgt ccggcactca gccctgcctc gcccggcg ggagcgcgaa    | 300  |
| ctgggtattc tggatatccg actgcactct aacccctgg atttttcccg ccctctttgg   | 360  |
| gaatgccacg ttattgaagg cctggagaat aaccgttttg ccctttacac caaaatgcac  | 420  |
| cactcgatga ttgacggcat cagcggcgtg cgactgatgc agagggtgct caccaccgat  | 480  |
| cccgaacgct gcaatatgcc accgccctgg acggtacgcc cacaccagcg ccgtgggtgca | 540  |
| aaaaccgaca aagaggccag cgtgcccga gcggtttccc aggcaatgga cgccctgaag   | 600  |
| ctccaggcag acatggcccc caggctgtgg caggccggca atcgccctggg gcattcggtt | 660  |
| cgacacccgg aagacggact gaccgcgcc ttcactggac cggtttcggt gctcaatcac   | 720  |
| cgggttaccg cgcagcgacg ttttgccacc cagcattatc aactggaccg gctgaaaaac  | 780  |
| ctggcccatg cttccggcgg ttccttgaac gacatcggtc tttacctgtg tggcaccgca  | 840  |
| ttgcggcgct ttctggctga gcagaacaat ctgccagaca ccccgctgac ggctgggtata | 900  |
| ccggtgaata tccggccggc agacgacgag ggtacgggca cccagatcag ttttatgatt  | 960  |
| gcctcgctgg ccaccgacga agctgatccg ttgaaccgcc tgcaacagat caaaacctcg  | 1020 |
| acccgacggg ccaaggagca cctgcagaaa cttccaaaaa gtgccctgac ccagtacacc  | 1080 |
| atgctgctga tgtcacccta cattctgcaa ttgatgtcag gtctcggggg gaggatgcga  | 1140 |
| ccagtcttca acgtgaccat ttccaacgtg cccggcccg aaggcacgct gtattatgaa   | 1200 |
| ggagcccggc ttgaggccat gtatccggta tcgctaatac ctcacggcgg cgccctgaac  | 1260 |
| atcacctgcc tgagctatgc cggatcgctg aatttcgggtt ttaccggctg tcgggatacg | 1320 |
| ctgccgagca tgcagaaact ggcggtttat accggtgaag ctctggatga gctggaatcg  | 1380 |
| ctgattctgc cacccaagaa gcgcgcccga acccgcaagt aa                     | 1422 |

<210> 2

<211> 473

5 <212> PRT

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 2

Met Lys Arg Leu Gly Thr Leu Asp Ala Ser Trp Leu Ala Val Glu Ser  
1 5 10 15

Glu Asp Thr Pro Met His Val Gly Thr Leu Gln Ile Phe Ser Leu Pro  
20 25 30

Glu Gly Ala Pro Glu Thr Phe Leu Arg Asp Met Val Thr Arg Met Lys  
35 40 45

Glu Ala Gly Asp Val Ala Pro Pro Trp Gly Tyr Lys Leu Ala Trp Ser  
50 55 60

Gly Phe Leu Gly Arg Val Ile Ala Pro Ala Trp Lys Val Asp Lys Asp  
65 70 75

Ile Asp Leu Asp Tyr His Val Arg His Ser Ala Leu Pro Arg Pro Gly  
80 85 90 95

Gly Glu Arg Glu Leu Gly Ile Leu Val Ser Arg Leu His Ser Asn Pro  
100 105 110

Leu Asp Phe Ser Arg Pro Leu Trp Glu Cys His Val Ile Glu Gly Leu  
115 120 125

Glu Asn Asn Arg Phe Ala Leu Tyr Thr Lys Met His His Ser Met Ile  
130 135 140

Asp Gly Ile Ser Gly Val Arg Leu Met Gln Arg Val Leu Thr Thr Asp  
145 150 155

Pro Glu Arg Cys Asn Met Pro Pro Pro Trp Thr Val Arg Pro His Gln  
160 165 170 175

Arg Arg Gly Ala Lys Thr Asp Lys Glu Ala Ser Val Pro Ala Ala Val  
180 185 190

Ser Gln Ala Met Asp Ala Leu Lys Leu Gln Ala Asp Met Ala Pro Arg  
195 200 205

Leu Trp Gln Ala Gly Asn Arg Leu Val His Ser Val Arg His Pro Glu  
 210 215 220  
 Asp Gly Leu Thr Ala Pro Phe Thr Gly Pro Val Ser Val Leu Asn His  
 225 230 235  
 Arg Val Thr Ala Gln Arg Arg Phe Ala Thr Gln His Tyr Gln Leu Asp  
 240 245 250 255  
 Arg Leu Lys Asn Leu Ala His Ala Ser Gly Gly Ser Leu Asn Asp Ile  
 260 265 270  
 Val Leu Tyr Leu Cys Gly Thr Ala Leu Arg Arg Phe Leu Ala Glu Gln  
 275 280 285  
 Asn Asn Leu Pro Asp Thr Pro Leu Thr Ala Gly Ile Pro Val Asn Ile  
 290 295 300  
 Arg Pro Ala Asp Asp Glu Gly Thr Gly Thr Gln Ile Ser Phe Met Ile  
 305 310 315  
 Ala Ser Leu Ala Thr Asp Glu Ala Asp Pro Leu Asn Arg Leu Gln Gln  
 320 325 330 335  
 Ile Lys Thr Ser Thr Arg Arg Ala Lys Glu His Leu Gln Lys Leu Pro  
 340 345 350  
 Lys Ser Ala Leu Thr Gln Tyr Thr Met Leu Leu Met Ser Pro Tyr Ile  
 355 360 365  
 Leu Gln Leu Met Ser Gly Leu Gly Gly Arg Met Arg Pro Val Phe Asn  
 370 375 380  
 Val Thr Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Glu Gly Thr Leu Tyr Tyr Glu  
 385 390 395  
 Gly Ala Arg Leu Glu Ala Met Tyr Pro Val Ser Leu Ile Ala His Gly  
 400 405 410 415  
 Gly Ala Leu Asn Ile Thr Cys Leu Ser Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe  
 420 425 430  
 Gly Phe Thr Gly Cys Arg Asp Thr Leu Pro Ser Met Gln Lys Leu Ala  
 435 440 445  
 Val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Asp Glu Leu Glu Ser Leu Ile Leu Pro  
 450 455 460  
 Pro Lys Lys Arg Ala Arg Thr Arg Lys  
 465 470

<210> 3  
 <211> 1422  
 <212> ADN  
 <213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

5  
 <400> 3  
 atgaaacgtc tcggaaccct gaacgcctcc tggctggcgg ttgaatctga agacaccccg 60  
 atgcatgtgg gtacgcttca gattttctca ctgccggaag gcgcaccaga aaccttcctg 120  
 cgtgacatgg tcactcgaat gaaagaggcc ggcgatgtgg caccaccctg gggatacaaa 180  
 ctggcctggt ctggtttcct cgggcgcgtg atcgcctcgc cctggaaagt cgataaggat 240  
 atcgatctgg attatcacgt ccggcactca gccctgcctc gcccggcg ggagcgcgaa 300  
 ctgggtattc tggatatccg actgcactct aacccctgg atttttcccg ccctctttgg 360  
 gaatgccacg ttattgaagg cctggagaat aaccgttttg ccctttacac caaatgcac 420  
 cactcgatga ttgacggcat cagcggcggt cgactgatgc agaggggtgct caccaccgat 480  
 cccgaacgct gcaatatgcc accgccctgg acggtacgcc cacaccaacg ccgtggtgta 540  
 aaaaccgaca aagaggccag cgtgcccga gcggtttccc aggcaatgga cgccctgaag 600  
 ctccaggcag acatggcccc caggctgtgg caggccggca atcgctggt gcattcggtt 660  
 cgacaccggg aagacggact gaccgcgcc ttcactggac cggtttcggt gctcaatcac 720  
 cgggttaccg cgcagcgacg ttttgccacc cagcattatc aactggaccg gctgaaaaac 780  
 ctggcccatg cttccggcgg ttccttgaac gacatcggtc tttacctgtg tggcaccgca 840  
 ttgcggcgct ttctggctga gcagaacaat ctgccagaca ccccgctgac ggctggtata 900  
 ccggtgaata tccggccggc agacgacgag ggtacgggca cccagatcag ttttatgatt 960  
 gcctcgctgg ccaccgacga agctgatccg ttgaaccgcc tgcaacagat caaacctcg 1020  
 acccgacggg ccaaggagca cctgcagaaa cttccaaaaa gtgccctgac ccagtacacc 1080  
 atgctgctga tgtcacccta cattctgcaa ttgatgtcag gtctcggggg gaggatgca 1140  
 ccattcttca acgtgaccat ttccaacgtg cccggcccgg aaggcacgct gtattatgaa 1200  
 ggagcccggc ttgaggccat gtatccggtg tcgctaactg ctcacggcgg cgccctgaac 1260  
 atcacctgcc tgagctatgc cggatcgctg aatttcggtt ttaccggctg tcgggatacg 1320  
 ctgccgagca tgcagaaact ggcggtttat accggtgaag ctctggatga gctggaatcg 1380  
 ctgattctgc caccgaagaa gcgcgcccga acccgcaagt aa 1422

<210> 4  
 <211> 473  
 <212> PRT  
 <213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

10  
 <400> 4  
 Met Lys Arg Leu Gly Thr Leu Asn Ala Ser Trp Leu Ala Val Glu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Thr Pro Met His Val Gly Thr Leu Gln Ile Phe Ser Leu Pro  
 20 25 30  
 15

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

Arg Pro Ala Asp Asp Glu Gly Thr Gly Thr Gln Ile Ser Phe Met Ile  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Leu Ala Thr Asp Glu Ala Asp Pro Leu Asn Arg Leu Gln Gln  
 325 330 335  
 Ile Lys Thr Ser Thr Arg Arg Ala Lys Glu His Leu Gln Lys Leu Pro  
 340 345 350  
 Lys Ser Ala Leu Thr Gln Tyr Thr Met Leu Leu Met Ser Pro Tyr Ile  
 355 360 365  
 Leu Gln Leu Met Ser Gly Leu Gly Gly Arg Met Arg Pro Phe Phe Asn  
 370 375 380  
 Val Thr Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Glu Gly Thr Leu Tyr Tyr Glu  
 385 390 395 400  
 Gly Ala Arg Leu Glu Ala Met Tyr Pro Val Ser Leu Ile Ala His Gly  
 405 410 415  
 Gly Ala Leu Asn Ile Thr Cys Leu Ser Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe  
 420 425 430  
 Gly Phe Thr Gly Cys Arg Asp Thr Leu Pro Ser Met Gln Lys Leu Ala  
 435 440 445  
 Val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Asp Glu Leu Glu Ser Leu Ile Leu Pro  
 450 455 460  
 Pro Lys Lys Arg Ala Arg Thr Arg Lys  
 465 470

<210> 5

<211> 1422

5 <212> ADN

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 5

|            |            |            |            |            |            |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| atgaaacgtc | tcggaaccct | gaacgcctcc | tggctggcgg | ttgaatctga | agacaccccg | 60   |
| atgcatgtgg | gtacgcttca | gattttctca | ctgccggaag | gcgcaccaga | aaccttcctg | 120  |
| cgtgacatgg | tcactcgaat | gaaagaggcc | ggcgtatgtg | caccaccctg | gggatacaaa | 180  |
| ctggcctggt | ctggtttctt | cgggcgcgtg | atcgccccgg | cctggaaagt | cgataaggat | 240  |
| atcgatctgg | attatcacgt | ccggcactca | gccctgcctc | gccccggcgg | ggagcgcgaa | 300  |
| ctgggtattc | tggatatccg | actgcactct | aacccccctg | atttttcccg | ccctcttttg | 360  |
| gaatgccacg | ttattgaagg | cctggagaat | aaccgttttg | ccctttacac | caaaatgcac | 420  |
| cactcgatga | ttgacggcat | cagcggcgtg | cgactgatgc | agaggggtgt | caccaccgat | 480  |
| cccgaacgct | gcaatatgcc | accgccctgg | acgggtacgc | cacaccaacg | ccgtggtgta | 540  |
| aaaaccgaca | aagaggccag | cgtgcccgcg | gcggtttccc | aggcaatgga | cgccctgaag | 600  |
| ctccaggcag | acatggcccc | caggctgtgg | caggccggca | atcgccctgt | gcattcgggt | 660  |
| cgacacccgg | aagacggact | gaccgcgccc | ttcactggac | cggtttcggg | gctcaatcac | 720  |
| cgggttaccg | cgcagcgacg | ttttgccacc | cagcattatc | aactggaccg | gctgaaaaac | 780  |
| ctggcccatg | cttccggcgg | ttccttgaac | gacatcgttc | tttacctgtg | tggcaccgca | 840  |
| ttgcggcgct | ttctggctga | gcagaacaat | ctgccagaca | ccccgctgac | ggctggtata | 900  |
| ccggtgaata | tccggccggc | agacgacgag | ggtacgggca | cccagatcag | ttttatgatt | 960  |
| gcctcgctgg | ccaccgacga | agctgatccg | ttgaaccgcc | tgcaacagat | caaaacctcg | 1020 |
| acccgacggg | ccaaggagca | cctgaggaaa | cttccaaaaa | gtgccctgac | ccagtacacc | 1080 |
| atgctgctga | tgtcaccta  | cattctgcaa | ttgatgtcag | gtctcggggg | gaggatgcga | 1140 |
| ccattcttca | acgtgaccat | ttccaacgtg | cccggccccg | aaggcacgct | gtattatgaa | 1200 |
| ggagcccggc | ttgaggccat | gtatccggta | tcgctaatac | ctcacggcgg | cgccctgaac | 1260 |
| atcacctgcc | tgagctatgc | cggatcgctg | aatttcgggt | ttaccggctg | tcgggatacg | 1320 |
| ctgccgagca | tgagaaaact | ggcggtttat | accggtgaag | ctctggatga | gctggaatcg | 1380 |
| ctgattctgc | caccaagaa  | gcgcgcccga | acccgcaagt | aa         |            | 1422 |

<210> 6

<211> 473

<212> PRT

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 6

Met Lys Arg Leu Gly Thr Leu Asn Ala Ser Trp Leu Ala Val Glu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Thr Pro Met His Val Gly Thr Leu Gln Ile Phe Ser Leu Pro  
 20 25 30  
 Glu Gly Ala Pro Glu Thr Phe Leu Arg Asp Met Val Thr Arg Met Lys  
 35 40 45  
 Glu Ala Gly Asp Val Ala Pro Pro Trp Gly Tyr Lys Leu Ala Trp Ser  
 50 55 60  
 Gly Phe Leu Gly Arg Val Ile Ala Pro Ala Trp Lys Val Asp Lys Asp  
 65 70 75 80  
 Ile Asp Leu Asp Tyr His Val Arg His Ser Ala Leu Pro Arg Pro Gly  
 85 90 95  
 Gly Glu Arg Glu Leu Gly Ile Leu Val Ser Arg Leu His Ser Asn Pro  
 100 105 110  
 Leu Asp Phe Ser Arg Pro Leu Trp Glu Cys His Val Ile Glu Gly Leu

ES 2 647 412 T3

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

|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |     |            |            |            |            |     |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|------------|------------|------------|------------|-----|-----|
| 385        |            |            |            |            | 390        |            |            |            |            |     | 395        |            |            |            |     | 400 |
| Gly        | Ala        | Arg        | Leu        | Glu<br>405 | Ala        | Met        | Tyr        | Pro        | Val<br>410 | Ser | Leu        | Ile        | Ala        | His<br>415 | Gly |     |
| Gly        | Ala        | Leu        | Asn<br>420 | Ile        | Thr        | Cys        | Leu        | Ser<br>425 | Tyr        | Ala | Gly        | Ser        | Leu<br>430 | Asn        | Phe |     |
| Gly        | Phe        | Thr<br>435 | Gly        | Cys        | Arg        | Asp        | Thr<br>440 | Leu        | Pro        | Ser | Met        | Gln<br>445 | Lys        | Leu        | Ala |     |
| Val        | Tyr<br>450 | Thr        | Gly        | Glu        | Ala        | Leu<br>455 | Asp        | Glu        | Leu        | Glu | Ser<br>460 | Leu        | Ile        | Leu        | Pro |     |
| Pro<br>465 | Lys        | Lys        | Arg        | Ala        | Arg<br>470 | Thr        | Arg        | Lys        |            |     |            |            |            |            |     |     |

<210> 7  
<211> 1422  
<212> ADN  
<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

|         |             |            |            |            |            |            |      |
|---------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| <400> 7 | atgaaacgctc | tcggaaccct | gaacgcctcc | tggctggcgg | ttgaatctga | agacaccccg | 60   |
|         | atgcatgtgg  | gtacgcttca | gattttctca | ctgccggaag | gcgcaccaga | aaccttcctg | 120  |
|         | cgtgacatgg  | tcactcgaat | gaaagaggcc | ggcgatgtgg | caccaccctg | gggatacaaa | 180  |
|         | ctggcctggg  | ctggtttctt | cgggcgcgtg | atcgccccgg | cctggaaagt | cgataaggat | 240  |
|         | atcgatctgg  | attatcacgt | ccggcactca | gccctgcctc | gccccggcgg | ggagcgcgaa | 300  |
|         | ctgggtattc  | tggtatccc  | actgcactct | aacccccctg | atttttccc  | ccctctttgg | 360  |
|         | gaatgccacg  | ttattgaagg | cctggagaat | aaccgttttg | ccctttacac | caaatgcac  | 420  |
|         | cactcgatga  | ttgacggcat | cagcggcgtg | cgactgatgc | agaggggtgt | caccaccgat | 480  |
|         | cccgaacgct  | gcaatatgcc | accgccctgg | acggtacgcc | cacaccaacg | ccgtggtgta | 540  |
|         | aaaaccgaca  | aagaggccag | cgtgcccgca | gcggtttccc | aggcaatgga | cgccctgaag | 600  |
|         | ctccaggcag  | acatggcccc | caggctgtgg | caggccggca | atcgccctgg | gcattcgggt | 660  |
|         | cgacacccgg  | aagacggact | gaccgcgccc | ttcactggac | cggtttcggt | gctcaatcac | 720  |
|         | cgggttaccg  | cgcagcgacg | ttttgccacc | cagcattatc | aactggaccg | gctgaaaaac | 780  |
|         | ctggcccatg  | cttcggcg   | ttccttgaac | gacatcgttc | ttacctgtg  | tggcaccgca | 840  |
|         | ttgcggcgct  | ttctggctga | gcagaacaat | ctgccagaca | ccccgctgac | ggctggtata | 900  |
|         | ccggtgaata  | tccggccggc | agacgacgag | ggtacgggca | cccagatcag | ttttatgatt | 960  |
|         | gcctcgctgg  | ccaccgacga | agctgatccg | ttgaaccgcc | tgcaacagat | caaacctcg  | 1020 |
|         | acccgacggg  | ccaaggagca | cctgcagaaa | cttccaaaaa | gtgccctgac | ccagtacacc | 1080 |
|         | atgctgctga  | tgtcacccta | cattctgcaa | ttgatgtcag | gtctcggggg | gaggatgcga | 1140 |
|         | ccattcttca  | acgtgaccat | ttccaacgtg | cccggccccg | aaggcacgct | gtattatgaa | 1200 |

# ES 2 647 412 T3

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ggagcccggc ttgaggccat gtatccggtg tcgctaatacg ctcacggcgg cgcctgaac  | 1260 |
| atcacctgcc tgagctatgc cggatcgctg aatttcgggtt ttaccggctg tcgggatacg | 1320 |
| ctgccgagca tgcagaaact ggcgggtttat accggtgaag ctctggatga gctggaatcg | 1380 |
| ctgattctgc cacccaagaa gcgcgcccga acccgcaagt aa                     | 1422 |

<210> 8

<211> 473

5 <212> PRT

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 8

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

Leu Trp Gln Ala Gly Asn Arg Leu Val His Ser Val Arg His Pro Glu  
 210 215 220  
 Asp Gly Leu Thr Ala Pro Phe Thr Gly Pro Val Ser Val Leu Asn His  
 225 230 235 240  
 Arg Val Thr Ala Gln Arg Arg Phe Ala Thr Gln His Tyr Gln Leu Asp  
 245 250 255  
 Arg Leu Lys Asn Leu Ala His Ala Ser Gly Gly Ser Leu Asn Asp Ile  
 260 265 270  
 Val Leu Tyr Leu Cys Gly Thr Ala Leu Arg Arg Phe Leu Ala Glu Gln  
 275 280 285  
 Asn Asn Leu Pro Asp Thr Pro Leu Thr Ala Gly Ile Pro Val Asn Ile  
 290 295 300  
 Arg Pro Ala Asp Asp Glu Gly Thr Gly Thr Gln Ile Ser Phe Met Ile  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Leu Ala Thr Asp Glu Ala Asp Pro Leu Asn Arg Leu Gln Gln  
 325 330 335  
 Ile Lys Thr Ser Thr Arg Arg Ala Lys Glu His Leu Gln Lys Leu Pro  
 340 345 350  
 Lys Ser Ala Leu Thr Gln Tyr Thr Met Leu Leu Met Ser Pro Tyr Ile  
 355 360 365  
 Leu Gln Leu Met Ser Gly Leu Gly Gly Arg Met Arg Pro Phe Phe Asn  
 370 375 380  
 Val Thr Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Glu Gly Thr Leu Tyr Tyr Glu  
 385 390 395 400  
 Gly Ala Arg Leu Glu Ala Met Tyr Pro Val Ser Leu Ile Ala His Gly  
 405 410 415  
 Gly Ala Leu Asn Ile Thr Cys Leu Ser Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe  
 420 425 430  
 Gly Phe Thr Gly Cys Arg Asp Thr Leu Pro Ser Met Gln Lys Leu Ala  
 435 440 445  
 Val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Asp Glu Leu Glu Ser Leu Ile Leu Pro  
 450 455 460  
 Pro Lys Lys Arg Ala Arg Thr Arg Lys  
 465 470

<210> 9  
 <211> 1422  
 <212> ADN  
 <213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

5  
 <400> 9  
 atgaaacgtc tcggaaccct gaacgcctcc tggctggcgg ttgaatctga agacaccccg 60  
 atgcatgtgg gtacgcttca gattttctca ctgccggaag gcgcaccaga aaccttcctg 120  
 cgtgacatgg tcaactcgaat gaaagaggcc ggcgatgtgg caccaccctg gggatacaaa 180  
 ctggcctggt ctggtttcct cgggcgcgtg atcgccccgg cctggaaagt cgataaggat 240  
 atcgatctgg attatcacgt ccggcactca gccctgcctc gccccggcgg ggagcgcgaa 300  
 ctgggtattc tggatatccc actgcaactc aacccccctg atttttcccg ccctctttgg 360  
 gaatgccacg ttattgaagg cctggagaat aaccgttttg ccctttacac caaaatgcac 420  
 cactcgatga ttgacggcat cagcggcgtg cgactgatgc agagggtgct caccaccgat 480  
 cccgaacgct gcaatatgcc accgccctgg acggtacgcc cacaccaacg ccgtggtgta 540  
 aaaaccgaca aagaggccag cgtgcccga gcggtttccc aggcaatgga cgccctgaag 600  
 ctccaggcag acatggcccc caggctgtgg caggccggca atcgccctggt gcattcgggt 660  
 cgacacccgg aagacggact gaccgcgcc ttcactggac cggtttcggt gctcaatcac 720  
 cgggttaccg cgcagcgacg ttttgccacc cagcattatc aactggaccg gctgaaaaac 780  
 ctggcccatg cttccggcgg ttccttgaac gacatcgtgc ttacactgtg tggcaccgca 840  
 ttgcggcgct ttctggctga gcagaacaat ctgccagaca ccccgctgac ggctggtata 900  
 ccggtgaata tccggccggc agacgacgag ggtacgggca cccagatcag ttttatgatt 960  
 gcctcgctgg ccaccgacga agctgatccg ttgaaccgcc tgcaacagat caaaacctcg 1020  
 acccgacggg ccaaggagca cctgaggaaa cttccaaaaa gtgccctgac ccagtacacc 1080  
 atgctgctga tgtcaccta cattctgcaa ttgatgtcag gtctcggggg gaggatgcga 1140  
 ccattcttca acgtgaccat ttccaacgtg cccggccccg aaggcacgct gtattatgaa 1200  
 ggagcccggc ttgaggccat gtatccggtg tcgctaatac ctcacggcgg cgccctgaac 1260  
 atcacctgcc tgagctatgc cggatcgctg aatttcgggt ttaccggctg tcgggatacg 1320  
 ctgccgagca tgcagaaact ggcggtttat accggtgaag ctctggatga gctggaatcg 1380  
 ctgattctgc cacccaagaa gcgcgcccga acccgcaagt aa 1422

10 <210> 10  
 <211> 473  
 <212> PRT  
 <213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

15 <400> 10

Met Lys Arg Leu Gly Thr Leu Asn Ala Ser Trp Leu Ala Val Glu Ser  
 1 5 10 15

Glu Asp Thr Pro Met His Val Gly Thr Leu Gln Ile Phe Ser Leu Pro  
 20 25 30

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

Arg Pro Ala Asp Asp Glu Gly Thr Gly Thr Gln Ile Ser Phe Met Ile  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Leu Ala Thr Asp Glu Ala Asp Pro Leu Asn Arg Leu Gln Gln  
 325 330 335  
 Ile Lys Thr Ser Thr Arg Arg Ala Lys Glu His Leu Arg Lys Leu Pro  
 340 345 350  
 Lys Ser Ala Leu Thr Gln Tyr Thr Met Leu Leu Met Ser Pro Tyr Ile  
 355 360 365  
 Leu Gln Leu Met Ser Gly Leu Gly Gly Arg Met Arg Pro Phe Phe Asn  
 370 375 380  
 Val Thr Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Glu Gly Thr Leu Tyr Tyr Glu  
 385 390 395 400  
 Gly Ala Arg Leu Glu Ala Met Tyr Pro Val Ser Leu Ile Ala His Gly  
 405 410 415  
 Gly Ala Leu Asn Ile Thr Cys Leu Ser Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe  
 420 425 430  
 Gly Phe Thr Gly Cys Arg Asp Thr Leu Pro Ser Met Gln Lys Leu Ala  
 435 440 445  
 Val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Asp Glu Leu Glu Ser Leu Ile Leu Pro  
 450 455 460  
 Pro Lys Lys Arg Ala Arg Thr Arg Lys  
 465 470

<210> 11

<211> 1422

<212> ADN

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 11

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| atgaaacgtc tcggaaccct gaacgcctcc tggctggcgg ttgaatctga agacaccccg  | 60   |
| atgcatgtgg gtacgcttca gattttctca ctgccggaag gcgcaccaga aaccttcctg  | 120  |
| cgtgacatgg tcactcgaat gaaagaggcc ggcgatgtgg caccaccctg gggatacaaa  | 180  |
| ctggcctggg ctggtttctt cgggcgcgtg atcgccccgg cctggaaagt cgataaggat  | 240  |
| atcgatctgg attatcacgt ccgacactca gccctgcctc gcccggcggg ggagcgcgaa  | 300  |
| ctgggtattc tggatatccg actgcactct aacccccctg atttttcccg ccctctttgg  | 360  |
| gaatgccacg ttattgaagg cctggagaat aaccgttttg ccctttacac caaaatgcac  | 420  |
| cactcgatga ttgacggcat cagcggcgtg cgactgatgc agagggtgct caccaccgat  | 480  |
| cccgaacgct gcaatatgcc accgccctgg acggtacgcc cacaccaacg ccgtgggtgta | 540  |
| aaaaccgaca aagaggccag caggcccgca gcggtttccc aggcaatgga cgccctgaag  | 600  |
| ctccaggcag acatggcccc caggctgtgg caggccgcga atcgccctggg gcattcgggt | 660  |
| cgacacccgg aagacggact gaccgcgccc ttcactggac cggtttcggg gctcaatcac  | 720  |
| cgggttaccg cgcagcgacg ttttgccacc cagcattatc aactggaccg gctgaaaaac  | 780  |
| ctggcccatg cttccggcgg ttccttgaac gacatcgttc tttacctgtg tggcaccgca  | 840  |
| ttgcggcgct ttctggctga gcagaacaat ctgccagaca ccccgctgac ggctgggtata | 900  |
| ccggtgaata tccggccggc agacgacgag ggtacgggca cccagatcag ttttatgatt  | 960  |
| gcctcgctgg ccaccgacga agctgatccg ttgaaccgcc tgcaacagat caaaacctcg  | 1020 |
| acccgacggg ccaaggagca cctgcagaaa cttccaaaaa gtgccctgac cgtgtacacc  | 1080 |
| atgctgctga tgtcacccta cattctgcaa ttgatgtcag gtctcggggg gaggatgcga  | 1140 |
| ccattcttca acgtgacat ttccaacgtg cccggccccg aaggcacgct gtattatgaa   | 1200 |
| ggagcccggc ttgaggccat gtatccggta tcgctaatac ctcacggcgg cgccctgaac  | 1260 |
| atcacctgcc tgagctatgc cggatcgctg aatttcgggt ttaccggctg tcgggatacg  | 1320 |
| ctgccgagcg gccagaaact ggcggtttat accggtgaag ctctggatga gctggaatcg  | 1380 |
| ctgattctgc cacccaagaa gcgcgcccga acccgcaagt aa                     | 1422 |

<210> 12

<211> 473

<212> PRT

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 12

5

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Lys | Arg | Leu | Gly | Thr | Leu | Asn | Ala | Ser | Trp | Leu | Ala | Val | Glu | Ser |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Glu | Asp | Thr | Pro | Met | His | Val | Gly | Thr | Leu | Gln | Ile | Phe | Ser | Leu | Pro |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Glu | Gly | Ala | Pro | Glu | Thr | Phe | Leu | Arg | Asp | Met | Val | Thr | Arg | Met | Lys |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Glu | Ala | Gly | Asp | Val | Ala | Pro | Pro | Trp | Gly | Tyr | Lys | Leu | Ala | Trp | Ser |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Gly | Phe | Leu | Gly | Arg | Val | Ile | Ala | Pro | Ala | Trp | Lys | Val | Asp | Lys | Asp |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ile | Asp | Leu | Asp | Tyr | His | Val | Arg | His | Ser | Ala | Leu | Pro | Arg | Pro | Gly |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Gly | Glu | Arg | Glu | Leu | Gly | Ile | Leu | Val | Ser | Arg | Leu | His | Ser | Asn | Pro |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Leu | Asp | Phe | Ser | Arg | Pro | Leu | Trp | Glu | Cys | His | Val | Ile | Glu | Gly | Leu |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |

Glu Asn Asn Arg Phe Ala Leu Tyr Thr Lys Met His His Ser Met Ile  
 130 135 140  
 Asp Gly Ile Ser Gly Val Arg Leu Met Gln Arg Val Leu Thr Thr Asp  
 145 150 155 160  
 Pro Glu Arg Cys Asn Met Pro Pro Pro Trp Thr Val Arg Pro His Gln  
 165 170 175  
 Arg Arg Gly Val Lys Thr Asp Lys Glu Ala Ser Arg Pro Ala Ala Val  
 180 185 190  
 Ser Gln Ala Met Asp Ala Leu Lys Leu Gln Ala Asp Met Ala Pro Arg  
 195 200 205  
 Leu Trp Gln Ala Ala Asn Arg Leu Val His Ser Val Arg His Pro Glu  
 210 215 220  
 Asp Gly Leu Thr Ala Pro Phe Thr Gly Pro Val Ser Val Leu Asn His  
 225 230 235 240  
 Arg Val Thr Ala Gln Arg Arg Phe Ala Thr Gln His Tyr Gln Leu Asp  
 245 250 255  
 Arg Leu Lys Asn Leu Ala His Ala Ser Gly Gly Ser Leu Asn Asp Ile  
 260 265 270  
 Val Leu Tyr Leu Cys Gly Thr Ala Leu Arg Arg Phe Leu Ala Glu Gln  
 275 280 285  
 Asn Asn Leu Pro Asp Thr Pro Leu Thr Ala Gly Ile Pro Val Asn Ile  
 290 295 300  
 Arg Pro Ala Asp Asp Glu Gly Thr Gly Thr Gln Ile Ser Phe Met Ile  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Leu Ala Thr Asp Glu Ala Asp Pro Leu Asn Arg Leu Gln Gln  
 325 330 335  
 Ile Lys Thr Ser Thr Arg Arg Ala Lys Glu His Leu Gln Lys Leu Pro  
 340 345 350  
 Lys Ser Ala Leu Thr Val Tyr Thr Met Leu Leu Met Ser Pro Tyr Ile  
 355 360 365  
 Leu Gln Leu Met Ser Gly Leu Gly Gly Arg Met Arg Pro Phe Phe Asn  
 370 375 380  
 Val Thr Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Glu Gly Thr Leu Tyr Tyr Glu  
 385 390 395 400

Gly Ala Arg Leu Glu Ala Met Tyr Pro Val Ser Leu Ile Ala His Gly  
405 410 415

Gly Ala Leu Asn Ile Thr Cys Leu Ser Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe  
420 425 430

Gly Phe Thr Gly Cys Arg Asp Thr Leu Pro Ser Gly Gln Lys Leu Ala  
435 440 445

Val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Asp Glu Leu Glu Ser Leu Ile Leu Pro  
450 455 460

Pro Lys Lys Arg Ala Arg Thr Arg Lys  
465 470

<210> 13

<211> 1422

<212> ADN

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 13

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| atgaaacgctc tcggatccct ggacgcctcc tggctggcgg ttgaaggtga agacaccccg  | 60   |
| atgcatgtgg gtacgcttca gattttctca ctgccggaag gcgcaccaga aaccttctctg  | 120  |
| cgtgacatgg tcaactcgaat gaaagaggcc ggcgatgtgg caccaccctg gggatacaaaa | 180  |
| ctggcctggt ctggtttcct cgggcgcgtg atcgccccgg cctggaaagt cgataaggat   | 240  |
| atcgatctgg attatcacgt ccggcactca gccctgcctc gccccggcgg ggagcgcgaa   | 300  |
| ctgggtattc tggatatccg actgcactct aacagtctgg atttttcccg ccctctttgg   | 360  |
| gaatgccacg ttattgaagg cctggagaat aaccgttttg ccctttacac caaatgcac    | 420  |
| cactcgatga ttgacggcat cagcggcgtg cgactgatgc agagggtgct caccaccgat   | 480  |
| cccgaacgct gcaatatgcc accgccctgg acgcgccgcc cacaccagcg ccgtggtgca   | 540  |
| aaaaccgaca aagaggccag cgtgcgggca gcggtttccc aggcaatgga cgccctgaag   | 600  |
| ctccaggcag acatggcccc caggctgtgg caggccggca atcgccctggt gcattcgggt  | 660  |
| cgacacccgg aagacggact gaccgcgcc ttcactggac cggtttcggt gctcaatcac    | 720  |
| cgggttaccg cgcagcgacg ttttgccacc cagcattatc aactggaccg gctgaaaaac   | 780  |
| ctggcccatg cttccggcgg ttccttgaac gacatcggtt ttacctgtg tggcaccgca    | 840  |
| ttgcggcgct ttctggctga gcagaacaat ctgccagaca cccgctgac ggctggtata    | 900  |
| ccggtgaata tccggccggc agacgacgag ggtacgggca cccagatcag ttggatgatt   | 960  |
| gcctcgctgg ccaccgacga agctgatccg ttgaaccgcc tgcaacagat caaacctcg    | 1020 |
| acccgacggg ccaaggagca cctgcagaaa cttccaaaaa cggccctgac ccagtacacc   | 1080 |
| atgctgctga tgtcacccta cattctgcaa ttgatgtcag gtctcggggg gaggatgcga   | 1140 |
| ccagtcttca acgtgacat ttccaacgtg cccggcccg aaggcacgct gtattatgaa     | 1200 |

# ES 2 647 412 T3

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ggagcccggc ttgaggccat gtatccgttg tcgctaatacg ctcacggcgg cgccctgaac | 1260 |
| atcacctgcc tgagctatgc cggatcgctg aatttcggtt ttaccggctg tcgggatacg  | 1320 |
| ctgccgggga tgcagaaact ggcggtttat accggtgaag ctctggatga gctggaatcg  | 1380 |
| ctgattctgc cacccaagaa gcgcgcccga acccgcaagt aa                     | 1422 |

<210> 14

<211> 473

5 <212> PRT

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 14

Met Lys Arg Leu Gly Ser Leu Asp Ala Ser Trp Leu Ala val Glu Gly  
1 5 10 15

Glu Asp Thr Pro Met His val Gly Thr Leu Gln Ile Phe Ser Leu Pro  
20 25 30

Glu Gly Ala Pro Glu Thr Phe Leu Arg Asp Met Val Thr Arg Met Lys  
35 40 45

Glu Ala Gly Asp Val Ala Pro Pro Trp Gly Tyr Lys Leu Ala Trp Ser  
50 55 60

Gly Phe Leu Gly Arg Val Ile Ala Pro Ala Trp Lys val Asp Lys Asp  
65 70 75 80

Ile Asp Leu Asp Tyr His Val Arg His Ser Ala Leu Pro Arg Pro Gly  
85 90 95

Gly Glu Arg Glu Leu Gly Ile Leu val Ser Arg Leu His Ser Asn Ser  
100 105 110

Leu Asp Phe Ser Arg Pro Leu Trp Glu Cys His val Ile Glu Gly Leu  
115 120 125

Glu Asn Asn Arg Phe Ala Leu Tyr Thr Lys Met His His Ser Met Ile  
130 135 140

Asp Gly Ile Ser Gly Val Arg Leu Met Gln Arg Val Leu Thr Thr Asp  
145 150 155 160

Pro Glu Arg Cys Asn Met Pro Pro Pro Trp Thr Arg Arg Pro His Gln  
165 170 175

Arg Arg Gly Ala Lys Thr Asp Lys Glu Ala Ser Val Arg Ala Ala Val  
180 185 190

Ser Gln Ala Met Asp Ala Leu Lys Leu Gln Ala Asp Met Ala Pro Arg  
195 200 205

Leu Trp Gln Ala Gly Asn Arg Leu val His Ser Val Arg His Pro Glu

| 210                                                                                | 215 | 220 |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Asp Gly Leu Thr Ala Pro Phe Thr Gly Pro Val Ser Val Leu Asn His<br>225 230 235 240 |     |     |
| Arg Val Thr Ala Gln Arg Arg Phe Ala Thr Gln His Tyr Gln Leu Asp<br>245 250 255     |     |     |
| Arg Leu Lys Asn Leu Ala His Ala Ser Gly Gly Ser Leu Asn Asp Ile<br>260 265 270     |     |     |
| Val Leu Tyr Leu Cys Gly Thr Ala Leu Arg Arg Phe Leu Ala Glu Gln<br>275 280 285     |     |     |
| Asn Asn Leu Pro Asp Thr Pro Leu Thr Ala Gly Ile Pro Val Asn Ile<br>290 295 300     |     |     |
| Arg Pro Ala Asp Asp Glu Gly Thr Gly Thr Gln Ile Ser Trp Met Ile<br>305 310 315 320 |     |     |
| Ala Ser Leu Ala Thr Asp Glu Ala Asp Pro Leu Asn Arg Leu Gln Gln<br>325 330 335     |     |     |
| Ile Lys Thr Ser Thr Arg Arg Ala Lys Glu His Leu Gln Lys Leu Pro<br>340 345 350     |     |     |
| Lys Thr Ala Leu Thr Gln Tyr Thr Met Leu Leu Met Ser Pro Tyr Ile<br>355 360 365     |     |     |
| Leu Gln Leu Met Ser Gly Leu Gly Gly Arg Met Arg Pro Val Phe Asn<br>370 375 380     |     |     |
| Val Thr Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Glu Gly Thr Leu Tyr Tyr Glu<br>385 390 395 400 |     |     |
| Gly Ala Arg Leu Glu Ala Met Tyr Pro Leu Ser Leu Ile Ala His Gly<br>405 410 415     |     |     |
| Gly Ala Leu Asn Ile Thr Cys Leu Ser Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe<br>420 425 430     |     |     |
| Gly Phe Thr Gly Cys Arg Asp Thr Leu Pro Gly Met Gln Lys Leu Ala<br>435 440 445     |     |     |
| Val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Asp Glu Leu Glu Ser Leu Ile Leu Pro<br>450 455 460     |     |     |
| Pro Lys Lys Arg Ala Arg Thr Arg Lys<br>465 470                                     |     |     |

<210> 15  
 <211> 1422  
 <212> ADN  
 <213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

5

```

<400> 15
atgaaacgtc tcggatccct ggacgcctcc tggctggcgg ttgaaggtga agacaccccg      60
atgcatgtgg gtacgcttca gattttctca ctgccggaag gcgcaccaga aaccttcctg      120
cgtgacatgg tcaactcgaat gaaagaggcc ggcgatgtgg caccaccctg gggatacaaa      180
ctggcctggt ctggtttcct cgggcgcgtg atcgccccgg cctggaaagt cgatttcgat      240
atcgatctgg attatcacgt ccggcactca gccctgcctc gccccggcgg ggagcgcgaa      300
ctgggtattc tggatatccc actgcaactc aacagtctgg atttttcccg ccctctttgg      360
gaatgccacg ttattgaagg cctggagaat aaccgttttg ccctttacac caaaatgcac      420
cactcgatga ttgacggcat cagcggcgtg cgactgatgc agagggtgct caccaccgat      480
cccgaacgct gcaatatgcc accgccctgg acgcgccgcc cacaccagcg ccgtggtgca      540
aaaaccgaca aagaggccag cgtgcgggca gcggttgtgc aggcaatgga cgccctgaag      600
ctccaggcag acatggcccc caggctgtgg caggccggca atcgccctggt gcattcgggt      660
cgacacccgg aagacggact gaccgcgcc ttcactggac cggtttcggt gctcaatcac      720
cgggttacca ggcagcgacg ttttgccacc cagcattatc aactggaccg gctgaaaaac      780
ctggcccatg cttccggcgg ttccttgaac gacatcgttc ttacactgtg tggcaccgca      840
ttgcggcgct ttctggctga gcagaacaat ctgccagaca ccccgctgac ggctggtata      900
ccggtgaata tccggccggc agacgacgag ggtacgggca cccagatcag ttggatgatt      960
gcctcgctgg ccaccgacga agctgatccg ttgaaccgcc tgcaacagat caaaacctcg     1020
acccgacggg ccaaggagca cctgcagcac cttccaaaaa cggccctgac ccagtacacc     1080
atgctgctga tgtcaccta cattctgcaa ttgatgtcag gtctcggggg gaggatgcga     1140
ccagtcttca acgtgacat ttccaacgtg cccggccccg aaggcacgct gtattatgaa     1200
ggagcccggc ttgaggccat gtatccgttg tcgctaatac ctcacggcgg cgccctgaac     1260
atcacctgcc tgagctatgc cggatcgctg aatttcggtt ttaccggctg tcgggatacg     1320
ctgccgggga tgcagaaact ggcggtttat accggtgaag ctctggatga gctggaatcg     1380
ctgattctgc cacccaagaa gcgcgcccga acccgcaagt aa                          1422
    
```

10 <210> 16  
 <211> 473  
 <212> PRT  
 <213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

15 <400> 16

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Lys | Arg | Leu | Gly | Ser | Leu | Asp | Ala | Ser | Trp | Leu | Ala | Val | Glu | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Glu | Asp | Thr | Pro | Met | His | Val | Gly | Thr | Leu | Gln | Ile | Phe | Ser | Leu | Pro |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

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

Arg Pro Ala Asp Asp Glu Gly Thr Gly Thr Gln Ile Ser Trp Met Ile  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Leu Ala Thr Asp Glu Ala Asp Pro Leu Asn Arg Leu Gln Gln  
 325 330 335  
 Ile Lys Thr Ser Thr Arg Arg Ala Lys Glu His Leu Gln His Leu Pro  
 340 345 350  
 Lys Thr Ala Leu Thr Gln Tyr Thr Met Leu Leu Met Ser Pro Tyr Ile  
 355 360 365  
 Leu Gln Leu Met Ser Gly Leu Gly Gly Arg Met Arg Pro Val Phe Asn  
 370 375 380  
 Val Thr Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Glu Gly Thr Leu Tyr Tyr Glu  
 385 390 395 400  
 Gly Ala Arg Leu Glu Ala Met Tyr Pro Leu Ser Leu Ile Ala His Gly  
 405 410 415  
 Gly Ala Leu Asn Ile Thr Cys Leu Ser Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe  
 420 425 430  
 Gly Phe Thr Gly Cys Arg Asp Thr Leu Pro Gly Met Gln Lys Leu Ala  
 435 440 445  
 Val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Asp Glu Leu Glu Ser Leu Ile Leu Pro  
 450 455 460  
 Pro Lys Lys Arg Ala Arg Thr Arg Lys  
 465 470

<210> 17

<211> 1422

<212> ADN

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 17

|                                                                      |      |
|----------------------------------------------------------------------|------|
| atgaaacgtc tcggatccct ggacgcctcc tggctggcgg ttgaagggtga agacaccccg   | 60   |
| atgcatgtgg gtacgcttca gattttctca ctgccggaag gcgcaccaga aaccttcctg    | 120  |
| cgtgacatgg tcaactcgaat gaaagaggcc ggcgatgtgg caccaccctg gggatacaaa   | 180  |
| ctggcctgggt ctgggtttcct cggggcgcgtg atcgccccgg cctggaaact ggataaggat | 240  |
| atcgatctgg attatcacgt ccggcactca gccctgcctc gcccggcggt ggagcgcgaa    | 300  |
| ctgggtattc tggatatccg actgcactct aacagtctgg atttttcccg ccctctttgg    | 360  |
| gaatgccacg ttattgaagg cctggagaat aaccgttttg ccctttacac caaaatgcac    | 420  |
| cactcgatga ttgacggcat cagcggcgtg cgactgatgc agaggggtgct caccaccgat   | 480  |
| cccgaacgct gcaatatgcc accgccctgg acgcgccgcc cacaccagcg ccgtggtgca    | 540  |
| aaaaccgaca aagaggccag cgtgcgggca gcggtttccc aggcaatgga cgccctgaag    | 600  |
| ctccaggcag acatggcccc caggctgtgg caggccggca atcgcttggg gcattcgggt    | 660  |
| cgacacccgg aagacggact gaccgcgcc ttcactggac cggtttcggt gctcaatcac     | 720  |
| cgggttaccg cgcagcgacg ttttgccacc cagcattatc aactggaccg gctgaggaac    | 780  |
| ctggcccatg cttccggcgg ttccttgaac gacatcgttc ttacctgtg tggcaccgca     | 840  |
| ttgcggcgct ttctggctga gcagaacaat ctgccagaca ccccgctgac ggctggtata    | 900  |
| ccggtgaata tccggccggc agacgacgag ggtacgggca cccagatcgg gtggatgatt    | 960  |
| gcctcgtgg ccaccgacga agctgatccg ttgaaccgcc tgcaacagat caaaacctcg     | 1020 |
| acccgacggg ccaaggagca cctgcagaaa cttccaaaaa cggccctgac ccagtacacc    | 1080 |
| cgcctgctga tgtcacccta cattctgcaa ttgatgtcag gtctcggggg gaggatgcga    | 1140 |
| ccagtcttca acgtgaccat ttccaacgtg cccggcccgg aaggcacgct gtattatgaa    | 1200 |
| ggagcccggc ttgaggccat gtatccgttg tcgctaatac ctacggcggt cgccctgaac    | 1260 |
| atcacctgcc tgagctatgc cggatcgctg aatttcgggt ttaccggctg tcgggatacg    | 1320 |
| ctgccgggga tgcagaaact ggcggtttat accggtgaag ctctggatga gctggaatcg    | 1380 |
| ctgattctgc caccgaagaa gcgcgcccga acccgcaagt aa                       | 1422 |

<210> 18  
 <211> 473  
 <212> PRT  
 <213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*  
 <400> 18

5

Met Lys Arg Leu Gly Ser Leu Asp Ala Ser Trp Leu Ala Val Glu Gly  
1 5 10 15  
Glu Asp Thr Pro Met His Val Gly Thr Leu Gln Ile Phe Ser Leu Pro  
20 25 30  
Glu Gly Ala Pro Glu Thr Phe Leu Arg Asp Met Val Thr Arg Met Lys  
35 40 45  
Glu Ala Gly Asp Val Ala Pro Pro Trp Gly Tyr Lys Leu Ala Trp Ser  
50 55 60  
Gly Phe Leu Gly Arg Val Ile Ala Pro Ala Trp Lys Leu Asp Lys Asp  
65 70 75 80  
Ile Asp Leu Asp Tyr His Val Arg His Ser Ala Leu Pro Arg Pro Gly  
85 90 95  
Gly Glu Arg Glu Leu Gly Ile Leu Val Ser Arg Leu His Ser Asn Ser  
100 105 110  
Leu Asp Phe Ser Arg Pro Leu Trp Glu Cys His Val Ile Glu Gly Leu  
115 120 125

Glu Asn Asn Arg Phe Ala Leu Tyr Thr Lys Met His His Ser Met Ile  
 130 135 140  
 Asp Gly Ile Ser Gly Val Arg Leu Met Gln Arg Val Leu Thr Thr Asp  
 145 150 155 160  
 Pro Glu Arg Cys Asn Met Pro Pro Pro Trp Thr Arg Arg Pro His Gln  
 165 170 175  
 Arg Arg Gly Ala Lys Thr Asp Lys Glu Ala Ser Val Arg Ala Ala Val  
 180 185 190  
 Ser Gln Ala Met Asp Ala Leu Lys Leu Gln Ala Asp Met Ala Pro Arg  
 195 200 205  
 Leu Trp Gln Ala Gly Asn Arg Leu Val His Ser Val Arg His Pro Glu  
 210 215 220  
 Asp Gly Leu Thr Ala Pro Phe Thr Gly Pro Val Ser Val Leu Asn His  
 225 230 235 240  
 Arg Val Thr Ala Gln Arg Arg Phe Ala Thr Gln His Tyr Gln Leu Asp  
 245 250 255  
 Arg Leu Arg Asn Leu Ala His Ala Ser Gly Gly Ser Leu Asn Asp Ile  
 260 265 270  
 Val Leu Tyr Leu Cys Gly Thr Ala Leu Arg Arg Phe Leu Ala Glu Gln  
 275 280 285  
 Asn Asn Leu Pro Asp Thr Pro Leu Thr Ala Gly Ile Pro Val Asn Ile  
 290 295 300  
 Arg Pro Ala Asp Asp Glu Gly Thr Gly Thr Gln Ile Gly Trp Met Ile  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Leu Ala Thr Asp Glu Ala Asp Pro Leu Asn Arg Leu Gln Gln  
 325 330 335  
 Ile Lys Thr Ser Thr Arg Arg Ala Lys Glu His Leu Gln Lys Leu Pro  
 340 345 350  
 Lys Thr Ala Leu Thr Gln Tyr Thr Arg Leu Leu Met Ser Pro Tyr Ile  
 355 360 365  
 Leu Gln Leu Met Ser Gly Leu Gly Gly Arg Met Arg Pro Val Phe Asn  
 370 375 380  
 Val Thr Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Glu Gly Thr Leu Tyr Tyr Glu  
 385 390 395 400

Gly Ala Arg Leu Glu Ala Met Tyr Pro Leu Ser Leu Ile Ala His Gly  
405 410 415

Gly Ala Leu Asn Ile Thr Cys Leu Ser Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe  
420 425 430

Gly Phe Thr Gly Cys Arg Asp Thr Leu Pro Gly Met Gln Lys Leu Ala  
435 440 445

Val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Asp Glu Leu Glu Ser Leu Ile Leu Pro  
450 455 460

Pro Lys Lys Arg Ala Arg Thr Arg Lys  
465 470

<210> 19

<211> 1422

<212> ADN

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 19

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| atgaaacgctc tcggatccct ggacgcctcc tggctggcgg ttgaagggtga agacaccccg | 60   |
| atgcatgtgg gtacgcttca gattttctca ctgccggaag gcgcaccaga aaccttcctg   | 120  |
| cgtgacatgg tcactcgaat gaaagaggcc ggcgatgtgg caccaccctg gggatacaaa   | 180  |
| ctggcctggt ctggtttcct cgggcgcgtg atcgccccgg cctggaaagt cgataaggat   | 240  |
| atcgatctgg attatcacgt ccggcactca gccctgcctc gcccggcggg ggagcgcgaa   | 300  |
| ctgggtattc tggatatccg actgcactct aacagtctgg atttttcccg ccctctttgg   | 360  |
| gaatgccacg ttattgaagg cctggagaat aaccgttttg ccctttacac caaatgcac    | 420  |
| cactcgatga ttgacggcat cagcggcgtg cgactgatgc agaggggtgt caccaccgat   | 480  |
| cccgaacgct gcaatatgcc accgccctgg acgcgccgcc cacaccagcg ccgtggtgca   | 540  |
| aaaaccgaca aagaggccag cgtgcgggca gcggtttccc aggcaatgga cgccctgaag   | 600  |
| ctccaggcag acatggcccc caggctgtgg caggccggca atcgccctggt gcattcggtt  | 660  |
| cgacaccggg aagacggact gaccgcgcc ttcactggac cggtttcggt gctcaatcac    | 720  |
| cgggttaccg cgggccgacg ttttgccacc cagcattatc aactggaccg gctgaaaaac   | 780  |
| ctggcccatg cttccggcgg tgggttgaac gacatcggtt ttacctgtg tggcaccgca    | 840  |
| ttgcggcgct ttctggctga gcagaacaat ctgccagaca ccccgctgac ggctggtata   | 900  |
| ccggtgaata tccggccggc agacgacgag gtcacgggca cccagatcag ttggatgatt   | 960  |
| tgttcgctgg ccaccgacga agctgatccg ttgaaccgcc tgcaacagat caaacctcg    | 1020 |
| acccgacggg ccaaggagca cctgcagaaa cttccaaaaa cggccctgac ccagtacacc   | 1080 |
| atgctgtga tgtcaccctg gattctgcaa ttgatgtcag gtctcggggg gaggatgcga    | 1140 |
| ccagtcttca acgtgaccat ttccaacgtg cccggccccg aaggcacgct gtattatgaa   | 1200 |
| ggagcccggc ttgaggccat gtatccgttg tcgctaatac ctcacggcgg cgccctgaac   | 1260 |

# ES 2 647 412 T3

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| atcacctgcc tgagctatgc cggatcgctg aatttcggtt ttaccggctg tcgggatacg | 1320 |
| ctgccgggga tgcagaaact ggcggtttat accggtgaag ctctggatga gctggaatcg | 1380 |
| ctgattctgc cacccaagaa gcgcgcccga acccgcaagt aa                    | 1422 |

<210> 20

<211> 473

5 <212> PRT

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 20

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

Asp Gly Leu Thr Ala Pro Phe Thr Gly Pro Val Ser Val Leu Asn His  
 225 230 235 240  
 Arg Val Thr Ala Gly Arg Arg Phe Ala Thr Gln His Tyr Gln Leu Asp  
 245 250 255  
 Arg Leu Lys Asn Leu Ala His Ala Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile  
 260 265 270  
 Val Leu Tyr Leu Cys Gly Thr Ala Leu Arg Arg Phe Leu Ala Glu Gln  
 275 280 285  
 Asn Asn Leu Pro Asp Thr Pro Leu Thr Ala Gly Ile Pro Val Asn Ile  
 290 295 300  
 Arg Pro Ala Asp Asp Glu Val Thr Gly Thr Gln Ile Ser Trp Met Ile  
 305 310 315 320  
 Cys Ser Leu Ala Thr Asp Glu Ala Asp Pro Leu Asn Arg Leu Gln Gln  
 325 330 335  
 Ile Lys Thr Ser Thr Arg Arg Ala Lys Glu His Leu Gln Lys Leu Pro  
 340 345 350  
 Lys Thr Ala Leu Thr Gln Tyr Thr Met Leu Leu Met Ser Pro Trp Ile  
 355 360 365  
 Leu Gln Leu Met Ser Gly Leu Gly Gly Arg Met Arg Pro Val Phe Asn  
 370 375 380  
 Val Thr Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Glu Gly Thr Leu Tyr Tyr Glu  
 385 390 395 400  
 Gly Ala Arg Leu Glu Ala Met Tyr Pro Leu Ser Leu Ile Ala His Gly  
 405 410 415  
 Gly Ala Leu Asn Ile Thr Cys Leu Ser Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe  
 420 425 430  
 Gly Phe Thr Gly Cys Arg Asp Thr Leu Pro Gly Met Gln Lys Leu Ala  
 435 440 445  
 Val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Asp Glu Leu Glu Ser Leu Ile Leu Pro  
 450 455 460  
 Pro Lys Lys Arg Ala Arg Thr Arg Lys  
 465 470

<210> 21  
 <211> 1422  
 <212> ADN  
 <213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

5

<400> 21  
 atgaaacgtc tcggaaccct ggacgcctcc tggctggcgg ttgaagggtga agacaccccg 60  
 atgcatgtgg gtacgcttca gattttctca ctgccggaag gcgcaccaga aaccttcctg 120  
 cgtgacatgg tcaactcgaat gaaagaggcc ggcgatgtgg caccaccctg gggatacaaa 180  
 ctggcctggg ctggtttcct cgggcgcgtg atcgcctcgg cctggaaagt cgataaggat 240  
 atcgatctgg attatcacgt ccggcactca gccctgcctc gccccggcgg ggagcgcgaa 300  
 ctgggtattc tggatatccg actgcactct aacagtctgg atttttcccg ccctctttgg 360  
 gaatgccacg ttattgaagg cctggagaat aaccgttttg ccctttacac caaaatgcac 420  
 cactcgatga ttgacggcat cagcggcgtg cgactgatgc agaggggcct caccaccgat 480  
 cccgaacgct gcaatatgtc accgccctgg acgcgccgcc cacaccagcg ccgtggtgca 540  
 aaaaccgaca aagaggccag cgtgcgggca gcggtttccc aggcaatgga cgccctgaag 600  
 ctccaggcag acatggcccc caggctgtgg caggccggca atcgcttggg gcattcgggt 660  
 cgacacccgg aagacggact gaccgcgcc ttcactggac cggtttcggg gctcaatcac 720  
 cgggttaccg cgcagcgacg ttttgccacc cagcattatc aactggaccg gctgaaaaac 780  
 ctggcccatg cttccggcgg ttccttgaac gacatcggtc ttacctgtg tggcaccgca 840  
 ttgcggcgct ttctggctga gcagaacaat ctgccagaca ccccgctgac ggctgggtata 900  
 ccggtgaata tccggccggc agacgacgag ggtacgggca cccagatcag ttggatgatt 960  
 gcctcgctgg ccaccgacga agctgatccg ttgaaccgcc tgcaacagat caaaacctcg 1020  
 acccgacggg ccaaggagca cctggcgaaa cttccaaaaa cggccctgac ccagtacacc 1080  
 atgctgctga tgtcacccta cattctgcaa ttgatgtcag gtctcggggg gaggatgcga 1140  
 ccattcttca acgtgaccat ttccaacgtg cccggcccgg aaggcacgct gtattatgaa 1200  
 ggagcccggc ttgaggccat gtatccgttg tcgctaatac ctcacggcgg cgccctgaac 1260  
 atcacctgcc tgagctatgc cggatcgctg aatttcgggt ttaccggctg tcgggatacg 1320  
 ctgccgggga tgcagaaact ggcggtttat accggtgaag ctctggatga gctggaatcg 1380  
 ctgattctgc cacccaagaa gcgcgcccga acccgcaagt aa 1422

10 <210> 22  
 <211> 473  
 <212> PRT  
 <213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

15 <400> 22

Met Lys Arg Leu Gly Thr Leu Asp Ala Ser Trp Leu Ala Val Glu Gly  
 1 5 10 15

Glu Asp Thr Pro Met His Val Gly Thr Leu Gln Ile Phe Ser Leu Pro  
 20 25 30

Glu Gly Ala Pro Glu Thr Phe Leu Arg Asp Met Val Thr Arg Met Lys

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

|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 305        |            |            |            |            | 310        |            |            |            |            | 315        |            |            |            |            | 320        |
| Ala        | Ser        | Leu        | Ala        | Thr<br>325 | Asp        | Glu        | Ala        | Asp        | Pro<br>330 | Leu        | Asn        | Arg        | Leu        | Gln<br>335 | Gln        |
| Ile        | Lys        | Thr        | Ser<br>340 | Thr        | Arg        | Arg        | Ala        | Lys<br>345 | Glu        | His        | Leu        | Ala        | Lys<br>350 | Leu        | Pro        |
| Lys        | Thr        | Ala<br>355 | Leu        | Thr        | Gln        | Tyr        | Thr<br>360 | Met        | Leu        | Leu        | Met        | Ser<br>365 | Pro        | Tyr        | Ile        |
| Leu        | Gln<br>370 | Leu        | Met        | Ser        | Gly        | Leu<br>375 | Gly        | Gly        | Arg        | Met        | Arg<br>380 | Pro        | Phe        | Phe        | Asn        |
| Val<br>385 | Thr        | Ile        | Ser        | Asn        | Val<br>390 | Pro        | Gly        | Pro        | Glu        | Gly<br>395 | Thr        | Leu        | Tyr        | Tyr        | Glu<br>400 |
| Gly        | Ala        | Arg        | Leu        | Glu<br>405 | Ala        | Met        | Tyr        | Pro        | Leu<br>410 | Ser        | Leu        | Ile        | Ala        | His<br>415 | Gly        |
| Gly        | Ala        | Leu        | Asn<br>420 | Ile        | Thr        | Cys        | Leu        | Ser<br>425 | Tyr        | Ala        | Gly        | Ser        | Leu<br>430 | Asn        | Phe        |
| Gly        | Phe        | Thr<br>435 | Gly        | Cys        | Arg        | Asp        | Thr<br>440 | Leu        | Pro        | Gly        | Met        | Gln<br>445 | Lys        | Leu        | Ala        |
| Val        | Tyr<br>450 | Thr        | Gly        | Glu        | Ala        | Leu<br>455 | Asp        | Glu        | Leu        | Glu        | Ser<br>460 | Leu        | Ile        | Leu        | Pro        |
| Pro<br>465 | Lys        | Lys        | Arg        | Ala        | Arg<br>470 | Thr        | Arg        | Lys        |            |            |            |            |            |            |            |

<210> 23  
<211> 1422  
<212> ADN  
<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 23

|            |            |            |            |             |            |      |
|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| atgaaacgtc | tcggaaccct | ggacgcctcc | tggttgccg  | ttgaagggtga | agacaccccg | 60   |
| atgcatgtgg | gtacgcttca | gattttctca | ctgccggaag | gcgcaccaga  | aaccttctcg | 120  |
| cgtgacatgg | tactcgaat  | gaaagaggcc | ggcgatgtgg | caccaccctg  | gggatacaaa | 180  |
| ctggcctggt | ctggtttcct | cgggcgcgtg | atcgccccg  | cctggaaagt  | cgcaaggat  | 240  |
| atcgatctgg | attatcacgt | ccggcactca | gccctgcctc | gccccggcgg  | ggagcgcgaa | 300  |
| ctgggtattc | tggtatccc  | actgcactct | aacagtctgg | atttttccc   | ccctctttgg | 360  |
| gaatgccacg | ttattgaagg | cctggagaat | aaccgttttg | ccctttacac  | caaaatgcac | 420  |
| cactcgatga | ttgacggcat | cagcggcgtg | cgactgatgc | agagggtgct  | caccaccgat | 480  |
| cccgaacgct | gcaatatgcc | accgccctgg | acgcgccgcc | cacaccagcg  | ccgtggtgca | 540  |
| aaaaccgaca | aagaggccag | cgtgcgggca | gcggtttccc | aggcaatgga  | cgccctgaag | 600  |
| ctccaggcag | acatggcccc | caggctgtgg | caggccggca | atcgccctggt | gcattcggtt | 660  |
| cgacacccgg | aagacggact | gaccgcgccc | ttcactggac | cggtttcggg  | gctcaatcac | 720  |
| cgggttaccg | cgacgcgacg | ttttgccacc | cagcattatc | aactggaccg  | gctgaaaaac | 780  |
| ctggcccatg | cttcggcg   | ttccttgaac | gacatcgttc | ttacctgtg   | tggcaccgca | 840  |
| ttgcggcgct | ttctggctga | gcagaacaat | ctgccagaca | ccccgctgac  | ggctggtata | 900  |
| ccggtgaata | tccggccggc | agacgacgag | ggtacgggca | gtcagatcag  | ttggatgatt | 960  |
| gcctcgctgg | ccaccgacga | agctgatccg | ttgaaccgcc | tgcaacagat  | caaaacctcg | 1020 |
| acccgacggg | ccaaggagca | cctggcgaaa | cttccaaaaa | cggccctgac  | ccagtacacc | 1080 |
| atgctgctga | tgtcacccta | cattctgcaa | ttgatgtcag | gtctcggggg  | gaggatgcga | 1140 |
| ccattcttca | acgtgaccat | ttccaacgtg | cccggccccg | aaggcacgct  | gtattatgaa | 1200 |
| ggagcccggc | ttgaggccat | gtatccgttg | tcgctaatac | ctcacggcgg  | cgccctgaac | 1260 |
| gtgacctgcc | tgagctatgc | cggatcgctg | aatttcgggt | ttaccggctg  | tcgggatacg | 1320 |
| ctgccgggga | tgcagaaact | ggcggtttat | accggtgaag | ctctggatga  | gctggaatcg | 1380 |
| ctgattctgc | caccaagaa  | gcgcgcccga | acccgcaagt | aa          |            | 1422 |

<210> 24

<211> 473

<212> PRT

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 24

5

Met Lys Arg Leu Gly Thr Leu Asp Ala Ser Trp Leu Ala val Glu Gly  
1 5 10 15

Glu Asp Thr Pro Met His val Gly Thr Leu Gln Ile Phe Ser Leu Pro  
20 25 30

Glu Gly Ala Pro Glu Thr Phe Ser Arg Asp Met val Thr Arg Met Lys  
35 40 45

Glu Ala Gly Asp val Ala Pro Pro Trp Gly Tyr Lys Leu Ala Trp Ser  
50 55 60

Gly Phe Leu Gly Arg val Ile Ala Pro Ala Trp Lys val Ala Lys Asp  
65 70 75 80

Ile Asp Leu Asp Tyr His val Arg His Ser Ala Leu Pro Arg Pro Gly  
85 90 95

Gly Glu Arg Glu Leu Gly Ile Leu val Ser Arg Leu His Ser Asn Ser  
100 105 110

Leu Asp Phe Ser Arg Pro Leu Trp Glu Cys His val Ile Glu Gly Leu  
115 120 125

Glu Asn Asn Arg Phe Ala Leu Tyr Thr Lys Met His His Ser Met Ile  
 130 135 140  
 Asp Gly Ile Ser Gly Val Arg Leu Met Gln Arg Val Leu Thr Thr Asp  
 145 150 155 160  
 Pro Glu Arg Cys Asn Met Pro Pro Pro Trp Thr Arg Arg Pro His Gln  
 165 170 175  
 Arg Arg Gly Ala Lys Thr Asp Lys Glu Ala Ser Val Arg Ala Ala Val  
 180 185 190  
 Ser Gln Ala Met Asp Ala Leu Lys Leu Gln Ala Asp Met Ala Pro Arg  
 195 200 205  
 Leu Trp Gln Ala Gly Asn Arg Leu Val His Ser Val Arg His Pro Glu  
 210 215 220  
 Asp Gly Leu Thr Ala Pro Phe Thr Gly Pro Val Ser Val Leu Asn His  
 225 230 235 240  
 Arg Val Thr Ala Gln Arg Arg Phe Ala Thr Gln His Tyr Gln Leu Asp  
 245 250 255  
 Arg Leu Lys Asn Leu Ala His Ala Ser Gly Gly Ser Leu Asn Asp Ile  
 260 265 270  
 Val Leu Tyr Leu Cys Gly Thr Ala Leu Arg Arg Phe Leu Ala Glu Gln  
 275 280 285  
 Asn Asn Leu Pro Asp Thr Pro Leu Thr Ala Gly Ile Pro Val Asn Ile  
 290 295 300  
 Arg Pro Ala Asp Asp Glu Gly Thr Gly Ser Gln Ile Ser Trp Met Ile  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Leu Ala Thr Asp Glu Ala Asp Pro Leu Asn Arg Leu Gln Gln  
 325 330 335  
 Ile Lys Thr Ser Thr Arg Arg Ala Lys Glu His Leu Ala Lys Leu Pro  
 340 345 350  
 Lys Thr Ala Leu Thr Gln Tyr Thr Met Leu Leu Met Ser Pro Tyr Ile  
 355 360 365  
 Leu Gln Leu Met Ser Gly Leu Gly Gly Arg Met Arg Pro Phe Phe Asn  
 370 375 380  
 Val Thr Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Glu Gly Thr Leu Tyr Tyr Glu  
 385 390 395 400

Gly Ala Arg Leu Glu Ala Met Tyr Pro Leu Ser Leu Ile Ala His Gly  
405 410 415

Gly Ala Leu Asn Val Thr Cys Leu Ser Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe  
420 425 430

Gly Phe Thr Gly Cys Arg Asp Thr Leu Pro Gly Met Gln Lys Leu Ala  
435 440 445

Val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Asp Glu Leu Glu Ser Leu Ile Leu Pro  
450 455 460

Pro Lys Lys Arg Ala Arg Thr Arg Lys  
465 470

<210> 25

<211> 1422

<212> ADN

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 25

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| atgaaacgctc tcggatccct ggacgcctcc tggctggcgg ttgaaggtga agacaccccg | 60   |
| atgcatgtgg gttggcttca gattttctca ctgccggaag gcgcaccaga aaccttcctg  | 120  |
| cgtgacatgg tcttccgaat gaaagaggcc ggcgatgtgg caccaccctg gggatacaaa  | 180  |
| ctggcctggt ctggtttcct cgggcgcgtg atcgccccgg cctggaaagt cgataaggat  | 240  |
| atcgatctgg attatcacgt ccggcactca gccctgcctc gccccggcgg ggagcgcgaa  | 300  |
| ctgggtattc tggatatccg actgcactct aacagtctgg atttttcccg ccctctttgg  | 360  |
| gaatgccacg ttattgaagg cctggagaat aaccgttttg ccctttacac caaatgcac   | 420  |
| cactcgatga ttgacggctt gagcggcgtg cgactgatgc agagggtgct caccaccgat  | 480  |
| cccgaacgct gcaatatgcc accgccctgg acgcgccgcc cacaccagcg ccgtggtgca  | 540  |
| aaaaccgaca aagaggccag cgtgcgggca gcggtttccc aggcaatgga cgccctgaag  | 600  |
| ctccaggcag acatggcccc caggctgtgg caggccggca atcgccctgg gcatcgggtt  | 660  |
| cgacacccgg aagacggact gaccgcgcc ttcactggac cggtttcggt gctcaatcac   | 720  |
| cgggttaccg cgcagcgacg ttttgccacc cagcattatc aactggaccg gctgaaaaac  | 780  |
| ctggcccatg cttccggcgg ttccttgaac gacatcgttc ttacctgtg tggcaccgca   | 840  |
| ttgcggcgct ttctggctga gcagaacaat ctgccagaca ccccgctgac ggctggtata  | 900  |
| ccggtgaata tccggccggc aaacgacgag ggtacgggca ccagatcag ttggatgatt   | 960  |
| gcctcgctgg ccaccgacga agctgatccg ttgaaccgcc tgcaacagat caaaacctcg  | 1020 |
| acccgacggg ccaaggagca cctgcagaaa cttccaaaaa cggccctgac ccagtacacc  | 1080 |
| atgctgctga tgtcacccta cattctgcaa ttgatgtcag gtctcggggg gaggatgcga  | 1140 |
| ccagtcttca acgtgaccat ttccaacgtg cccggccccg aaggcacgct gtattatgaa  | 1200 |
| ggagcccggc ttgaggccat gtatccgttg tcgctaatac ctcacggcgg cgccctgaac  | 1260 |

# ES 2 647 412 T3

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| atcacctgcc tgagctatgc cggatcgctg aatttcggtt ttaccggctg tcgggatacg | 1320 |
| ctgccgggga tgcagaaact ggcggtttat accggtgaag ctctggatga gctggaatcg | 1380 |
| ctgattctgc cacccaagaa gcgcgcccga acccgcaagt aa                    | 1422 |

<210> 26

<211> 473

5 <212> PRT

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 26

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

Asp Gly Leu Thr Ala Pro Phe Thr Gly Pro Val Ser Val Leu Asn His  
 225 230 235 240  
 Arg Val Thr Ala Gln Arg Arg Phe Ala Thr Gln His Tyr Gln Leu Asp  
 245 250 255  
 Arg Leu Lys Asn Leu Ala His Ala Ser Gly Gly Ser Leu Asn Asp Ile  
 260 265 270  
 Val Leu Tyr Leu Cys Gly Thr Ala Leu Arg Arg Phe Leu Ala Glu Gln  
 275 280 285  
 Asn Asn Leu Pro Asp Thr Pro Leu Thr Ala Gly Ile Pro Val Asn Ile  
 290 295 300  
 Arg Pro Ala Asn Asp Glu Gly Thr Gly Thr Gln Ile Ser Trp Met Ile  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Leu Ala Thr Asp Glu Ala Asp Pro Leu Asn Arg Leu Gln Gln  
 325 330 335  
 Ile Lys Thr Ser Thr Arg Arg Ala Lys Glu His Leu Gln Lys Leu Pro  
 340 345 350  
 Lys Thr Ala Leu Thr Gln Tyr Thr Met Leu Leu Met Ser Pro Tyr Ile  
 355 360 365  
 Leu Gln Leu Met Ser Gly Leu Gly Gly Arg Met Arg Pro Val Phe Asn  
 370 375 380  
 Val Thr Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Glu Gly Thr Leu Tyr Tyr Glu  
 385 390 395 400  
 Gly Ala Arg Leu Glu Ala Met Tyr Pro Leu Ser Leu Ile Ala His Gly  
 405 410 415  
 Gly Ala Leu Asn Ile Thr Cys Leu Ser Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe  
 420 425 430  
 Gly Phe Thr Gly Cys Arg Asp Thr Leu Pro Gly Met Gln Lys Leu Ala  
 435 440 445  
 Val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Asp Glu Leu Glu Ser Leu Ile Leu Pro  
 450 455 460  
 Pro Lys Lys Arg Ala Arg Thr Arg Lys  
 465 470

|    |                                                                              |  |      |
|----|------------------------------------------------------------------------------|--|------|
| 5  | <210> 27                                                                     |  |      |
|    | <211> 24                                                                     |  |      |
|    | <212> ADN                                                                    |  |      |
|    | <213> Secuencia artificial                                                   |  |      |
| 10 | <220>                                                                        |  |      |
|    | <221> fuente                                                                 |  |      |
|    | <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético" |  |      |
|    | <400> 27                                                                     |  |      |
|    | <b>atgaaacgtc tcggaaccct ggac</b>                                            |  | 24   |
| 15 | <210> 28                                                                     |  |      |
|    | <211> 1446                                                                   |  |      |
|    | <212> ADN                                                                    |  |      |
|    | <213> Secuencia artificial                                                   |  |      |
| 20 | <220>                                                                        |  |      |
|    | <221> fuente                                                                 |  |      |
|    | <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"  |  |      |
|    | <400> 28                                                                     |  |      |
|    | <b>atgaaacgtc tcggaaccct ggacatgaaa cgtctcggaa ccctggacgc ctcctggctg</b>     |  | 60   |
|    | <b>gcggttgaat ctgaagacac cccgatgcat gtgggtacgc ttcagatttt ctcactgccg</b>     |  | 120  |
|    | <b>gaaggcgcac cagaaacctt cctgcgtgac atggctactc gaatgaaaga ggccggcgat</b>     |  | 180  |
|    | <b>gtggcaccac cctgggggata caaactggcc tgggtctggtt tcctcgggcg cgtgatcgcc</b>   |  | 240  |
|    | <b>ccggcctgga aagtcgataa ggatatcgat ctggattatc acgtccggca ctcagccctg</b>     |  | 300  |
|    | <b>cctcgccccg gcggggagcg cgaactgggt attctggtat cccgactgca ctctaacccc</b>     |  | 360  |
|    | <b>ctggattttt cccgccctct ttgggaatgc cacgttattg aaggcctgga gaataaccgt</b>     |  | 420  |
|    | <b>tttgcccttt acaccaaatt gcaccactcg atgattgacg gcatcagcgg cgtgcgactg</b>     |  | 480  |
|    | <b>atgcagaggg tgctcaccac cgatcccgaa cgctgcaata tgccaccgcc ctggacggta</b>     |  | 540  |
|    | <b>cgcccacacc agcgcctggt tgcaaaaacc gacaaagagg ccagcgtgcc cgcagcgggt</b>     |  | 600  |
|    | <b>tcccaggcaa tggacgccct gaagctccag gcagacatgg ccccgaggct gtggcaggcc</b>     |  | 660  |
|    | <b>ggcaatcgcc tgggtgcatc ggctcgacac ccggaagacg gactgaccgc gcccttact</b>      |  | 720  |
|    | <b>ggaccggttt cgggtgctcaa tcaccgggtt accgcgcagc gacgttttgc caccagcat</b>     |  | 780  |
|    | <b>tatcaactgg accggctgaa aaacctggcc catgcttccg gcggttcctt gaacgacatc</b>     |  | 840  |
|    | <b>gttctttacc tgtgtggcac cgcattgcgg cgctttctgg ctgagcagaa caatctgcca</b>     |  | 900  |
|    | <b>gacacccgc tgacggctgg tataccgggtg aatatccggc cggcagacga cgagggtacg</b>     |  | 960  |
|    | <b>ggcaccacaga tcagttttat gattgcctcg ctggccaccg acgaagctga tccgttgaac</b>    |  | 1020 |
|    | <b>cgcttgaac agatcaaaac ctcgaccga cgggccaagg agcacctgca gaaacttcca</b>       |  | 1080 |
|    | <b>aaaagtgccc tgaccagta caccatgctg ctgatgtcac cctacattct gcaattgatg</b>      |  | 1140 |
|    | <b>tcaggtctcg gggggaggat gcgaccagtc ttcaacgtga ccatttccaa cgtgcccggc</b>     |  | 1200 |
|    | <b>ccggaaggca cgctgtatta tgaaggagcc cggcttgagg ccatgtatcc ggtatcgcta</b>     |  | 1260 |
|    | <b>atcgctcacg gcggcgccct gaacatcacc tgcttgagct atgccggatc gctgaatttc</b>     |  | 1320 |
|    | <b>ggttttaccg gctgtcggga tacgctgccg agcatgcaga aactggcggg ttataccggg</b>     |  | 1380 |

gaagctctgg atgagctgga atcgctgatt ctgccaccca agaagcgcg cccaacccgc 1440  
aagtaa 1446

<210> 29  
<211> 481  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> fuente  
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 29  
Met Lys Arg Leu Gly Thr Leu Asp Met Lys Arg Leu Gly Thr Leu Asp  
1 5 10 15  
Ala Ser Trp Leu Ala Val Glu Ser Glu Asp Thr Pro Met His Val Gly  
20 25 30  
Thr Leu Gln Ile Phe Ser Leu Pro Glu Gly Ala Pro Glu Thr Phe Leu  
35 40 45  
Arg Asp Met Val Thr Arg Met Lys Glu Ala Gly Asp Val Ala Pro Pro  
50 55 60  
Trp Gly Tyr Lys Leu Ala Trp Ser Gly Phe Leu Gly Arg Val Ile Ala  
65 70 75 80  
Pro Ala Trp Lys Val Asp Lys Asp Ile Asp Leu Asp Tyr His Val Arg  
85 90 95  
His Ser Ala Leu Pro Arg Pro Gly Gly Glu Arg Glu Leu Gly Ile Leu  
100 105 110  
Val Ser Arg Leu His Ser Asn Pro Leu Asp Phe Ser Arg Pro Leu Trp  
115 120 125  
Glu Cys His Val Ile Glu Gly Leu Glu Asn Asn Arg Phe Ala Leu Tyr  
130 135 140  
Thr Lys Met His His Ser Met Ile Asp Gly Ile Ser Gly Val Arg Leu  
145 150 155 160  
Met Gln Arg Val Leu Thr Thr Asp Pro Glu Arg Cys Asn Met Pro Pro  
165 170 175  
Pro Trp Thr Val Arg Pro His Gln Arg Arg Gly Ala Lys Thr Asp Lys  
180 185 190  
Glu Ala Ser Val Pro Ala Ala Val Ser Gln Ala Met Asp Ala Leu Lys  
195 200 205

Leu Gln Ala Asp Met Ala Pro Arg Leu Trp Gln Ala Gly Asn Arg Leu  
 210 215 220  
 Val His Ser Val Arg His Pro Glu Asp Gly Leu Thr Ala Pro Phe Thr  
 225 230 235 240  
 Gly Pro Val Ser Val Leu Asn His Arg Val Thr Ala Gln Arg Arg Phe  
 245 250 255  
 Ala Thr Gln His Tyr Gln Leu Asp Arg Leu Lys Asn Leu Ala His Ala  
 260 265 270  
 Ser Gly Gly Ser Leu Asn Asp Ile Val Leu Tyr Leu Cys Gly Thr Ala  
 275 280 285  
 Leu Arg Arg Phe Leu Ala Glu Gln Asn Asn Leu Pro Asp Thr Pro Leu  
 290 295 300  
 Thr Ala Gly Ile Pro Val Asn Ile Arg Pro Ala Asp Asp Glu Gly Thr  
 305 310 315 320  
 Gly Thr Gln Ile Ser Phe Met Ile Ala Ser Leu Ala Thr Asp Glu Ala  
 325 330 335  
 Asp Pro Leu Asn Arg Leu Gln Gln Ile Lys Thr Ser Thr Arg Arg Ala  
 340 345 350  
 Lys Glu His Leu Gln Lys Leu Pro Lys Ser Ala Leu Thr Gln Tyr Thr  
 355 360 365  
 Met Leu Leu Met Ser Pro Tyr Ile Leu Gln Leu Met Ser Gly Leu Gly  
 370 375 380  
 Gly Arg Met Arg Pro Val Phe Asn Val Thr Ile Ser Asn Val Pro Gly  
 385 390 395 400  
 Pro Glu Gly Thr Leu Tyr Tyr Glu Gly Ala Arg Leu Glu Ala Met Tyr  
 405 410 415  
 Pro Val Ser Leu Ile Ala His Gly Gly Ala Leu Asn Ile Thr Cys Leu  
 420 425 430  
 Ser Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe Gly Phe Thr Gly Cys Arg Asp Thr  
 435 440 445  
 Leu Pro Ser Met Gln Lys Leu Ala Val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Asp  
 450 455 460  
 Glu Leu Glu Ser Leu Ile Leu Pro Pro Lys Lys Arg Ala Arg Thr Arg  
 465 470 475 480

**Lys**

5 <210> 30  
 <211> 549  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 30  
 atgggcaaca cccttctcgt cgtcggcgat tcaactctccg caggctacca aatgcgtgca 60  
 gaacaaagct ggccgggtatt gctgcaacct gccctgaaac agcaggggtca tgagatcact 120  
 gtggttaatg caagcattgt gggatatgctg acgcgtcggg gtttggctcg tctgccaacc 180  
 ctgttacaac aacacaagcc ggcgtatggt atcatcgaat tgggtgcggt cgatggcttg 240  
 cgcggttttc cggcggggcac gattcgtaat aacctgagcc agatgattac cgagattcag 300  
 aacgctgacg cgaagccgat gctggttcag atcaaactcc cgccgtggca cggtaaacgc 360  
 tacagcgaca tgttcagcag catttaccg cagctgtcta aggaactggc gacgccactg 420  
 ctgccgttct ttctggagca gatttatatg aagcaagaat ggatgatgaa tgacgggtctg 480  
 catccgaaaa gcgatgcgca gccgtggatc gcagagtata tggccgagaa tatcgcgccg 540  
 tatttgtaa 549

15 <210> 31  
 <211> 182  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 31  
 Met Gly Asn Thr Leu Leu Val Val Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr  
 1 5 10 15  
 Gln Met Arg Ala Glu Gln Ser Trp Pro Val Leu Leu Gln Pro Ala Leu  
 20 25 30  
 Lys Gln Gln Gly His Glu Ile Thr Val Val Asn Ala Ser Ile Val Gly  
 35 40 45  
 Met Leu Thr Arg Arg Gly Leu Ala Arg Leu Pro Thr Leu Leu Gln Gln  
 50 55 60  
 His Lys Pro Ala Tyr Val Ile Ile Glu Leu Gly Ala Val Asp Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Arg Gly Phe Pro Ala Gly Thr Ile Arg Asn Asn Leu Ser Gln Met Ile

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     | 85  | —   |     |     |     | 90  | —   | ..  |     |     | 95  |     |     |
| Thr | Glu | Ile | Gln | Asn | Ala | Asp | Ala | Lys | Pro | Met | Leu | Val | Gln | Ile | Lys |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Leu | Pro | Pro | Trp | His | Gly | Lys | Arg | Tyr | Ser | Asp | Met | Phe | Ser | Ser | Ile |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Tyr | Pro | Gln | Leu | Ser | Lys | Glu | Leu | Ala | Thr | Pro | Leu | Leu | Pro | Phe | Phe |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Leu | Glu | Gln | Ile | Tyr | Met | Lys | Gln | Glu | Trp | Met | Met | Asn | Asp | Gly | Leu |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| His | Pro | Lys | Ser | Asp | Ala | Gln | Pro | Trp | Ile | Ala | Glu | Tyr | Met | Ala | Glu |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Asn | Ile | Ala | Pro | Tyr | Leu |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

210> 32  
 <211> 1422  
 <212> ADN  
 <213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*  
 <400> 32

5

|            |            |            |            |            |             |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| atgaaacgtc | tcggatccct | ggacgcctcc | tggctggcgg | ttgaaggtga | agacaccccg  | 60   |
| atgcatgtgg | gtacgcttca | gattttctca | ctgccggaag | gcgcaccaga | aaccttcctg  | 120  |
| cgtgacatgg | tcactcgaat | gaaagaggcc | ggcgtgtgg  | caccaccctg | gggatacaaa  | 180  |
| ctggcctggg | ctggtttcct | cgggcgcgtg | atcgccccgg | cctggaaagt | cgatttcgat  | 240  |
| atcgatctgg | attatcacgt | cgggcactca | gccctgcctc | gccccggcgg | ggagcgcgaa  | 300  |
| ctgggtattc | tggtatcccg | actgcactct | aacagtctgg | atctttcccg | ccctctttgg  | 360  |
| gaatgccacg | ttattgaagg | cctggagaat | aaccgttttg | ccctttacac | caaaatgcac  | 420  |
| cactcgatga | ttgacggcat | cagcggcgtg | cgactgatgc | agaggggtgt | caccaccgat  | 480  |
| cccgaacgct | gcaatatgcc | accgccctgg | acgcgccgcc | cacaccagcg | ccgtgggtgca | 540  |
| aaaaccgaca | aagaggccag | cgtgcgggca | gcggttgtgc | aggcaatgga | cgccctgaag  | 600  |
| ctccaggcag | acatggcccc | cgcgctgtgg | caggccggca | atcgccctgg | gcattcgggt  | 660  |
| cgacacccgg | aagacggact | gaccgcgccc | ttactggac  | cggtttcggt | gctcaatcac  | 720  |
| cgggttacca | ggcagcgccg | ttttgcaacc | caacactatc | agctggagcg | catcaagcag  | 780  |
| gtggcgcagg | cgagcaatgg | ctccctgaat | gacatcgtct | tgtatctgtg | cggcaccgca  | 840  |
| ttgcgtcgct | ttctggttga | acaagacggt | ttgccggata | ccccactgac | cgcaggcatc  | 900  |
| ccggtgaata | tccggccggc | agacgacgag | ggtaggggca | cccagatcag | ttggatgatt  | 960  |
| gcctcgctgg | ccaccgacga | agctgatccg | ttgaaccgcc | tgcaacagat | caaaacctcg  | 1020 |
| acccgacggg | ccaaggagca | cctgaggaaa | cttccaaaaa | cggccctgac | ccagtacacc  | 1080 |
| atgctgctga | tgtcacccta | cattctgcaa | ttgatgtcag | gtctcggggg | gaggatgcga  | 1140 |
| ccattcttca | acgtgaccat | ttccaacgtg | cccggccccg | aaggcacgct | gtattatgaa  | 1200 |
| ggagccccgg | ttgaggccat | gtatccgttg | tcgctaatac | ctcacggcgg | cgccctgaac  | 1260 |
| atcacctgcc | tgagctatgc | cggatcgctg | aatttcgggt | ttaccggctg | tcgggatacg  | 1320 |
| ctgccgggga | tgagaaaact | ggcggtttat | accggtgaag | ctctggatga | gctggaatcg  | 1380 |
| ctgattctgc | caccaagaa  | gcgcgcccga | accgcaagt  | aa         |             | 1422 |

<210> 33

<211> 473

<212> PRT

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 33

Met Lys Arg Leu Gly Ser Leu Asp Ala Ser Trp Leu Ala Val Glu Gly  
1 5 10 15

Glu Asp Thr Pro Met His Val Gly Thr Leu Gln Ile Phe Ser Leu Pro  
20 25 30

Glu Gly Ala Pro Glu Thr Phe Leu Arg Asp Met Val Thr Arg Met Lys  
35 40 45

Glu Ala Gly Asp Val Ala Pro Pro Trp Gly Tyr Lys Leu Ala Trp Ser  
50 55 60

Gly Phe Leu Gly Arg Val Ile Ala Pro Ala Trp Lys Val Asp Phe Asp  
65 70 75 80

Ile Asp Leu Asp Tyr His Val Arg His Ser Ala Leu Pro Arg Pro Gly  
85 90 95

Gly Glu Arg Glu Leu Gly Ile Leu Val Ser Arg Leu His Ser Asn Ser  
100 105 110

Leu Asp Phe Ser Arg Pro Leu Trp Glu Cys His Val Ile Glu Gly Leu  
115 120 125

Glu Asn Asn Arg Phe Ala Leu Tyr Thr Lys Met His His Ser Met Ile  
130 135 140

Asp Gly Ile Ser Gly Val Arg Leu Met Gln Arg Val Leu Thr Thr Asp  
145 150 155 160

Pro Glu Arg Cys Asn Met Pro Pro Pro Trp Thr Arg Arg Pro His Gln  
165 170 175

Arg Arg Gly Ala Lys Thr Asp Lys Glu Ala Ser Val Arg Ala Ala Val  
180 185 190

val Gln Ala Met Asp Ala Leu Lys Leu Gln Ala Asp Met Ala Pro Ala  
 195 200 205  
 Leu Trp Gln Ala Gly Asn Arg Leu val His Ser val Arg His Pro Glu  
 210 215 220  
 Asp Gly Leu Thr Ala Pro Phe Thr Gly Pro val Ser val Leu Asn His  
 225 230 235 240  
 Arg val Thr Arg Gln Arg Arg Phe Ala Thr Gln His Tyr Gln Leu Glu  
 245 250 255  
 Arg Ile Lys Gln val Ala Gln Ala Ser Asn Gly Ser Leu Asn Asp Ile  
 260 265 270  
 val Leu Tyr Leu Cys Gly Thr Ala Leu Arg Arg Phe Leu val Glu Gln  
 275 280 285  
 Asp Gly Leu Pro Asp Thr Pro Leu Thr Ala Gly Ile Pro val Asn Ile  
 290 295 300  
 Arg Pro Ala Asp Asp Glu Gly Thr Gly Thr Gln Ile Ser Trp Met Ile  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Leu Ala Thr Asp Glu Ala Asp Pro Leu Asn Arg Leu Gln Gln  
 325 330 335  
 Ile Lys Thr Ser Thr Arg Arg Ala Lys Glu His Leu Arg Lys Leu Pro  
 340 345 350  
 Lys Thr Ala Leu Thr Gln Tyr Thr Met Leu Leu Met Ser Pro Tyr Ile  
 355 360 365  
 Leu Gln Leu Met Ser Gly Leu Gly Gly Arg Met Arg Pro Phe Phe Asn  
 370 375 380  
 val Thr Ile Ser Asn val Pro Gly Pro Glu Gly Thr Leu Tyr Tyr Glu  
 385 390 395 400  
 Gly Ala Arg Leu Glu Ala Met Tyr Pro Leu Ser Leu Ile Ala His Gly  
 405 410 415  
 Gly Ala Leu Asn Ile Thr Cys Leu Ser Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe  
 420 425 430  
 Gly Phe Thr Gly Cys Arg Asp Thr Leu Pro Gly Met Gln Lys Leu Ala  
 435 440 445  
 val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Asp Glu Leu Glu Ser Leu Ile Leu Pro  
 450 455 460

Pro Lys Lys Arg Ala Arg Thr Arg Lys  
465 470

<210> 34  
<211> 1422  
<212> ADN  
<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 34  
atgaaacgtc tcggatccct ggacgcctcc tggctggcgg ttgaagggtga agacacccccg 60  
atgcatgtgg gtacgcttca gatttttctca ctgccggaag ggcaccaga aaccttcctg 120  
cgtgacatgg tcactcgaat gaaagaggcc ggcgatgtgg caccaccctg gggatacaaa 180  
ctggcctggt ctggtttcct cgggcgcgtg atcgccccgg cctggaaagt cgatttcgat 240  
atcgatctgg attatcacgt ccggcactca gccctgcctc gccccggcgg ggagcgcgaa 300  
ctgggtattc tggatatccg actgcactct aacagtctgg atttttcccg ccctctttgg 360  
gaatgccacg ttattgaagg cctggagaat aaccgttttg ccctttacac caaaatgcac 420  
cactcgatga ttgacggcat cagcggcgtg cgactgatgc agagggtgct caccaccgat 480  
cccgaacgct gcaatatgcc accgccctgg acgcgccgcc cacaccagcg ccgtggtgca 540  
aaaaccgaca aagaggccag cgtgcgggca gcggttgtgc aggcaatgga cgccctgaag 600  
ctccaggcag acatggcccc cgcgctgtgg caggccggca atcgccctggt gcattcggtt 660  
cgacaccggg aagacggact gaccgcgcc ttcactggac cggtttcggt gctcaatcac 720  
cgggttacca ggcagcgccg ttttgcaacc caacactatc agctggagcg catcaagcag 780  
gtggcgcagg cgagcaatgg ctccctgaat gacatcgtct tgtatctgtg cggcaccgca 840  
ttgcgtcgct ttctggttga acaagacggg ttgccggata cccactgac cgcaggcatc 900  
ccggtgaata tccggccggc agacgacgag ggtacgggca cccagatcag ttggatgatt 960  
gcctcgctgg ccaccgacga agctgatccg ttgaaccgcc tgcaacagat caaaacctcg 1020  
acccgacggg ccaaggagca cctgcagcac cttccaaaaa cgccctgac ccagtacacc 1080  
atgctgctga tgtcaccta cattctgcaa ttgatgtcag gtctcggggg gaggatgcga 1140  
ccattcttca acgtgaccat ttccaacgtg cccggcccgg aaggcacgct gtattatgaa 1200  
ggagcccggc ttgaggccat gtatccgttg tcgctaateg ctcacggcgg cgccctgaac 1260  
atcacctgcc tgagctatgc cggatcgctg aatttcggtt ttaccggctg tcgggatacg 1320  
ctgccgggga tgcagaaact ggcggtttat accggtgaag ctctggatga gctggaatcg 1380  
ctgattctgc cacccaagaa gcgcgcccga acccgcaagt aa 1422

<210> 35  
<211> 473  
<212> PRT  
<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 35  
Met Lys Arg Leu Gly Ser Leu Asp Ala Ser Trp Leu Ala Val Glu Gly  
1 5 10 15

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

Asp Gly Leu Pro Asp Thr Pro Leu Thr Ala Gly Ile Pro Val Asn Ile  
290 295 300

Arg Pro Ala Asp Asp Glu Gly Thr Gly Thr Gln Ile Ser Trp Met Ile  
305 310 315 320

Ala Ser Leu Ala Thr Asp Glu Ala Asp Pro Leu Asn Arg Leu Gln Gln  
325 330 335

Ile Lys Thr Ser Thr Arg Arg Ala Lys Glu His Leu Gln His Leu Pro  
340 345 350

Lys Thr Ala Leu Thr Gln Tyr Thr Met Leu Leu Met Ser Pro Tyr Ile  
355 360 365

Leu Gln Leu Met Ser Gly Leu Gly Gly Arg Met Arg Pro Phe Phe Asn  
370 375 380

Val Thr Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Glu Gly Thr Leu Tyr Tyr Glu  
385 390 395 400

Gly Ala Arg Leu Glu Ala Met Tyr Pro Leu Ser Leu Ile Ala His Gly  
405 410 415

Gly Ala Leu Asn Ile Thr Cys Leu Ser Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe  
420 425 430

Gly Phe Thr Gly Cys Arg Asp Thr Leu Pro Gly Met Gln Lys Leu Ala  
435 440 445

Val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Asp Glu Leu Glu Ser Leu Ile Leu Pro  
450 455 460

Pro Lys Lys Arg Ala Arg Thr Arg Lys  
465 470

<210> 36

<211> 1422

5 <212> ADN

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 36

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| atgaaacgtc tcggacccct ggacgcctcc tggctggcgg ttgaagggtga agacaccccg | 60   |
| atgcatgtgg gtacgcttca gattttctca ctgccggaag acgcaccaga aaccttcctg  | 120  |
| cgtgacatgg tcaagcgaat gaaagaggcc ggcgatgtgg caccaccctg gggattaaaa  | 180  |
| ctggcctggg ctggtttcct cgggcgcgtg atcgccccgg cctggaaagt cgataaggat  | 240  |
| atcgatctgg attatcacgt ccggcactca gccctgcctc gcccggcggg ggagcgcgaa  | 300  |
| ctgggtattc tggatatccc actgcactct aacagtctgg atttttcccg ccctctttgg  | 360  |
| gaatgccacg ttattgaagg cctggagaat aaccgttttg ccctttacac caaaatgcac  | 420  |
| cactcgatga ttgacggcat cagcggcgtg cgactgatgc agagggtgct caccaccgat  | 480  |
| cccgaagagt gcaatatgcc accgccctgg acgcgccgcc cacaccagcg ccgtggtgca  | 540  |
| aaaaccgaca aagaggccag cgtgcgggca gcggtttccc aggcaatgga cgccctgaag  | 600  |
| ctccaggcag acatggcccc cgcgctgtgg caggccggca atcgcttgtt gcattcgggt  | 660  |
| cgacacccgg aagacggact gaccgcgccc ttcactggac cgtgctcggg gctcaatcac  | 720  |
| cgggttaccg cgggccgacg ttttgccacc cagcattatc aactggagcg gctgaaaaac  | 780  |
| ctggcccatg cttccggcgg tgggttgaac gacatcgttc tttacctgtg tggcaccgca  | 840  |
| ttgcggcgct ttctggctga gcagaacaat ctgccagaca ccccgctgac ggctggtata  | 900  |
| ccggtgaata tccggccggc aaacgacgag gtcacgggca cccagatcag ttggatgatt  | 960  |
| tgttcgtctg ccaccgacga agctgatccg ttgaaccgcc tgcaacagat caaaacctcg  | 1020 |
| acccgacggg ccaaggagca cctgcagaaa cttccaaaaa cggccctgac ccagtacacc  | 1080 |
| atgctgctga tgtcaccctg gattctgcaa ttgatgtcag gtctcggggg gaggatgcga  | 1140 |
| ccagtcttca acgtgaccat ttccaacgtg cccggccccg aagagacgct gtattatgaa  | 1200 |
| ggagcccggc ttgaggccat gtatccgttg tcgctaatac ctcacggcgg cgccctgaac  | 1260 |
| atcacctgcc tgagctatgc cggatcgctg aatttcgggtt ttaccggctg tcgggatacg | 1320 |
| ctgccgggga tgcagaaact ggcggtttat accggtgaag ctctggatga gctggaatcg  | 1380 |
| ctggttctgc caccgaagaa gcgcgcccga acccgcaagt aa                     | 1422 |

<210> 37

<211> 473

<212> PRT

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 37

5

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Lys | Arg | Leu | Gly | Pro | Leu | Asp | Ala | Ser | Trp | Leu | Ala | Val | Glu | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Glu | Asp | Thr | Pro | Met | His | Val | Gly | Thr | Leu | Gln | Ile | Phe | Ser | Leu | Pro |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Glu | Asp | Ala | Pro | Glu | Thr | Phe | Leu | Arg | Asp | Met | Val | Lys | Arg | Met | Lys |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Glu | Ala | Gly | Asp | Val | Ala | Pro | Pro | Trp | Gly | Leu | Lys | Leu | Ala | Trp | Ser |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Gly | Phe | Leu | Gly | Arg | Val | Ile | Ala | Pro | Ala | Trp | Lys | Val | Asp | Lys | Asp |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ile | Asp | Leu | Asp | Tyr | His | Val | Arg | His | Ser | Ala | Leu | Pro | Arg | Pro | Gly |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Gly | Glu | Arg | Glu | Leu | Gly | Ile | Leu | Val | Ser | Arg | Leu | His | Ser | Asn | Ser |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

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

Val Thr Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Glu Glu Thr Leu Tyr Tyr Glu  
 385 390 395 400  
 Gly Ala Arg Leu Glu Ala Met Tyr Pro Leu Ser Leu Ile Ala His Gly  
 405 410 415  
 Gly Ala Leu Asn Ile Thr Cys Leu Ser Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe  
 420 425 430  
 Gly Phe Thr Gly Cys Arg Asp Thr Leu Pro Gly Met Gln Lys Leu Ala  
 435 440 445  
 Val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Asp Glu Leu Glu Ser Leu Val Leu Pro  
 450 455 460  
 Pro Lys Lys Arg Ala Arg Thr Arg Lys  
 465 470

<210> 38  
 <211> 1422  
 <212> ADN  
 <213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400>38  
 atgaaacgctc tcggacccct ggacgcctcc tggctggcgg ttgaagggtga agacaccccg 60  
 atgcatgtgg gtacgcttca gattttctca ctgccggaag acgcaccaga aaccttcctg 120  
 cgtgacatgg tcaagcgaat gaaagaggcc ggcgatgtgg caccaccctg gggatgcaaa 180  
 ctggcctggt ctggtttcct cgggcgcgtg atcgccccgg cctggaaaagt cgataaggat 240  
 atcgatctgg attatcacgt ccggcactca gccctgcctc gccccggcgg ggagcgcgaa 300  
 ctgggtattc tggatatccg actgcactct aacagtctgg atttttcccg ccctctttgg 360  
 gaatgccacg ttattgaagg cctggagaat aaccgttttg ccctttacac caaatgcac 420  
 cactcgatga ttgacggcat cagcggcggt cgactgatgc agaggggtgct caccaccgat 480  
 cccgaacgct gcaatatgcc accgccctgg acgcgccgcc cacaccagcg ccgtggtgca 540  
 aaaaccgaca aagaggccag cgtgcgggca gcggtttccc aggcaatgga cgccctgaag 600  
 ctccaggcag acatggcccc cgcgctgtgg caggccggca atcgcttggg gcattcgggt 660  
 cgacaccggg aagacggact gaccgcgcc ttcactggac cgtgctcggg gctcaatcac 720  
 cgggttaccg cgggccgacg ttttgccacc cagcattatc aactggaccg gatcaaaaac 780  
 ctggcccatg cttccggcgg tgggttgaac gacatcggtt ttacctgtg tggcaccgca 840  
 ttgcggcgct ttctggctga gcagaacaat ctgccagaca ccccgctgac ggctggtata 900  
 ccggtgaata tccggccggc aaacgacgag gtcacgggca ccagatcag ttggatgatt 960  
 tgttcgctgg ccaccgacga agctgatccg ttgaaccgcc tgcaacagat caaacctcg 1020  
 acccgacggg ccaaggagca cctgcagaaa cttccaaaaa cggccctgac ccagtacacc 1080

# ES 2 647 412 T3

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| atgctgctga tgtcaccctg gattctgcaa ttgatgtcag gtctcggggg gaggatgcga  | 1140 |
| ccagtcttca acgtgaccat ttccaacgtg cccggcccgg aagagacgct gtattatgaa  | 1200 |
| ggagcccggc ttgaggccat gtatccgttg tcgctaata ctcacggcgg cgccctgaac   | 1260 |
| atcacctgcc tgagctatgc cggatcgctg aatttcgggtt ttaccggctg tcgggatacg | 1320 |
| ctgccgggga tgcagaaact ggcggtttat accggtgaag ctctggatga gctggaatcg  | 1380 |
| ctggttctgc cacccaagaa gcgcgcccga acccgcaagt aa                     | 1422 |

<210> 39

<211> 473

5 <212> PRT

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 39

Met Lys Arg Leu Gly Pro Leu Asp Ala Ser Trp Leu Ala Val Glu Gly  
1 5 10 15

Glu Asp Thr Pro Met His Val Gly Thr Leu Gln Ile Phe Ser Leu Pro  
20 25 30

Glu Asp Ala Pro Glu Thr Phe Leu Arg Asp Met Val Lys Arg Met Lys  
35 40 45

Glu Ala Gly Asp Val Ala Pro Pro Trp Gly Cys Lys Leu Ala Trp Ser  
50 55 60

Gly Phe Leu Gly Arg Val Ile Ala Pro Ala Trp Lys Val Asp Lys Asp  
65 70 75 80

Ile Asp Leu Asp Tyr His Val Arg His Ser Ala Leu Pro Arg Pro Gly  
85 90 95

Gly Glu Arg Glu Leu Gly Ile Leu Val Ser Arg Leu His Ser Asn Ser  
100 105 110

Leu Asp Phe Ser Arg Pro Leu Trp Glu Cys His Val Ile Glu Gly Leu  
115 120 125

Glu Asn Asn Arg Phe Ala Leu Tyr Thr Lys Met His His Ser Met Ile  
130 135 140

Asp Gly Ile Ser Gly Val Arg Leu Met Gln Arg Val Leu Thr Thr Asp  
145 150 155 160

Pro Glu Arg Cys Asn Met Pro Pro Pro Trp Thr Arg Arg Pro His Gln  
165 170 175

Arg Arg Gly Ala Lys Thr Asp Lys Glu Ala Ser Val Arg Ala Ala Val  
180 185 190

Ser Gln Ala Met Asp Ala Leu Lys Leu Gln Ala Asp Met Ala Pro Ala

|                                     |                             |                                     |                     |     |
|-------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------|-----|
| 195                                 |                             | 200                                 |                     | 205 |
| Leu Trp Gln Ala Gly Asn Arg 215     | Leu Val His Ser Val 220     | Arg His Pro Glu                     |                     |     |
| Asp Gly Leu Thr Ala Pro 230         | Phe Thr Gly Pro Cys 235     | Ser Val Leu Asn His 240             |                     |     |
| Arg Val Thr Ala Gly 245             | Arg Arg Phe Ala Thr 250     | Gln His Tyr Gln Leu Asp 255         |                     |     |
| Arg Ile Lys Asn 260                 | Leu Ala His Ala Ser 265     | Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile 270     |                     |     |
| Val Leu Tyr 275                     | Leu Cys Gly Thr Ala 280     | Leu Arg Arg Phe Leu Ala Glu Gln 285 |                     |     |
| Asn Asn 290                         | Leu Pro Asp Thr Pro 295     | Leu Thr Ala Gly Ile 300             | Pro Val Asn Ile     |     |
| Arg 305                             | Pro Ala Asn Asp Glu 310     | Val Thr Gly Thr Gln Ile 315         | Ser Trp Met Ile 320 |     |
| Cys Ser Leu Ala Thr 325             | Asp Glu Ala Asp Pro 330     | Leu Asn Arg Leu Gln Gln 335         |                     |     |
| Ile Lys Thr 340                     | Ser Thr Arg Arg Ala Lys 345 | Glu His Leu Gln Lys 350             | Leu Pro             |     |
| Lys Thr Ala 355                     | Leu Thr Gln Tyr Thr 360     | Met Leu Leu Met Ser 365             | Pro Trp Ile         |     |
| Leu Gln 370                         | Leu Met Ser Gly Leu 375     | Gly Gly Arg Met Arg 380             | Pro Val Phe Asn     |     |
| Val Thr Ile Ser Asn 390             | Val Pro Gly Pro Glu 395     | Glu Thr Leu Tyr Tyr Glu 400         |                     |     |
| Gly Ala Arg Leu Glu 405             | Ala Met Tyr Pro Leu 410     | Ser Leu Ile Thr His Gly 415         |                     |     |
| Gly Ala Leu Asn 420                 | Ile Thr Cys Leu Ser 425     | Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe 430     |                     |     |
| Gly Phe Thr 435                     | Gly Cys Arg Asp Thr 440     | Leu Pro Gly Met Gln Lys Leu Ala 445 |                     |     |
| Val Tyr Thr 450                     | Gly Glu Ala Leu 455         | Asp Glu Leu Glu Ser 460             | Leu Val Leu Pro     |     |
| Pro Lys Lys Arg Ala Arg Thr Arg Lys |                             |                                     |                     |     |

465

470

<210> 40  
<211> 1422  
<212> ADN  
<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 40  
atgaaacgctc tcggacccct ggacgcctcc tggctggcgg ttgaagggtga agacaccccg 60  
atgcatgtgg gtacgcttca gattttctca ctgccggaag gcgcaccaga aaccttcctg 120  
cgtgacatgg tcgctcgaat gaaagaggcc ggcgatgtgg caccaccctg gggatacaaa 180  
ctggcctggt ctggtttcct cgggcgcgtg atcgccccgg cctggaaaagt cgataaggat 240  
atcgatctgg attatcacgt ccggcactca gccctgcctc gccccggcgg ggagcgcgaa 300  
ctgggtattc tggatcccg actgcactct aacagtctgg atttttcccg ccctctttgg 360  
gaatgccacg ttattgaagg cctggagaat aaccgttttg ccctttacac caaatgcac 420  
cactcgatga ttgacggcat cagcggcgtg cgactgatgc agaggggtgct ctccaccgat 480  
cccgaacgct gcgatatgcc accgccctgg tcgcgcgcc cacaccagcg ccgtggtgca 540  
aaaaccgaca aagaggccag cgtgcgggca gcggtttccc aggcaatgga cgccctgaag 600  
ctccaggcag acatggcccc cgcgctgtgg caggccggca atcgctgat ccattcgggt 660  
cgacacccgg aagacggact gaccgcgcc ttcactggac cgtgctcggg gctcaatcac 720  
cgggttaccg cgggccgacg ttttgccacc cagcattatc aactggaccg gatcaaaaac 780  
ctggcccatg cttccggcgg tgggttgaac gacatcgttc tttacctgtg tggcaccgca 840  
ttgcggcgct ttctggctga gcagaacaat ctgccagaca ccccgctgac ggctggtata 900  
ccggtgaata tccggccggc aaacgacgag gtcacgggca cccagatcag ttggatgatt 960  
tgttcgtggt ccaccgacga agctgatccg ttgaaccgcc tgaaacagat caaaacctcg 1020  
acccgacggg ccaaggagca cctgcagaaa cttccaaaaa cgccctgac ccagtacacc 1080  
atgctgctga tgtcaccctg gattctgcaa ttgatgtcag gtctcggggg gaggatgcga 1140  
ccagtcttca acgtgaccat ttccaacgtg cccggccccg aagagacgct gtattatgaa 1200  
ggagcccggc ttgaggccat gtatccgttg tcgctaatac ctcacggcgg cgccctgaac 1260  
atcacctgcc tgagctatgc cggatcgtg aatttcgggt ttaccggctg tcgggatacg 1320  
ctgccgggga tgcagaaact ggcggtttat accggtgaag ctctggatga gctggaatcg 1380  
ctggttctgc cacccaagaa gcgcgcccga acccgcaagt aa 1422

<210> 41  
<211> 473  
<212> PRT  
<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 41  
Met Lys Arg Leu Gly Pro Leu Asp Ala Ser Trp Leu Ala Val Glu Gly  
1 5 10 15

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

Asn 290 Asn 290 Leu Pro Asp Thr Pro 295 Leu Thr Ala Gly Ile 300 Pro Val Asn Ile  
 Arg 305 Pro Ala Asn Asp Glu 310 Val Thr Gly Thr Gln 315 Ile Ser Trp Met Ile 320  
 Cys Ser Leu Ala Thr 325 Asp Glu Ala Asp Pro 330 Leu Asn Arg Leu Lys 335 Gln  
 Ile Lys Thr Ser 340 Thr Arg Arg Ala Lys 345 Glu His Leu Gln Lys 350 Leu Pro  
 Lys Thr Ala 355 Leu Thr Gln Tyr Thr 360 Met Leu Leu Met Ser 365 Pro Trp Ile  
 Leu Gln 370 Leu Met Ser Gly Leu 375 Gly Gly Arg Met Arg 380 Pro Val Phe Asn  
 Val 385 Thr Ile Ser Asn Val 390 Pro Gly Pro Glu Glu 395 Thr Leu Tyr Tyr Glu 400  
 Gly Ala Arg Leu Glu 405 Ala Met Tyr Pro Leu 410 Ser Leu Ile Ala His 415 Gly  
 Gly Ala Leu Asn 420 Ile Thr Cys Leu Ser 425 Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe  
 Gly Phe Thr 435 Gly Cys Arg Asp Thr 440 Leu Pro Gly Met Gln 445 Lys Leu Ala  
 Val 450 Tyr Thr Gly Glu Ala Leu 455 Asp Glu Leu Glu Ser 460 Leu Val Leu Pro  
 Pro 465 Lys Lys Arg Ala Arg 470 Thr Arg Lys

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 1422

&lt;212&gt; ADN

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

&lt;400&gt; 42

|            |            |            |            |             |             |      |
|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
| atgaaacgtc | tcggacccct | ggacgcctcc | tggctggcgg | ttgaaggtga  | agacaccccg  | 60   |
| atgcatgtgg | gtacgcttca | gattttctca | ctgccggaag | gcgcaccaga  | aaccttctcg  | 120  |
| cgtgacatgg | tcactcgaat | gaaagaggcc | ggcgatgtgg | caccaccctg  | gggattaaaa  | 180  |
| ctggcctggg | ctggtttcct | cgggcgcgtg | atcgccccgg | cctggaaagt  | cgataaggat  | 240  |
| atcgatctgg | attatcacgt | ccggcactca | gccctgcctc | gccccggcgg  | ggagcgcgaa  | 300  |
| ctgggtattc | tggatatccc | actgcactct | aacagtctgg | atttttcccc  | ccctctttgg  | 360  |
| gaatgccacg | ttattgaagg | cctggagaat | aaccgttttg | ccctttacac  | caaaatgcac  | 420  |
| cactcgatga | ttgacggcat | cagcggcgtg | cgactgatgc | agaggggtgct | caccaccgat  | 480  |
| cccgaagagt | gcaatatgcc | accgccctgg | tcgcgccgcc | cacaccagcg  | ccgtgggttca | 540  |
| aaaaccgaca | aagaggccag | cgtgcgggca | gcggtttccc | aggcaatgga  | cgccctgaag  | 600  |
| ctccaggcag | acatggcccc | cgcgctgtgg | caggccggca | atcgccctgg  | gcattcgggt  | 660  |
| cgacacccgg | aagacggact | gaccgcgccc | ttcactggac | cgtgctcggt  | gctcaatcac  | 720  |
| cgggttaccg | cgggccgacg | ttttgccacc | cagcattatc | aactggaccg  | gatcaaaaac  | 780  |
| ctggcccatg | cttccggcgg | tgggttgaac | gacatcgttc | tttacctgtg  | tggcaccgca  | 840  |
| ttgcggcgct | ttctggctga | gcagaacaat | ctgccagaca | ccccgctgac  | ggctgggtata | 900  |
| ccggtgaata | tccggccggc | aaacgacgag | gtcacgggca | cccagatcag  | ttggatgatt  | 960  |
| tgttcgctgg | ccaccgacga | agctgatccg | ttgaaccgcc | tgcaacagat  | caaaacctcg  | 1020 |
| acccgacggg | ccaaggagca | cctgcagaaa | cttccaaaaa | aggccctgac  | ccagtacacc  | 1080 |
| atgctgctga | tgtcaccctg | gattctgcaa | ttgatgtcag | gtctcggggg  | gaggatgcga  | 1140 |
| ccagtcttca | acgtgaccat | ttccaacgtg | cccggccccg | aagagacgct  | gtattatgaa  | 1200 |
| ggagcccggc | ttgaggccat | gtatccgttg | tcgctaatac | ctcacggcgg  | cgccctgaac  | 1260 |
| atcacctgcc | tgagctatgc | cggatcgctg | aatttcgggt | ttaccggctg  | tcgggatacg  | 1320 |
| ctgccgggga | tgcagaaact | ggcggtttat | accggtgaag | ctctggatga  | gctggaatcg  | 1380 |
| ctggttctgc | cacccaagaa | gcgcgcccga | acccgcaagt | aa          |             | 1422 |

<210> 43

5 <211> 473

<212> PRT

<213> *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

<400> 43

Met Lys Arg Leu Gly Pro Leu Asp Ala Ser Trp Leu Ala Val Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Thr Pro Met His Val Gly Thr Leu Gln Ile Phe Ser Leu Pro  
 20 25 30  
 Glu Gly Ala Pro Glu Thr Phe Leu Arg Asp Met Val Thr Arg Met Lys  
 35 40 45  
 Glu Ala Gly Asp Val Ala Pro Pro Trp Gly Leu Lys Leu Ala Trp Ser  
 50 55 60  
 Gly Phe Leu Gly Arg Val Ile Ala Pro Ala Trp Lys Val Asp Lys Asp  
 65 70 75 80  
 Ile Asp Leu Asp Tyr His Val Arg His Ser Ala Leu Pro Arg Pro Gly  
 85 90 95  
 Gly Glu Arg Glu Leu Gly Ile Leu Val Ser Arg Leu His Ser Asn Ser  
 100 105 110

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

Val Thr Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Glu Glu Thr Leu Tyr Tyr Glu  
385 390 395 400

Gly Ala Arg Leu Glu Ala Met Tyr Pro Leu Ser Leu Ile Ala His Gly  
405 410 415

Gly Ala Leu Asn Ile Thr Cys Leu Ser Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe  
420 425 430

Gly Phe Thr Gly Cys Arg Asp Thr Leu Pro Gly Met Gln Lys Leu Ala  
435 440 445

Val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Asp Glu Leu Glu Ser Leu Val Leu Pro  
450 455 460

Pro Lys Lys Arg Ala Arg Thr Arg Lys  
465 470

<210> 44

<211> 1470

5 <212> ADN

<213> *Marinobacter adhaerens*

<400> 44

|            |            |            |             |             |            |      |
|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| atgaaacgcc | tgggaacgct | ggatgcctct | tggctggccg  | tagaatctga  | agacaccccc | 60   |
| atgcatgtgg | gcaacctgca | gatcttttcg | ctaccggagg  | gcgcccctga  | aaccttcctc | 120  |
| cgggacatgg | tgacccgcat | gaaggaaacc | ggcgatgtcg  | cgccccctg   | gggtttaaag | 180  |
| cttgccctgg | ccggactggt | gggtcgggta | ctggcgccgg  | gctggaaagt  | cgacaagaaa | 240  |
| atcgatctgg | attaccacgt | gcgtcactcg | gcaactgccg  | gccccggcgg  | tgaacgggaa | 300  |
| ctgggcatat | tggtatcgcg | cctgcactcc | aacccccctg  | actttgcccg  | cccactctgg | 360  |
| gaatgccacg | ttatcgaggg | cctcgagaat | aaccgttttg  | cgctctacac  | caagatgcat | 420  |
| cattccatga | ttgatggcat | cagtgggtga | cgctgatgc   | aacgggtact  | gacaaccgat | 480  |
| cccgacaaac | gggacatgcc | gccaccctgg | tcgggttcggc | cggagcgccg  | tcgcggcagc | 540  |
| aaatccgatt | ccgaggccag | cgtgcccggc | gcgggtctcac | aggccatgga  | ggcactgaaa | 600  |
| ctgcaagcgg | atatggcgcc | acgtctgttg | caagcgggca  | acaggttggt  | gcattcggtc | 660  |
| cgtcaccccc | aggatggtct | cacggcaccg | tttaccgggc  | ccgtgtccaa  | gatcaatcac | 720  |
| cgggttaccg | gccagcgccg | gtttgccacc | cagcattacc  | agctcgacag  | gatcaaggag | 780  |
| cttgcccacg | tttcggcgcg | ttccctcaac | gatatcggtc  | tgtacctgtg  | cggaactgcc | 840  |
| ctcaggcggt | ttctgctgga | acagaatgaa | ctgccggacg  | ctccccctcac | cgccggcata | 900  |
| ccggttaaca | tccggccgtc | cgatgacgaa | gggacaggca  | cccagatcag  | tttcatgatc | 960  |
| tcttcgcttg | cgaccgacga | agccgatccg | ctgacccgcc  | tgcaaaacat  | caaggcgta  | 1020 |
| acgcgaagg  | ccaaagagca | tttgcagaag | ctgccccaaa  | gcgcgctcac  | ccagtaacc  | 1080 |
| atgctcctga | tgtcgcctta | tattctgcag | ctgatgtccg  | gccttggcgg  | tcgcatgcgg | 1140 |
| ccggtattta | acgtcacgat | ttccaatgtg | ccggggcccc  | agagaacgct  | ctactacgag | 1200 |
| ggcgcgaaac | tggaagccat | gtaccctgtc | tcgctgatta  | ctcacgggtg  | cgctttgaac | 1260 |
| atcacctgcc | tgagctatga | cggttcactg | aacttcgggt  | atacgggctg  | cagggatacc | 1320 |
| ctgccgagca | tgcagagact | tgcggtttac | acgggtgagg  | cactggacga  | actggaaagc | 1380 |
| ctgattcttc | cgccaaaggc | caaaccgaaa | gctgcggcca  | agcccagtg   | gccgcgcaaa | 1440 |
| cagccgacga | aaaagagtaa | agcggactga |             |             |            | 1470 |

<210> 45  
 <211> 489  
 <212> PRT  
 <213> *Marinobacter adhaerens*

<400> 45

Met Lys Arg Leu Gly Thr Leu Asp Ala Ser Trp Leu Ala Val Glu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Thr Pro Met His Val Gly Asn Leu Gln Ile Phe Ser Leu Pro  
 20 25 30  
 Glu Gly Ala Pro Glu Thr Phe Leu Arg Asp Met Val Thr Arg Met Lys  
 35 40 45  
 Glu Thr Gly Asp Val Ala Pro Pro Trp Gly Leu Lys Leu Ala Trp Ser  
 50 55 60  
 Gly Leu Leu Gly Arg Val Leu Ala Pro Gly Trp Lys Val Asp Lys Lys  
 65 70 75 80  
 Ile Asp Leu Asp Tyr His Val Arg His Ser Ala Leu Pro Arg Pro Gly  
 85 90 95  
 Gly Glu Arg Glu Leu Gly Ile Leu Val Ser Arg Leu His Ser Asn Pro  
 100 105 110  
 Leu Asp Phe Ala Arg Pro Leu Trp Glu Cys His Val Ile Glu Gly Leu  
 115 120 125  
 Glu Asn Asn Arg Phe Ala Leu Tyr Thr Lys Met His His Ser Met Ile  
 130 135 140  
 Asp Gly Ile Ser Gly Val Arg Leu Met Gln Arg Val Leu Thr Thr Asp  
 145 150 155 160  
 Pro Asp Lys Arg Asp Met Pro Pro Pro Trp Ser Val Arg Pro Glu Arg  
 165 170 175  
 Arg Arg Gly Ser Lys Ser Asp Ser Glu Ala Ser Val Pro Gly Ala Val  
 180 185 190

Ser Gln Ala Met Glu Ala Leu Lys Leu Gln Ala Asp Met Ala Pro Arg  
 195 200 205  
 Leu Leu Gln Ala Gly Asn Arg Leu Val His Ser Val Arg His Pro Glu  
 210 215 220  
 Asp Gly Leu Thr Ala Pro Phe Thr Gly Pro Val Ser Lys Ile Asn His  
 225 230 235 240  
 Arg Val Thr Gly Gln Arg Arg Phe Ala Thr Gln His Tyr Gln Leu Asp  
 245 250 255  
 Arg Ile Lys Glu Leu Ala His Val Ser Gly Ala Ser Leu Asn Asp Ile  
 260 265 270  
 Val Leu Tyr Leu Cys Gly Thr Ala Leu Arg Arg Phe Leu Leu Glu Gln  
 275 280 285  
 Asn Glu Leu Pro Asp Ala Pro Leu Thr Ala Gly Ile Pro Val Asn Ile  
 290 295 300  
 Arg Pro Ser Asp Asp Glu Gly Thr Gly Thr Gln Ile Ser Phe Met Ile  
 305 310 315 320  
 Ser Ser Leu Ala Thr Asp Glu Ala Asp Pro Leu Thr Arg Leu Gln Asn  
 325 330 335  
 Ile Lys Ala Ser Thr Arg Arg Ala Lys Glu His Leu Gln Lys Leu Pro  
 340 345 350  
 Lys Ser Ala Leu Thr Gln Tyr Thr Met Leu Leu Met Ser Pro Tyr Ile  
 355 360 365  
 Leu Gln Leu Met Ser Gly Leu Gly Gly Arg Met Arg Pro Val Phe Asn  
 370 375 380  
 Val Thr Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Gln Arg Thr Leu Tyr Tyr Glu  
 385 390 395 400  
 Gly Ala Lys Leu Glu Ala Met Tyr Pro Val Ser Leu Ile Thr His Gly  
 405 410 415  
 Gly Ala Leu Asn Ile Thr Cys Leu Ser Tyr Asp Gly Ser Leu Asn Phe  
 420 425 430  
 Gly Tyr Thr Gly Cys Arg Asp Thr Leu Pro Ser Met Gln Arg Leu Ala  
 435 440 445  
 Val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Asp Glu Leu Glu Ser Leu Ile Leu Pro  
 450 455 460

Pro Lys Ala Lys Pro Lys Ala Ala Ala Lys Pro Ser Ala Pro Arg Lys  
465 470 475 480

Gln Pro Thr Lys Lys Ser Lys Ala Asp  
485

<210> 46  
<211> 1458  
<212> ADN  
<213> *Marinobacter algicola*

<400> 46  
atgaaacgcc tgggcacact ggacgcttcc tggttggcgg tggaaatcgga agacacccccg 60  
atgcacgtcg gcaacctgca gatTTTTTca ctaccggaag atgctccgga gacgtttcta 120  
agagacatgc tcgcccgcgt gaaagccgat gccgatgtag cgccgccctg gtgctacaag 180  
ctcgccTTTT cgggggttcct gggccgcctg gtcgccccgt cctggaaggt cgacaagaag 240  
ctggatctcg actaccacgt tcgacactcg gcgttgccgc gccccggcag tgaacgggaa 300  
cttggcatcc tggatatccag gctgcattcc aaccgcgtgg atTTTTcccg cccgctttgg 360  
gaatgccaca ttatcgaggg cctggagaac aaccgttttg ccctctacac caagatgcat 420  
cattccatga ttgatggcat aagcgggtgtt cggctgatgc agcgggtgct cagcgaggac 480  
cccgggtgaga ttaatatgct gccgccatgg tcggtacgcc cgagcggac acggggcgagc 540  
aagacagatt ccgaagccag catttcagcc gccctgtccc aggccatgga agccctgagg 600  
attcaggccg acatggcgcc gaggtcttgg aatgcgatga accgcctgat ccagtccgca 660  
cggcaccggg aagagggggt gaccgcgccc tttgccggcc cggtttccgc cctcaatcac 720  
cgggtcaccg gtcagcggcg gtttgccacc cagcactacc agctcgaacg gatcaaacag 780  
gtcgcccagg cgtccaacgg ctccctgaac gacattgtgc tctacctctg tggcactgcc 840  
ctgcgccgct ttcttgttga acaggatggg ttgccggata cgccactcac cgccggaatt 900  
ccggtgaata tccgccccctc cgatgaccag ggcacgggca cccagatcag cttcatgatt 960  
gcctcactgg cgaccgacga agccgatccc ctcaagcggc tgaagagcat caaacactct 1020  
acccgcaggg ccaaacaaca ccttcagaaa ctgccgcgta aagccctgac ccaatacacc 1080  
atgctgctga tgtcgcccta catcctgcag ttgatgtcag gcctggggcg gcgaatgcgc 1140  
ccggtgttca acgtgaccat ctccaacgtg ccaggggccag gggaaaccct ttactatgaa 1200  
ggagcacgac tggaggcgat gtaccgggtt tcgcttattg cccacggcgg tgcgtcaac 1260  
attacttgcc tgagctacgc cggctcgctc aacttcgggt tcacgggctg ccgcgatacg 1320  
ttgccagta tgcagaagct ggcggtctac accggtgagg ctttggatga actggaaagc 1380  
ctggtttcgc caccacaaa tcagacaaa accaacgctc gaaaggcgcc tcgcaaaaag 1440  
actgcgaaa agagctaa 1458

<210> 47  
<211> 485  
<212> PRT

<213> *Marinobacter algicola*

<400> 47

Met Lys Arg Leu Gly Thr Leu Asp Ala Ser Trp Leu Ala Val Glu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Thr Pro Met His Val Gly Asn Leu Gln Ile Phe Ser Leu Pro  
 20 25 30  
 Glu Asp Ala Pro Glu Thr Phe Leu Arg Asp Met Leu Ala Arg Met Lys  
 35 40 45  
 Ala Asp Ala Asp Val Ala Pro Pro Trp Cys Tyr Lys Leu Ala Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Phe Leu Gly Arg Leu Val Ala Pro Ser Trp Lys Val Asp Lys Lys  
 65 70 75 80  
 Leu Asp Leu Asp Tyr His Val Arg His Ser Ala Leu Pro Arg Pro Gly  
 85 90 95  
 Ser Glu Arg Glu Leu Gly Ile Leu Val Ser Arg Leu His Ser Asn Pro  
 100 105 110  
 Leu Asp Phe Ser Arg Pro Leu Trp Glu Cys His Ile Ile Glu Gly Leu  
 115 120 125  
 Glu Asn Asn Arg Phe Ala Leu Tyr Thr Lys Met His His Ser Met Ile  
 130 135 140  
 Asp Gly Ile Ser Gly Val Arg Leu Met Gln Arg Val Leu Ser Glu Asp  
 145 150 155 160  
 Pro Gly Glu Ile Asn Met Leu Pro Pro Trp Ser Val Arg Pro Glu Arg  
 165 170 175  
 Thr Arg Gly Ser Lys Thr Asp Ser Glu Ala Ser Ile Ser Ala Ala Leu  
 180 185 190  
 Ser Gln Ala Met Glu Ala Leu Arg Ile Gln Ala Asp Met Ala Pro Arg  
 195 200 205  
 Leu Trp Asn Ala Met Asn Arg Leu Ile Gln Ser Ala Arg His Pro Glu  
 210 215 220  
 Glu Gly Leu Thr Ala Pro Phe Ala Gly Pro Val Ser Ala Leu Asn His  
 225 230 235 240  
 Arg Val Thr Gly Gln Arg Arg Phe Ala Thr Gln His Tyr Gln Leu Glu  
 245 250 255  
 Arg Ile Lys Gln Val Ala Gln Ala Ser Asn Gly Ser Leu Asn Asp Ile

260 265 270  
 Val Leu Tyr<sub>275</sub> Leu Cys Gly Thr Ala<sub>280</sub> Leu Arg Arg Phe Leu<sub>285</sub> Val Glu Gln  
 Asp Gly<sub>290</sub> Leu Pro Asp Thr Pro<sub>295</sub> Leu Thr Ala Gly Ile<sub>300</sub> Pro Val Asn Ile  
 Arg<sub>305</sub> Pro Ser Asp Asp Gln<sub>310</sub> Gly Thr Gly Thr Gln<sub>315</sub> Ile Ser Phe Met Ile<sub>320</sub>  
 Ala Ser Leu Ala Thr<sub>325</sub> Asp Glu Ala Asp Pro<sub>330</sub> Leu Lys Arg Leu Lys<sub>335</sub> Ser  
 Ile Lys His Ser<sub>340</sub> Thr Arg Arg Ala Lys<sub>345</sub> Gln His Leu Gln Lys<sub>350</sub> Leu Pro  
 Arg Lys Ala<sub>355</sub> Leu Thr Gln Tyr Thr<sub>360</sub> Met Leu Leu Met Ser<sub>365</sub> Pro Tyr Ile  
 Leu Gln<sub>370</sub> Leu Met Ser Gly Leu<sub>375</sub> Gly Gly Arg Met Arg<sub>380</sub> Pro Val Phe Asn  
 Val Thr Ile Ser Asn Val<sub>390</sub> Pro Gly Pro Gly Glu<sub>395</sub> Thr Leu Tyr Tyr Glu<sub>400</sub>  
 Gly Ala Arg Leu Glu<sub>405</sub> Ala Met Tyr Pro Val<sub>410</sub> Ser Leu Ile Ala His<sub>415</sub> Gly  
 Gly Ala Leu Asn<sub>420</sub> Ile Thr Cys Leu Ser<sub>425</sub> Tyr Ala Gly Ser Leu<sub>430</sub> Asn Phe  
 Gly Phe Thr<sub>435</sub> Gly Cys Arg Asp Thr<sub>440</sub> Leu Pro Ser Met Gln<sub>445</sub> Lys Leu Ala  
 Val Tyr<sub>450</sub> Thr Gly Glu Ala Leu<sub>455</sub> Asp Glu Leu Glu Ser<sub>460</sub> Leu Val Ser Pro  
 Pro<sub>465</sub> Pro Asn Gln Thr Lys<sub>470</sub> Thr Asn Ala Arg Lys<sub>475</sub> Ala Pro Arg Lys<sub>480</sub>  
 Thr Ala Glu Lys Ser<sub>485</sub>

&lt;210&gt; 48

5 &lt;211&gt; 1470

<212> ADN  
<213> *Marinobacter* sp.

<400> 48

|   |            |             |            |             |             |            |      |
|---|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
|   | atgaaacgcc | tggcaacatt  | ggacgcgtct | tggctagcgg  | tcgagtctga  | cgatacaccc | 60   |
| 5 | atgcacgtgg | gcaacttgca  | gattttcagc | ctgcccgcaca | acgccccatc  | tacattcgcg | 120  |
|   | ggcgacttgg | tcaaaagcat  | gaagcaagcc | ggtaatgttg  | agcttccctg  | gggctgcaag | 180  |
|   | ctggtatggc | caggctttct  | gggccgcgtt | ctggcgccca  | cctggaagca  | cgacaagcat | 240  |
|   | attgatctgg | attatcacgt  | gcgccactcg | gccctaccaa  | aaccgggtgg  | tgaacgcgaa | 300  |
|   | ctgggggaac | tggatatcgcg | cctgcactcc | aaccgcgtgg  | atctgtcgcg  | gccgctgtgg | 360  |
|   | gagtgccaca | tgatcgaagg  | gctggaacac | aaccgttttg  | ccctgtacac  | gaagatgcat | 420  |
|   | cactgcatga | ttgatggcat  | cagtgggtga | cgctgatgc   | aaaggggtgct | gagcaaatcc | 480  |
|   | cccgcagagc | gcgacatgct  | gccaccctgg | tcagtacgcc  | cggaaagcac  | gcgcggcaaa | 540  |
|   | aagaccgaca | gcgaggccag  | cgtgccgggt | gctatatccc  | aagctatgga  | agctctcaaa | 600  |
|   | ctgcagttgg | gcttggcacc  | acggctgtgg | caagccagca  | atcgccctgat | tcactcggtg | 660  |
|   | cgccatccgg | aagacgggtct | gaccgcgccc | ttcaccggcc  | cggtttccaa  | gatcaatcat | 720  |
|   | cgggttactg | gccagcgccg  | cttcgccacc | cagcagtatc  | agttagaaga  | tatgaaagcc | 780  |
|   | atggcccgcg | cctcgggcag  | ctcgatgaac | gacattgtgc  | tgtattttgtg | cggtactgcg | 840  |
|   | ttgcggcggt | ttctgctgga  | acaggacgat | ttgcctgaaa  | tatcattaac  | agcaggcata | 900  |
|   | ccggtcaaca | ttcgcccggc  | ggatgacgaa | ggcacaggaa  | cccagatcag  | cttcatgatt | 960  |
|   | gccgccttgg | ccaccaacca  | acctgatccg | ctaacgcgcc  | tgaaatgcat  | caaggaatct | 1020 |
|   | tcgtgcaaag | ccaaagagca  | cttgcaaaaa | ttgcccaaga  | aagcgttgac  | ccaatacacc | 1080 |
|   | atgatgctga | tgtcgcccta  | catattgcag | ctgatgtctg  | gcttgggagg  | gcgcatgcga | 1140 |
|   | ccggtattta | acgtaaccat  | ctccaacgtt | ccggggccca  | ccgaagatct  | ttattacgaa | 1200 |
|   | ggcgccaaac | tcgaagccat  | gtatccggtg | tcgctgatca  | cccacggcgg  | agcgttgaac | 1260 |
|   | attacttgcc | tgagctatgc  | cggatcattg | aactttgggt  | tcactgggtg  | ccgcgacacc | 1320 |
|   | ttaccagca  | tgcagaagct  | ggccgtgtat | accggggaag  | cattggaaga  | actcagaacc | 1380 |
|   | ctgctgttac | cgccaaagaa  | aaaaccagc  | ccacgcaaac  | ctagaacggc  | cgcgaaaaag | 1440 |
|   | aagcccgcgg | tgaacagcaa  | cgctagctga |             |             |            | 1470 |

<210> 49  
<211> 489  
<212> PRT  
<213> *Marinobacter* sp.

<400> 49

10

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Lys | Arg | Leu | Ala | Thr | Leu | Asp | Ala | Ser | Trp | Leu | Ala | Val | Glu | Ser |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Asp | Asp | Thr | Pro | Met | His | Val | Gly | Asn | Leu | Gln | Ile | Phe | Ser | Leu | Pro |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Asp | Asn | Ala | Pro | Ser | Thr | Phe | Ala | Gly | Asp | Leu | Val | Lys | Ser | Met | Lys |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Gln | Ala | Gly | Asn | Val | Glu | Leu | Pro | Trp | Gly | Cys | Lys | Leu | Val | Trp | Pro |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

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

Ile Lys Glu Ser Ser Cys Lys Ala Lys Glu His Leu Gln Lys Leu Pro  
340 345 350

Lys Lys Ala Leu Thr Gln Tyr Thr Met Met Leu Met Ser Pro Tyr Ile  
355 360 365

Leu Gln Leu Met Ser Gly Leu Gly Gly Arg Met Arg Pro Val Phe Asn  
370 375 380

Val Thr Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Thr Glu Asp Leu Tyr Tyr Glu  
385 390 395 400

Gly Ala Lys Leu Glu Ala Met Tyr Pro Val Ser Leu Ile Thr His Gly  
405 410 415

Gly Ala Leu Asn Ile Thr Cys Leu Ser Tyr Ala Gly Ser Leu Asn Phe  
420 425 430

Gly Phe Thr Gly Cys Arg Asp Thr Leu Pro Ser Met Gln Lys Leu Ala  
435 440 445

Val Tyr Thr Gly Glu Ala Leu Glu Glu Leu Arg Thr Leu Leu Leu Pro  
450 455 460

Pro Lys Lys Lys Pro Ser Pro Arg Lys Pro Arg Thr Ala Ala Lys Lys  
465 470 475 480

Lys Pro Ala Val Asn Ser Asn Ala Ser  
485

<210> 50

<211> 549

<212> ADN

<213> *Photobacterium profundum*

<400> 50

|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| atgggtaaca cattactggt tgttggtgat agcttgagcg cgggctatca aatgcgtgca   | 60  |
| gaacaaagct ggccggtggt actgcaaccc gcattaaagc aacaagggtca cgaaatcacc  | 120 |
| gttgtaaata ccagtatttc aggtgataca acaggaaacg gcttggtctg cttgcctaca   | 180 |
| ttactacaac aacataaacc agcttacgtc atcatagaac tcggggcgaa tgatggctta   | 240 |
| cgtgggtttcc ctcaagggtac ttttcgtaac aatctcagcc aaatgatcac tgaaattcaa | 300 |
| aatgctgatg ccaagccaat gctcgtgcag atcaaagtgc cgcccaatta cggcaaacgc   | 360 |
| tacagtgata tgttcagttc tttttaccct caactcagta aagagttagc cacaccattg   | 420 |
| ttacctttct ttttagagca gatcatttta aaacaagaat ggatgatgaa tgacgggtta   | 480 |
| catcctaaat ctgatgctca gccgtggatt gccgaatata tggctgagaa tatcgcgcct   | 540 |
| tatttataa                                                           | 549 |

<210> 51

<211> 182

5 <212> PRT

<213> *Photobacterium profundum*

<400> 51

Met Gly Asn Thr Leu Leu Val Val Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr  
1 5 10 15  
Gln Met Arg Ala Glu Gln Ser Trp Pro Val Leu Leu Gln Pro Ala Leu  
20 25 30  
Lys Gln Gln Gly His Glu Ile Thr Val Val Asn Ala Ser Ile Ser Gly  
35 40 45  
Asp Thr Thr Gly Asn Gly Leu Ala Arg Leu Pro Thr Leu Leu Gln Gln  
50 55 60  
His Lys Pro Ala Tyr Val Ile Ile Glu Leu Gly Ala Asn Asp Gly Leu  
65 70 75 80  
Arg Gly Phe Pro Gln Gly Thr Ile Arg Asn Asn Leu Ser Gln Met Ile  
85 90 95  
Thr Glu Ile Gln Asn Ala Asp Ala Lys Pro Met Leu Val Gln Ile Lys  
100 105 110  
Val Pro Pro Asn Tyr Gly Lys Arg Tyr Ser Asp Met Phe Ser Ser Ile  
115 120 125  
Tyr Pro Gln Leu Ser Lys Glu Leu Ala Thr Pro Leu Leu Pro Phe Phe  
130 135 140  
Leu Glu Gln Ile Ile Leu Lys Gln Glu Trp Met Met Asn Asp Gly Leu  
145 150 155 160  
His Pro Lys Ser Asp Ala Gln Pro Trp Ile Ala Glu Tyr Met Ala Glu  
165 170 175  
Asn Ile Ala Pro Tyr Leu  
180

<210> 52  
<211> 549  
<212> ADN  
<213> *Photobacterium profundum*

<400> 52  
atgggtaaca cattactggt tgttggtgat agcttgagcg cgggctatca aatgcgtgca 60  
gaacaaagct ggccggtgtt actgcaaccc gcattaaagc aacaagggtca cgaaatcacc 120  
gttgtaaattg ccagtattgt cggtgacaca acaggaaacg gcttggtctg cttgcctacg 180  
ttactacaac aacataaacc agcttacgtc atcatagaac tcggggcgaa tgatggcctg 240

# ES 2 647 412 T3

|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| cgtaggtttcc cgcaagggtac tattcgtaac aatctgagcc aaatgatcac tgaaattcaa | 300 |
| aatgctgatg ccaagccaat gctcgtgcaa atcaaagtgc cgcccaatca cggcaaacgc   | 360 |
| tacagtgata tgttcagttc tttttaccct caactcagta aagagtttagc cacaccattg  | 420 |
| ttacctttct ttttagagca gatcatttta aaacaagaat ggatgatgaa tgacgggtta   | 480 |
| catcctaaat ccgatgctca gccgtggatt gccgaatata tggctgagaa ttcgcgcct    | 540 |
| tatttataa                                                           | 549 |

<210> 53

<211> 182

5 <212> PRT

<213> *Photobacterium profundum*

<400> 53

Met Gly Asn Thr Leu Leu Val Val Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr  
1 5 10 15

Gln Met Arg Ala Glu Gln Ser Trp Pro Val Leu Leu Gln Pro Ala Leu  
20 25 30

Lys Gln Gln Gly His Glu Ile Thr Val Val Asn Ala Ser Ile Val Gly  
35 40 45

Asp Thr Thr Gly Asn Gly Leu Ala Arg Leu Pro Thr Leu Leu Gln Gln  
50 55 60

His Lys Pro Ala Tyr Val Ile Ile Glu Leu Gly Ala Asn Asp Gly Leu  
65 70 75 80

Arg Gly Phe Pro Gln Gly Thr Ile Arg Asn Asn Leu Ser Gln Met Ile  
85 90 95

Thr Glu Ile Gln Asn Ala Asp Ala Lys Pro Met Leu Val Gln Ile Lys  
100 105 110

Val Pro Pro Asn His Gly Lys Arg Tyr Ser Asp Met Phe Ser Ser Ile  
115 120 125

Tyr Pro Gln Leu Ser Lys Glu Leu Ala Thr Pro Leu Leu Pro Phe Phe  
130 135 140

Leu Glu Gln Ile Ile Leu Lys Gln Glu Trp Met Met Asn Asp Gly Leu  
145 150 155 160

His Pro Lys Ser Asp Ala Gln Pro Trp Ile Ala Glu Tyr Met Ala Glu  
165 170 175

Asn Ile Ala Pro Tyr Leu  
180

<210> 54

<211> 549

<212> ADN

<213> *Photobacterium profundum*

<400> 54

atgggtaaca cattactggt tgttggtgat agcttgagcg cgggctatca aatgcgtgca 60  
 gaacaaagct ggccggtggt actgcaaccc gcattaaagc aacaaggtca cgaaatcacc 120  
 gttgtaaatg ccagtattgt cggatatgaca acaagaaacg gcttggtctg cttgcctacg 180  
 ttactacaac aacataaacc agcttacgtc atcatagaac tcggggcggt ggatggcctg 240  
 cgtgggtttcc cgcaaggtac tattcgtaac aatctgagcc aaatgatcac tgaaattcaa 300  
 aatgctgatg ccaagccaat gctcgtgcaa atcaaagtgc cgcccaatca cggcaaacgc 360  
 tacagtgata tgttcagttc tttttaccct caactcagta aagagtttagc cacaccattg 420  
 ttacctttct ttttagagca gatcatttta aaacaagaat ggatgatgaa tgacgggtta 480  
 catcctaaat ccgatgctca gccgtggatt gccgaatata tggctgagaa tatcgcgcct 540  
 tatttataa 549

<210> 55  
 <211> 182  
 <212> PRT  
 <213> *Photobacterium profundum*

<400> 55  
 Met Gly Asn Thr Leu Leu Val Val Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr  
 1 5 10 15  
 Gln Met Arg Ala Glu Gln Ser Trp Pro Val Leu Leu Gln Pro Ala Leu  
 20 25 30  
 Lys Gln Gln Gly His Glu Ile Thr Val Val Asn Ala Ser Ile Val Gly  
 35 40 45  
 Met Thr Thr Arg Asn Gly Leu Ala Arg Leu Pro Thr Leu Leu Gln Gln  
 50 55 60  
 His Lys Pro Ala Tyr Val Ile Ile Glu Leu Gly Ala Val Asp Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Arg Gly Phe Pro Gln Gly Thr Ile Arg Asn Asn Leu Ser Gln Met Ile  
 85 90 95  
 Thr Glu Ile Gln Asn Ala Asp Ala Lys Pro Met Leu Val Gln Ile Lys  
 100 105 110  
 Val Pro Pro Asn His Gly Lys Arg Tyr Ser Asp Met Phe Ser Ser Ile  
 115 120 125  
 Tyr Pro Gln Leu Ser Lys Glu Leu Ala Thr Pro Leu Leu Pro Phe Phe  
 130 135 140

Leu Glu Gln Ile Ile Leu Lys Gln Glu Trp Met Met Asn Asp Gly Leu  
145 150 155 160

His Pro Lys Ser Asp Ala Gln Pro Trp Ile Ala Glu Tyr Met Ala Glu  
165 170 175

Asn Ile Ala Pro Tyr Leu  
180

<210> 56  
<211> 549  
<212> ADN  
<213> *Photobacterium profundum*

<400> 56  
atgggcaaca cccttctcgt cgtcggcgat tcaactctccg caggctacca aatgcgtgca 60  
gaacaaagct ggccggtatt gctgcaacct gccctgaaac agcaggggtca tgagatcact 120  
gtggttaatg caagcattgt gggatatgacc acgcgtaacg gtttggctcg tctgccaacc 180  
ctgttacaac aacacaagcc ggcgtatggt atcatcgaat tgggtgcggt cgatggcttg 240  
cgcggttttc cgcaaggcac gattcgtaat aacctgagcc agatgattac cgagattcag 300  
aacgctgacg cgaagccgat gctggttcag atcaaagtgc cgccgaacca cggtaaaccgc 360  
tacagcgaca tgttcagcag catttaccg cagctgtcta aggaactggc gacgccactg 420  
ctgccgttct ttctggagca gattatcctg aagcaagaat ggatgatgaa tgacgggtctg 480  
catccgaaaa gcgatgcgca gccgtggatc gcagagtata tggccgagaa tatcgcgccg 540  
tatttgtaa 549

<210> 57  
<211> 549  
<212> ADN  
<213> *Photobacterium profundum*

<400> 57  
atgggtaaca cattactggt tgttggtgat agcttgagcg cgggctatca aatgcgtgca 60  
gaacaaagct ggccggtggt actgcaaccc gcattaaagc aacaagggtca cgaaatcacc 120  
gttgtaaagt ccagtattgt cggatatgctg acaagaaacg gcttggctcg cttgcctacg 180  
ttactacaac aacataaacc agcttacgtc atcatagaac tcggggcggt ggatggcctg 240  
cgtgggtttcc cgcaagggtac tattcgtaac aatctgagcc aaatgatcac tgaaattcaa 300  
aatgctgatg ccaagccaat gctcgtgcaa atcaaagtgc cgccaatca cggcaaaccgc 360  
tacagtgata tgttcagttc tatttaccct caactcagta aagagttagc cacaccattg 420  
ttacctttct ttttagagca gatctattta aaacaagaat ggatgatgaa tgacgggttta 480  
catcctaaat ccgatgctca gccgtggatt gccgaatata tggctgagaa tatcgcgcct 540  
tatttataa 549

<210> 58  
<211> 182

<212> PRT

<213> *Photobacterium profundum*

<400> 58

```

Met Gly Asn Thr Leu Leu Val Val Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr
1      5      10      15

Gln Met Arg Ala Glu Gln Ser Trp Pro Val Leu Leu Gln Pro Ala Leu
      20      25      30

Lys Gln Gln Gly His Glu Ile Thr Val Val Asn Ala Ser Ile Val Gly
      35      40      45

Met Leu Thr Arg Asn Gly Leu Ala Arg Leu Pro Thr Leu Leu Gln Gln
      50      55      60

His Lys Pro Ala Tyr Val Ile Ile Glu Leu Gly Ala Val Asp Gly Leu
65      70      75      80

Arg Gly Phe Pro Gln Gly Thr Ile Arg Asn Asn Leu Ser Gln Met Ile
      85      90      95

Thr Glu Ile Gln Asn Ala Asp Ala Lys Pro Met Leu Val Gln Ile Lys
      100      105      110

Val Pro Pro Asn His Gly Lys Arg Tyr Ser Asp Met Phe Ser Ser Ile
      115      120      125

Tyr Pro Gln Leu Ser Lys Glu Leu Ala Thr Pro Leu Leu Pro Phe Phe
      130      135      140

Leu Glu Gln Ile Tyr Leu Lys Gln Glu Trp Met Met Asn Asp Gly Leu
145      150      155      160

His Pro Lys Ser Asp Ala Gln Pro Trp Ile Ala Glu Tyr Met Ala Glu
      165      170      175

Asn Ile Ala Pro Tyr Leu
      180

```

5

<210> 59

<211> 549

<212> ADN

10 <213> *Photobacterium profundum*

<400> 59

|             |             |            |            |             |            |     |
|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|-----|
| atgggcaaca  | cccttctcgt  | cgtcggcgat | tcactctccg | caggctacca  | aatgcgtgca | 60  |
| gaacaaagct  | ggccgggtatt | gctgcaacct | gccctgaaac | agcaggggtca | tgagatcact | 120 |
| gtgggttaatg | caagcattgt  | gggtatgctg | acgcgtaacg | gtttggctcg  | tctgccaacc | 180 |
| ctgttacaac  | aacacaagcc  | ggcgtatggt | atcatcgaat | tgggtgcggt  | cgatggcttg | 240 |
| cgcggttttc  | cgcaaggcac  | gattcgtaat | aacctgagcc | agatgattac  | cgagattcag | 300 |
| aacgctgacg  | cgaagccgat  | gctggttcag | atcaaagtgc | cgccgaacca  | cggtaaacgc | 360 |
| tacagcgaca  | tgttcagcag  | catttaccgc | cagctgtcta | aggaactggc  | gacgccactg | 420 |
| ctgccgttct  | ttctggagca  | gatttatctg | aagcaagaat | ggatgatgaa  | tgacggctcg | 480 |
| catccgaaaa  | gcgatgcgca  | gccgtggatc | gcagagtata | tggccgagaa  | tatcgcgccg | 540 |
| tatttgtaa   |             |            |            |             |            | 549 |

5 <210> 60  
 <211> 549  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

|             |                                                              |
|-------------|--------------------------------------------------------------|
| <400> 60    |                                                              |
| atgggcaaca  | cccttctcgt cgtcggcgat tcactctccg caggctacca aatgcgtgca 60    |
| gaacaaagct  | ggccgggtatt gctgcaacct gccctgaaac agcaggggtca tgagatcact 120 |
| gtgggttaatg | caagcattgt gggtatgctg acgcgtaacg gtttggctcg tctgccaacc 180   |
| ctgttacaac  | aacacaagcc ggcgtatggt atcatcgaat tgggtgcggt cgatggcttg 240   |
| cgcggttttc  | cgcaaggcac gattcgtaat aacctgagcc agatgattac cgagattcag 300   |
| aacgctgacg  | cgaagccgat gctggttcag atcaaagtgc cgccgtttca cggtaaacgc 360   |
| tacagcgaca  | tgttcagcag catttaccgc cagctgtcta aggaactggc gacgccactg 420   |
| ctgccgttct  | ttctggagca gatttatctg aagcaagaat ggatgatgaa tgacggctcg 480   |
| catccgaaaa  | gcgatgcgca gccgtggatc gcagagtata tggccgagaa tatcgcgccg 540   |
| tatttgtaa   | 549                                                          |

15 <210> 61  
 <211> 182  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

25 <400> 61

Met Gly Asn Thr Leu Leu Val Val Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr  
 1 5 10 15  
 Gln Met Arg Ala Glu Gln Ser Trp Pro Val Leu Leu Gln Pro Ala Leu  
 20 25 30  
 Lys Gln Gln Gly His Glu Ile Thr Val Val Asn Ala Ser Ile Val Gly  
 35 40 45  
 Met Leu Thr Arg Asn Gly Leu Ala Arg Leu Pro Thr Leu Leu Gln Gln  
 50 55 60  
 His Lys Pro Ala Tyr Val Ile Ile Glu Leu Gly Ala Val Asp Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Arg Gly Phe Pro Gln Gly Thr Ile Arg Asn Asn Leu Ser Gln Met Ile  
 85 90 95  
 Thr Glu Ile Gln Asn Ala Asp Ala Lys Pro Met Leu Val Gln Ile Lys  
 100 105 110  
 Val Pro Pro Phe His Gly Lys Arg Tyr Ser Asp Met Phe Ser Ser Ile  
 115 120 125  
 Tyr Pro Gln Leu Ser Lys Glu Leu Ala Thr Pro Leu Leu Pro Phe Phe  
 130 135 140  
 Leu Glu Gln Ile Tyr Leu Lys Gln Glu Trp Met Met Asn Asp Gly Leu  
 145 150 155 160  
 His Pro Lys Ser Asp Ala Gln Pro Trp Ile Ala Glu Tyr Met Ala Glu  
 165 170 175  
 Asn Ile Ala Pro Tyr Leu  
 180

5 <210> 62  
 <211> 549  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 62

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| atgggcaaca cccttctcgt cgtcggcgat tcactctccg caggctacca aatgcgtgca    | 60  |
| gaacaaagct ggccggtatt gctgcaacct gccctgaaac gccggggtca tgagatcact    | 120 |
| gtggttaatg caagcattgt gggatatgctg acgcgtcggg gtttggctcg tctgccaacc   | 180 |
| ctgtttacaac aacacaagcc ggcgtatggt atcatcgaat tgggtgcggt cgatggcttg   | 240 |
| cgcggttttc cgcaaggcac gattcgtaat aacctgagcc agatgattac cgagattcag    | 300 |
| aacgctgacg cgaagccgat gctgggttcag atcaaaactcc cgccgtggca cggtaaaccgc | 360 |
| tacagcgaca tgttcagcag catttaccgc cagctgtcta aggaactggc gacgccactg    | 420 |
| ctgccgtttc ttctggagca gatttatctg aagcaagaat ggatgatgaa tgacgggtctg   | 480 |
| catccgaaaa gcgatgcgca gccgtggatc gcagagtata tggccgagaa tatcgcgccg    | 540 |
| tatttgtaa                                                            | 549 |

5 <210> 63  
 <211>182  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 63

Met Gly Asn Thr Leu Leu val val Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr  
 1 5 10 15  
 Gln Met Arg Ala Glu Gln Ser Trp Pro Val Leu Leu Gln Pro Ala Leu  
 20 25 30  
 Lys Arg Arg Gly His Glu Ile Thr Val Val Asn Ala Ser Ile val Gly  
 35 40 45  
 Met Leu Thr Arg Arg Gly Leu Ala Arg Leu Pro Thr Leu Leu Gln Gln  
 50 55 60  
 His Lys Pro Ala Tyr Val Ile Ile Glu Leu Gly Ala Val Asp Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Arg Gly Phe Pro Gln Gly Thr Ile Arg Asn Asn Leu Ser Gln Met Ile  
 85 90 95  
 Thr Glu Ile Gln Asn Ala Asp Ala Lys Pro Met Leu Val Gln Ile Lys  
 100 105 110  
 Leu Pro Pro Trp His Gly Lys Arg Tyr Ser Asp Met Phe Ser Ser Ile  
 115 120 125  
 Tyr Pro Gln Leu Ser Lys Glu Leu Ala Thr Pro Leu Leu Pro Phe Phe  
 130 135 140  
 Leu Glu Gln Ile Tyr Leu Lys Gln Glu Trp Met Met Asn Asp Gly Leu  
 145 150 155 160  
 His Pro Lys Ser Asp Ala Gln Pro Trp Ile Ala Glu Tyr Met Ala Glu  
 165 170 175  
 Asn Ile Ala Pro Tyr Leu  
 180

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 549

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; fuente

10 &lt;223&gt; /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

&lt;400&gt; 64

|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| atgggcaaca cccttctcgt cgtcggcgat tcactctccg caggctacca aatgcgtgca   | 60  |
| gaacaaagct ggccgggtatt gctgcaacct gccctgaaac gccaggggtca tgagatcact | 120 |
| gtgggttaatg caagcattgt gggatatgctg acgcgtaagg gtttggctcg tctgccaacc | 180 |
| ctgtttacaac aacacaagcc ggcgtatggt atcatcgaat tgggtgcggt cgatggcttg  | 240 |
| cgcgggttttc cgcaaggcac gattcgtaat aacctgagcc agatgattac cgagattcag  | 300 |
| aacgctgacg cgaagccgat gctgggttcag atcaaactcc cgccgtggca cggtaaacgc  | 360 |
| tacagcgaca tgttcagcag cttttaccg cagctgtcta aggaactggc gacgccactg    | 420 |
| ctgccgtttct ttctggagca gatttatatg aagcaagaat ggatgatgaa tgacgggtctg | 480 |
| catccgaaaa gcgatgcgca gccgtggatc gcagagtata tggccgagaa tatcgcgccg   | 540 |
| tattttgtaa                                                          | 549 |

<210> 65

<211> 182

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 65

Met Gly Asn Thr Leu Leu Val Val Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr  
 1 5 10 15  
 Gln Met Arg Ala Glu Gln Ser Trp Pro Val Leu Leu Gln Pro Ala Leu  
 20 25 30  
 Lys Arg Gln Gly His Glu Ile Thr Val Val Asn Ala Ser Ile Val Gly  
 35 40 45  
 Met Leu Thr Arg Lys Gly Leu Ala Arg Leu Pro Thr Leu Leu Gln Gln  
 50 55 60  
 His Lys Pro Ala Tyr Val Ile Ile Glu Leu Gly Ala Val Asp Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Arg Gly Phe Pro Gln Gly Thr Ile Arg Asn Asn Leu Ser Gln Met Ile  
 85 90 95  
 Thr Glu Ile Gln Asn Ala Asp Ala Lys Pro Met Leu Val Gln Ile Lys  
 100 105 110  
 Leu Pro Pro Trp His Gly Lys Arg Tyr Ser Asp Met Phe Ser Ser Ile  
 115 120 125  
 Tyr Pro Gln Leu Ser Lys Glu Leu Ala Thr Pro Leu Leu Pro Phe Phe  
 130 135 140  
 Leu Glu Gln Ile Tyr Met Lys Gln Glu Trp Met Met Asn Asp Gly Leu  
 145 150 155 160  
 His Pro Lys Ser Asp Ala Gln Pro Trp Ile Ala Glu Tyr Met Ala Glu  
 165 170 175  
 Asn Ile Ala Pro Tyr Leu  
 180

- 5 <210> 66  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 10 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"  
  
 15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (3) .. (3)  
 <223> /reemplazar="Gly"

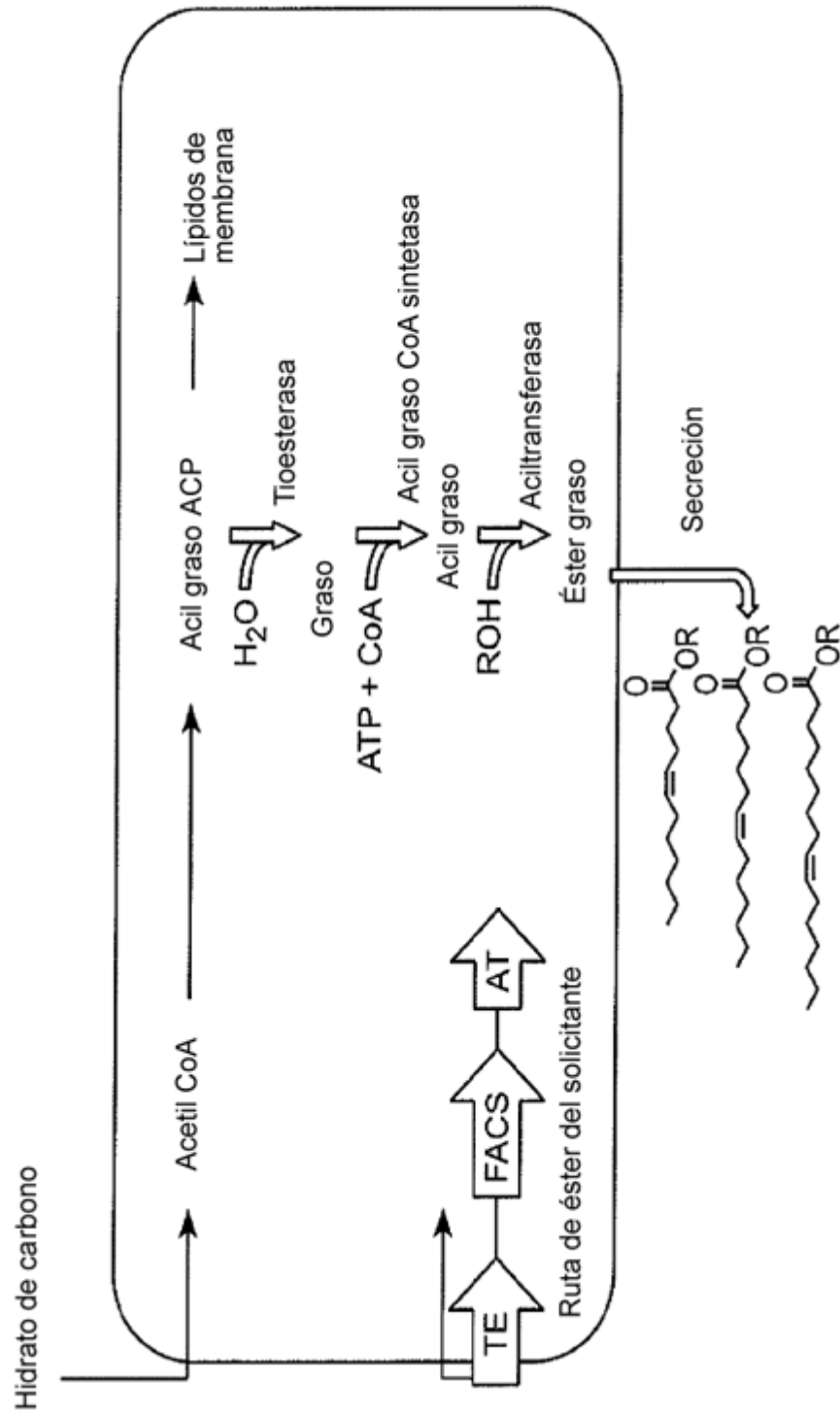
<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> /reemplazar="Ile" o "Leu"  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3) .. (4)  
 <223> /nota="Los residuos facilitados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las  
 10 anotaciones para tales posiciones"  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (7) .. (7)  
 15 <223> /reemplazar="Gly"  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7) .. (7)  
 20 <223> /nota="Los residuos facilitados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las  
 anotaciones para tales posiciones"  
 <400> 66  
 Leu Gly Ala Val Asp Ala Ala Leu Arg Gly  
 1 5 10  
 25

## REIVINDICACIONES

1. Polipéptido variante de éster sintasa que comprende SEQ ID NO: 2, en el que dicho polipéptido variante de éster sintasa está modificado por ingeniería genética para que tenga a) una mutación en la posición de aminoácido 15 de SEQ ID NO: 2, o b) la mutación S15G de SEQ ID NO: 2, o c) la mutación S15G y las mutaciones T5P, P111S, V171R, P188R, F317W, S353T, V409L y S442G de SEQ ID NO: 2, o d) la mutación S15G y las mutaciones T5P, K78F, P111S, V171R, P188R, S192V, A243R, F317W, K349H, S353T, V409L y S442G de SEQ ID NO: 2, o e) la mutación S15G y las mutaciones T5P, V76L, P111S, V171R, P188R, K258R, S316G, F317W, S353T, M360R, Y409L y S442G de SEQ ID NO: 2, o f) la mutación S15G y las mutaciones T5P, P111S, V171R, P188R, Q244G, S267G, G310V, F317W, A320C, S353T, Y366W, V409L y S442G de SEQ ID NO: 2, o g) la mutación S15G y las mutaciones P111S, V155G, P166S, V171R, P188R, F317W, Q348A, S353T, V381F, V409L y S442G de SEQ ID NO: 2, o h) la mutación S15G y las mutaciones L39S, D77A, P111S, V171R, P188R, T313S, F317W, Q348A, S353T, V381F, V409L, I420V y S442G de SEQ ID NO: 2, o i) la mutación S15G y las mutaciones T5P, T24W, T44F, P111S, I146L, V171R, P188R, D307N, F317W, S353T, V409L y S442G de SEQ ID NO: 2, o j) la mutación S15G y las mutaciones T5P, K78F, P111S, V171R, P188R, S192V, R207A, A243R, D255E, L257I, N259Q, L260V, H262Q, G265N, A285V, N288D, N289G, F317W, Q348R, S353T, V381F, V409L y S442G de SEQ ID NO: 2, o k) la mutación S15G y las mutaciones T5P, K78F, P111S, V171R, P188R, S192V, R207A, A243R, D255E, L257I, N259Q, L260V, H262Q, G265N, A285V, N288D, N289G, F317W, H349K, S353T, V381F, V409L y S442G de SEQ ID NO: 2, o l) la mutación S15G y las mutaciones T5P, G33D, T44K, Y58L, P111S, R162E, V171R, P188R, R207A, V234C, Q244G, D255E, S267G, D307N, G310V, F317W, A320C, S353T, Y366W, G394E, V409L y S442G de SEQ ID NO: 2, o m) la mutación S15G y las mutaciones T5P, G33D, T44K, Y58C, P111S, V171R, P188R, R207A, V234C, Q244G, L257I, S267G, D307N, G310V, F317W, A320C, S353T, Y366W, G394E, V409L, A413T, I461V y S442G de SEQ ID NO: 2, o n) la mutación S15G y las mutaciones T5P, T44A, P111S, T157S, N164D, T170S, V171R, P188R, R207A, V216I, V234C, Q244G, L257I, S267G, D307N, G310V, F317W, A320C, Q334K, S353T, Y366W, G394E, V409L, S442G e I461V de SEQ ID NO: 2, u o) la mutación S15G y las mutaciones T5P, Y58L, P111S, R162E, T170S, V171R, A179S, P188R, R207A, V234C, Q244G, L257I, S267G, D307N, G310V, F317W, A320C, S353K, Y366W, G394E, V409L, S442G e I461V de SEQ ID NO: 2, en el que dicho polipéptido variante de éster sintasa tiene actividad de éster metílico de ácidos grasos mejorada en comparación con un polipéptido silvestre correspondiente.
2. Polipéptido variante de éster sintasa según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido es un polipéptido de éster sintasa de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (WS377).
3. Polipéptido variante de éster sintasa según la reivindicación 1, en el que la expresión del polipéptido variante de éster sintasa en una célula huésped recombinante da como resultado un título superior de composiciones de ésteres grasos en comparación con una célula huésped que expresa el polipéptido silvestre correspondiente.
4. Célula huésped recombinante modificada por ingeniería genética para expresar un polipéptido de éster sintasa variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Cultivo celular que comprende la célula huésped recombinante según la reivindicación 4 y una composición de ésteres grasos.
6. Cultivo celular según la reivindicación 5, en el que la composición de ésteres grasos comprende uno o más de un éster graso C6, C8, C10, C12, C13, C14, C15, C16, C17 o C18.
7. Cultivo celular según la reivindicación 5, en el que la composición de ésteres grasos comprende un éster graso que tiene un doble enlace en la posición 7 en la cadena de carbono entre C7 y C8 a partir del extremo reducido del éster graso.
8. Cultivo celular según la reivindicación 5, en el que la composición de ésteres grasos comprende ésteres grasos de cadena ramificada.
9. Célula huésped recombinante que comprende:
  - (a) un polinucleótido que codifica para un polipéptido variante con actividad éster sintasa aumentada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3
  - (b) un ácido graso activado; y
  - (c) un alcohol,
 en la que dicha célula huésped recombinante produce una composición de ésteres grasos en condiciones eficaces para expresar una actividad éster sintasa del polipéptido variante.

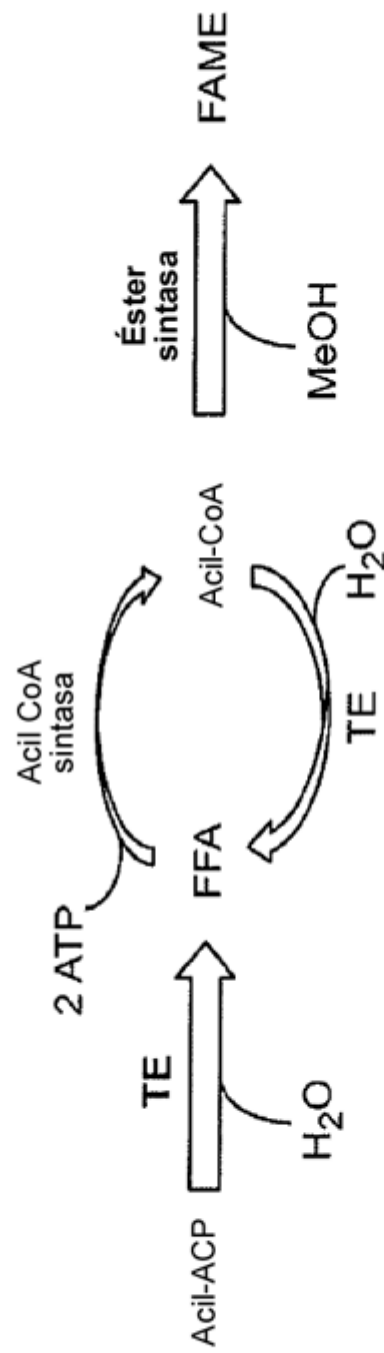
10. Célula huésped recombinante según la reivindicación 9, en la que dicho ácido graso activado es un acil-ACP o un acil-CoA.
11. Célula huésped recombinante según la reivindicación 9, que comprende además una fuente de carbono.

FIG. 1



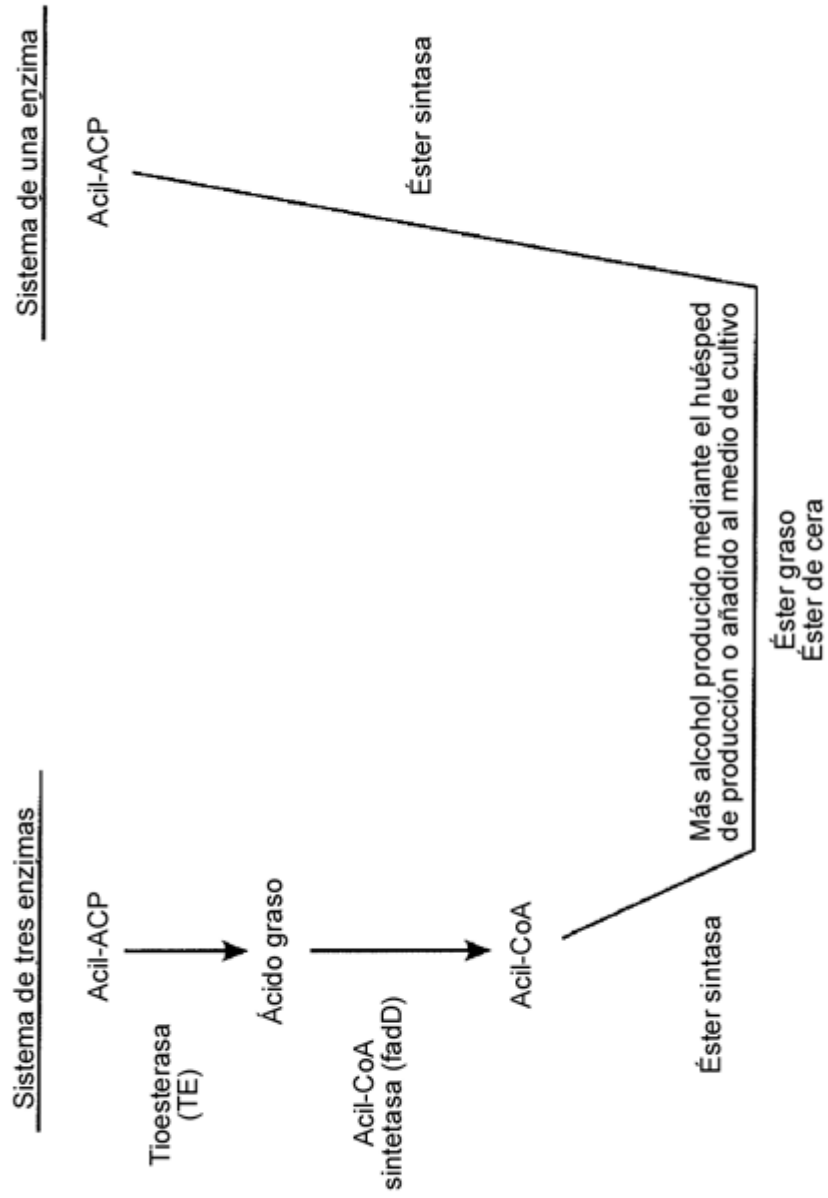
**FIG. 2**

“Ciclo fútil”



| Ciclos                  | % de rendimiento de masa |
|-------------------------|--------------------------|
| 0 (un único gen)        | 37                       |
| 1 (el mejor de 3 genes) | 36.1                     |
| 10                      | 30                       |
| 20                      | 25.6                     |

FIG. 3



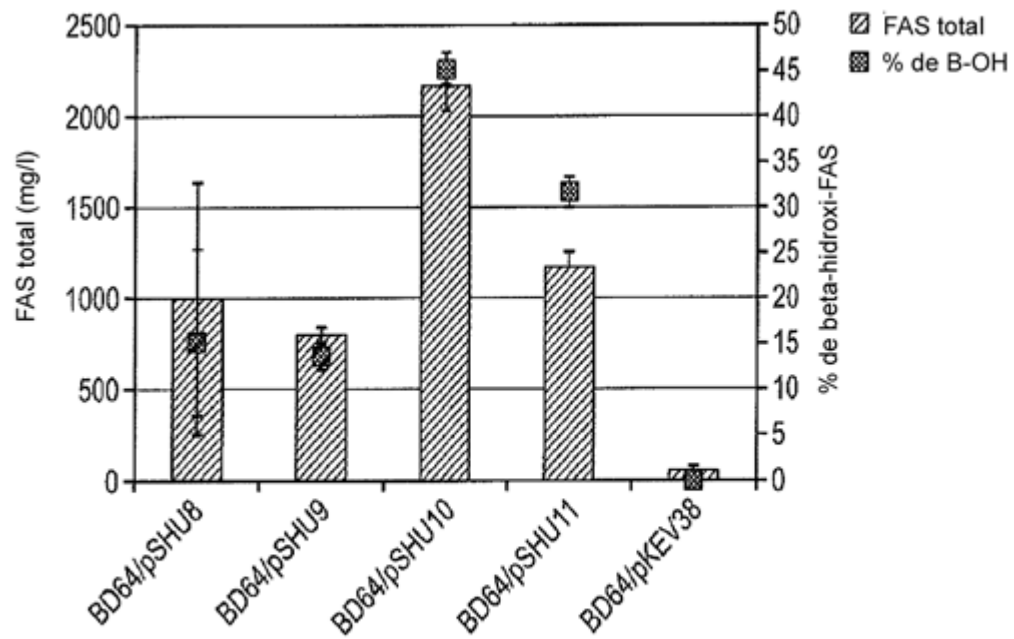


FIG. 4

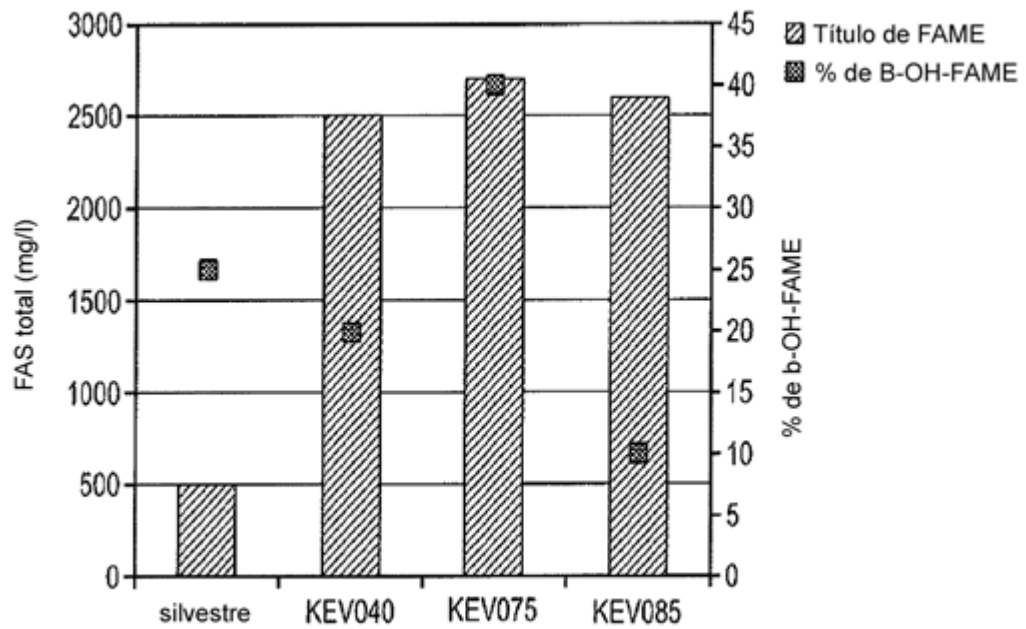


FIG. 5

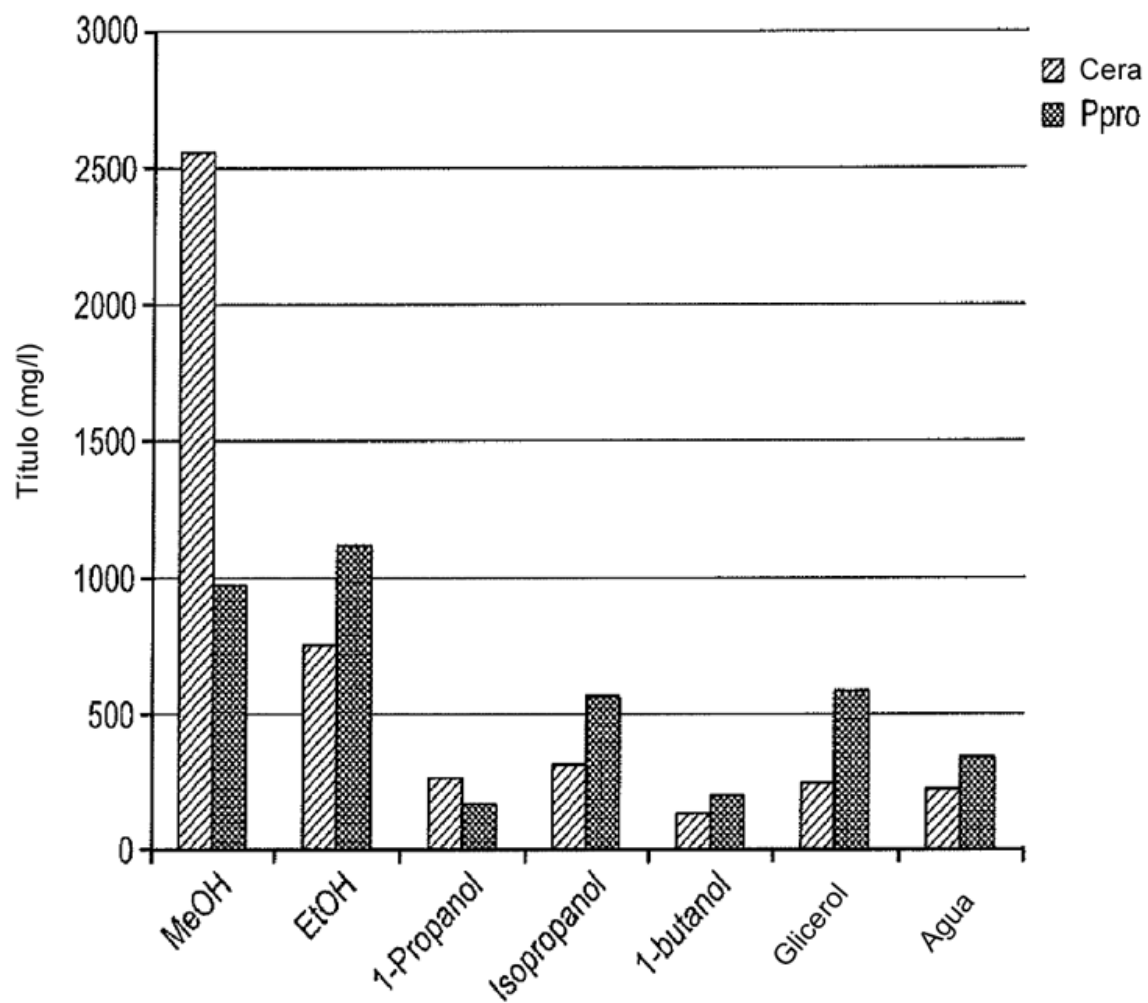


FIG. 6

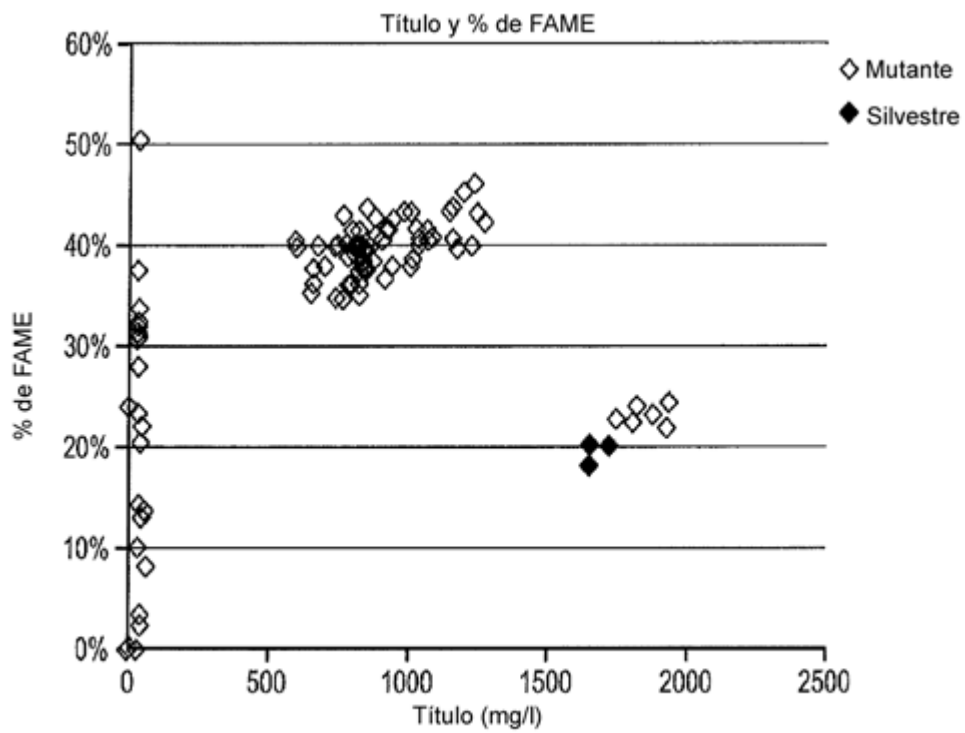


FIG. 7A

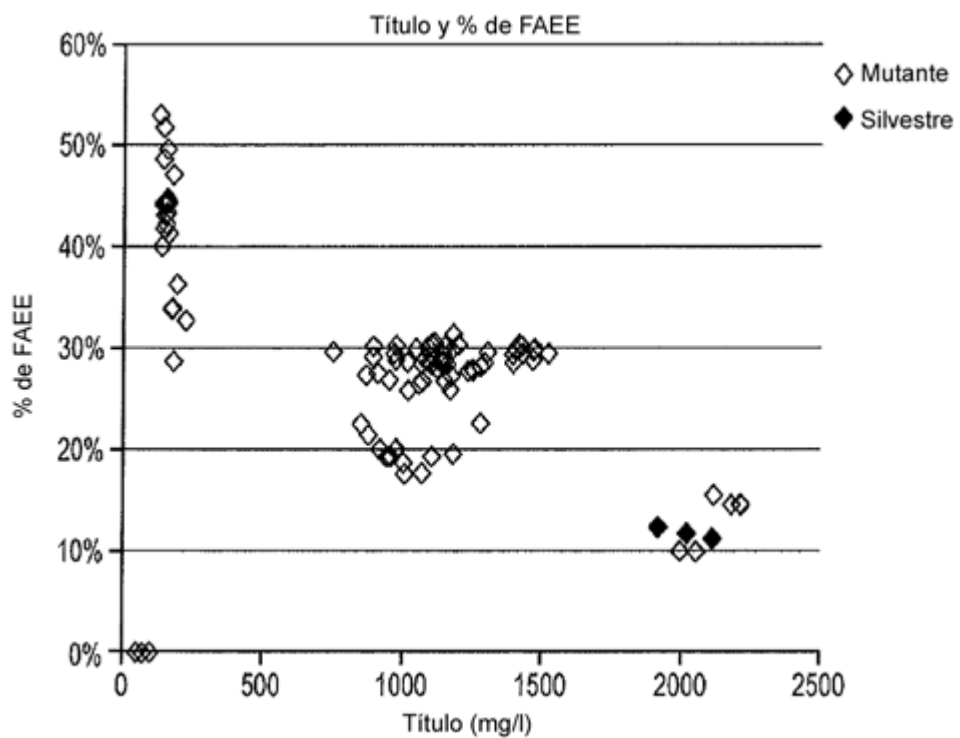


FIG. 7B

FIG. 8

