

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 647**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2012 PCT/US2012/027899**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13048557**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2012 E 12835320 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2753701**

54 Título: **Acil-ACP sintasas de éster de cera**

30 Prioridad:

27.09.2011 US 201161539640 P

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

14.08.2018

73 Titular/es:

**EXXONMOBIL RESEARCH AND ENGINEERING
COMPANY (100.0%)
1545 Route 22 East P.O. Box 900
Annandale, NJ 08801-0900, US**

72 Inventor/es:

**HOLTZAPPLE, ERIK y
VERRUTO, JOHN, H.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 678 647 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

Acil-ACP sintasas de éster de cera

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de patente estadounidense número 61/539.640, presentada el 27 de septiembre de 2011, titulada "Fatty Alcohol Forming Acyl-ACP Reductases", que se incorpora como referencia en su totalidad.

10

Referencia a un listado de secuencias

La presente solicitud contiene referencias a secuencias de aminoácidos y/o secuencias de ácidos nucleicos que se han presentado concurrentemente a la presente memoria en forma de archivo de texto de listado de secuencias.

15

Campo de la invención

La presente invención se refiere a los campos de la bioingeniería, bioquímica del metabolismo y biología molecular. En particular, la invención se refiere a la producción en microorganismos recombinantes de lípidos, tales como ésteres de ceras que pueden utilizarse para producir combustibles y productos químicos.

20

Antecedentes

La demanda global de energía en continuo crecimiento ha conducido al agotamiento de los combustibles fósiles, que son depósitos geológicos enterrados combustibles de materiales orgánicos que se han convertido en petróleo crudo, carbón, gas natural o aceites pesados. Debido a que los combustibles fósiles se han formado mediante la exposición a calor y presión en la corteza terrestre durante cientos de millones de años, son un recurso finito no renovable. Además, el quemado de combustibles fósiles se cree que desempeña un papel clave en el calentamiento global. De acuerdo con lo anterior, existe una necesidad de fuentes de energía de combustibles no fósiles.

25

30

Los hidrocarburos procedentes de fuentes biológicas representan una fuente de energía alternativa sostenible más limpia. Además, muchas industrias, incluyendo los fabricantes de plásticos y la industria química, se basan fuertemente en la disponibilidad de hidrocarburos para los procedimientos de fabricación. Actualmente, los lípidos y ácidos grasos ricos en energía ("el petróleo de la naturaleza") se aíslan a partir de aceites vegetales y animales para producir diversos productos, tales como combustibles y productos oleoquímicos. Los esfuerzos recientemente se han centrado en la producción por microorganismos de ácidos grasos y derivados de ácidos grasos mediante bioprocedimientos de buena relación coste-eficacia. Los métodos para producir ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos en huéspedes microbianos se describen en, p.ej., las publicaciones de patente PCT nº WO 2007/136762, WO 2008/119082, nº WO 2009/009391, nº WO 2009/076559, nº WO 2009/111513, nº WO 2010/006312, WO 2010/044960, nº WO 2010/118410, nº WO 2010/126891, nº WO 2011/008535 y nº WO 2011/019858 y en Schirmer et al., Science 329(5991):559-562, 2010.

35

40

Es conocido que los ácidos grasos libres provocan daños en las membranas celulares y, de esta manera resultan difíciles de producir en cantidades suficientes para la producción a gran escala. La reducción de los ácidos grasos a lípidos más neutros, tales como los ésteres de ceras, podría ayudar a evitar la toxicidad de los ácidos grasos libres. Los ésteres de ceras poseen una densidad energética elevada respecto a productos de biocombustible de cadena más corta, tales como el etanol, y pueden producirse en células en cultivo mediante una serie de procedimientos enzimáticos. Los ésteres de ceras presentan numerosas aplicaciones comerciales en, p.ej., las industrias médica, cosmética y dietética. Por ejemplo, los ésteres de ceras pueden utilizarse como componentes de velas, cosméticos, lubricantes, tintas de impresión, solventes y combustibles.

45

50

Los ésteres de ceras, que presentan una cadena 'A' derivada de un alcohol graso y una cadena 'B' derivada de una molécula de tioéster de acilo, es decir, acil-CoA, se producen mediante una reacción de condensación entre un sustrato de tioéster de acilo graso y un alcohol graso, catalizada por un éster de cera sintasa. Las éster de cera sintasas han sido identificadas en, p.ej., *Acinetobacter* (Ishige et al., Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195, 2002); Kalscheuer y Steinbuechel, J. Biol. Chem. 278:8075-8082, 2003); Kalscheuer et al., Appl. Environ. Microbiol. 72:1373-1379, 2006)), *Marinobacter* (Holtzapfel y Schmidt-Dannert, J. Bacteriol. 189:3804-3812, 2007)), *Arabidopsis* (Li et al., Plant Physiol. 148:97-107, 2008)), petunia (King et al., Planta 226:381-394, 2007)), jojoba (Lardizabal et al., Plant Physiol. 122:645-655, 2000) y especies de mamífero (Cheng and Russell, J. Biol. Chem. 279:37798-37807, 2004); Yen et al., J. Lipid Res. 46:2388-2397, 2005).

55

60

Los ésteres de ácido graso, que son el producto de una reacción de condensación entre una molécula de acil-CoA y un alcohol de cualquier longitud de cadena, también pueden ser producidas por éster de cera sintasas. Por ejemplo, un éster de ácido graso puede ser el producto de condensación de metanol, etanol, propanol, butanol, isobutanol, 2-metilbutanol, 3-metilbutanol o pentanol con una molécula de acil-CoA. En algunos casos, los ésteres de ácido graso, tales como los metil-ésteres de ácido graso ("FAME", por sus siglas en inglés) o etil-ésteres de ácido graso ("FAEE",

65

por sus siglas en inglés) pueden producirse suministrando el alcohol utilizado en la reacción (p.ej. metanol o etanol) al medio de cultivo. De manera similar, los ésteres de cera pueden producirse mediante el suministro de alcoholes grasos (p.ej. hexanol, heptanol, octanol, decanol, dodecanol, tetradecanol, etc.) al medio de cultivo de un microorganismo huésped que expresa una cera sintasa.

En el caso de que los ésteres de cera deban ser producidos por completo por un microorganismo huésped, sin embargo, el microorganismo huésped debe producir un sustrato alcohol graso. Los enzimas que convierten los acil-tioésteres grasos en alcoholes grasos o aldehídos grasos se conocen comúnmente como acilreductasas grasas ("FAR", por sus siglas en inglés). Los FAR han sido identificados en, p.ej., *Euglena* (ver, p.ej., Teerawanichpan et al., *Lipids* 45:263-273, 2010), *Arabidopsis* (ver, p.ej., Rowland et al., *Plant Physiol.* 142:866-877, 2006), Doan et al., *J. Plant Physiol.* 166:787-796, 2009) y Domergue et al., *Plant Physiol.* 153:1539-1554, 2010)), *Artemisia* (ver, p.ej., Maes et al., *New Phytol.* 189:176-189, 2011)), jojoba (ver, p.ej., Metz et al., *Plant Physiol.* 122:635-644, 2000)), polilla (ver, p.ej., Lienard et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:10955-10960, 2010)), abeja (ver, p.ej., Teerawanichpan et al., *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40:641-649, 2010)) y en mamíferos (ver, p.ej., Honscho et al., *J. Biol. Chem.* 285:8537-8542, 2010). Determinadas acil-Co reductasas formadoras de alcohol se cree que generan alcoholes grasos directamente a partir de acil-CoA. La conversión basada en enzimas de acil-CoA en alcohol graso también puede producirse en una reacción en dos etapas con dos enzimas; en la primera etapa, se reduce acil-CoA a aldehído graso mediante una acil-CoA reductasa formadora de aldehído, y en la segunda etapa, el aldehído graso se reduce a un alcohol graso mediante una aldehído graso reductasa.

Típicamente, para producir un éster de ácido graso o éster de cera en un microorganismo resulta necesario para la célula producir diversos enzimas además de una éster de cera sintasa y, en el caso de que la célula produzca por completo un éster cera, resulta necesaria una reductasa formadora de alcohol que genere el sustrato de alcohol graso. Por ejemplo, en un huésped que no produzca endógenamente acil-CoA, puede resultar necesario introducir, p.ej., un gen codificante de una acilo graso tioesterasa para convertir acilo-proteína portadora de acilo (acil-ACP, por sus siglas en inglés) en ácidos grasos libres y un gen codificante de una acil-CoA sintetasa para convertir los ácidos grasos libres en acil-CoA. Por ejemplo, las cianobacterias no producen acil-CoA y los genomas de las especies cianobacterianas secuenciadas hasta el momento no incluyen genes codificantes de acil-ACP tioesterasas, acil-CoA tioesterasas o acil-CoA sintetetasas, ya que los genes cianobacterianas originalmente anotados como codificantes de acil-CoA sintetetasas se ha demostrado que codifican acil-ACP sintetetasas, utilizadas en el reciclado de ácidos grasos (Kaczmarzyk y Fulda, *Plant Physiol.*, 152: 1598-1610, 2010). El gen o genes codificantes de una acilo graso tioesterasa y/o un acil-CoA sintetasa también se añaden a organismos huésped que producen naturalmente acil-CoA, con el fin de garantizar niveles adecuados de acil-CoA para la producción de ésteres de cera. Sin embargo, la introducción de varios componentes de ruta heterólogos puede conducir a dificultades en el equilibrio apropiado de la expresión y actividad enzimáticas para producir el producto final de éster de cera deseado a rendimientos suficientemente elevados para la producción a gran escala. Además, la acumulación de intermediarios, tal como ácidos grasos libres y alcoholes grasos puede resultar tóxica para las células huésped.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, sigue existiendo una necesidad en la técnica de métodos escalables, eficientes y económicos para producir ésteres de ácidos grasos y ésteres de cera.

Descripción resumida de la invención

La presente invención proporciona métodos independientes de acil-CoA para la producción de ésteres de ácidos grasos, tal como, aunque sin limitación, ésteres de cera. La invención se basa en parte en los resultados de los inventores de que una ruta independiente de acil-CoA de sólo dos genes puede producir ésteres de cera en microorganismos que no presentan acil-CoA. El primer gen codifica una acilo graso reductasa que es capaz de utilizar un sustrato no acil-CoA para producir alcoholes grasos, mientras que el segundo gen codifica una éster de cera sintasa capaz de utilizar un sustrato acilo no acil-CoA y un alcohol graso como sustratos para producir ésteres de cera. De esta manera, la introducción de los dos genes en una célula huésped recombinante (p.ej. una célula huésped microbiana) permite la producción independiente de acil-CoA de ésteres de cera.

La ruta de biosíntesis de éster de cera independiente de acil-CoA dada a conocer en la presente memoria puede evitar la generación de intermediarios de ruta de acil-CoA, tales como, por ejemplo, ácidos grasos libres, que pueden resultar tóxicos para la célula huésped, mejorando de esta manera la viabilidad de la célula huésped. Además, debido a que la ruta independiente de acil-CoA no requiere la etapa dependiente de ATP de formación de un sustrato acil-CoA graso a partir de ácido graso libre; dicha ruta puede resultar energéticamente más eficiente que las rutas tradicionales dependientes de acil-CoA.

Una éster de cera sintasa producida por una célula huésped transgénica dada a conocer en la presente memoria puede utilizar un sustrato diferente de acil-CoA como el sustrato acil-tioéster. Por ejemplo, la éster de cera sintasa puede utilizar acil-ACP como sustrato (y, de esta manera, puede denominarse en la presente memoria "acil-ACP sintasa de éster de cera"). La acil-ACP sintasa de éster de cera puede condensar un alcohol de cadena corta (p.ej. un alcohol C1, C2, C3, C4 o C5) o un alcohol graso, p.ej., C6, C7, C8, C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22, C24 o alcohol de cadena más larga con acil-ACP para formar un éster de ácido graso. El alcohol condensado con acil-ACP

puede ser producido por la célula huésped transgénica o suministrarse a la célula huésped transgénica, por ejemplo en el medio de cultivo.

5 Los inventores demuestran en la presente memoria que determinadas sintasas de éster de cera de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* son capaces de actuar como acil-ACP sintasas de éster de cera en los métodos de la presente invención. La expresión de una sintasa de éster de cera de *M. hydrocarbonoclasticus* junto con la expresión de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol Maqu_2220 en la cepa cianobacteriana *Synechocystis* PCC 6803 (que es incapaz de sintetizar naturalmente acil-CoA, alcoholes grasos o ésteres de cera) resulta en la producción de éster de cera independiente de acil-CoA.

10 La invención proporciona una célula huésped recombinante manipulada genéticamente para la producción de uno o más ésteres de ácido graso, en la que la célula huésped recombinante contiene una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una éster de cera sintasa, en la que la éster de cera sintasa es capaz de producir un éster de ácido graso en una ruta independiente de acil-CoA al expresarse en la célula huésped. Por ejemplo, la célula huésped recombinante puede incluir un gen exógeno codificante de una éster de cera sintasa capaz de utilizar acil-ACP como sustrato.

15 La célula huésped recombinante que incluye una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una éster de cera sintasa puede ser una célula huésped recombinante que no incluye un gen exógeno codificante de una acil-CoA sintetasa. Adicional o alternativamente, la célula huésped recombinante manipulada para la producción de ésteres de cera puede ser una célula huésped recombinante que no incluye un gen endógeno codificante de una acil-CoA sintetasa o que presenta una expresión atenuada de un gen endógeno codificante de una acil-CoA sintetasa, o un gen mutado codificante de una acil-CoA sintetasa, de manera que la célula huésped recombinante produce una cantidad reducida de acil-CoA sintetasa o una acil-CoA sintetasa menos activa o inactiva. En cualquiera de las realizaciones anteriores, la célula huésped puede ser una célula huésped recombinante que no produce acil-CoA. Por ejemplo, la célula huésped recombinante puede ser una célula huésped que no incluye un gen exógeno de acil-CoA sintetasa y no presenta un gen endógeno de acil-CoA sintetasa o presenta una expresión atenuada de un gen endógeno de acil-CoA sintetasa, de manera que el enzima no es producido.

20 Adicional o alternativamente a cualquiera de lo anteriormente expuesto, una célula huésped recombinante que incluye una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintetasa de cera puede ser una célula que no incluye un gen exógeno codificante de una acil-ACP tioesterasa o una acil-CoA tioesterasa. Adicionalmente, la célula huésped recombinante puede ser una célula que no expresa, o que presenta una expresión atenuada, de acil-ACP tioesterasa, de acil-CoA tioesterasa o de ambos. Alternativamente, una célula huésped manipulada para la producción de ésteres de ácido graso puede ser una célula huésped que no incluye un gen exógeno codificante de una acil-ACP tioesterasa o un gen exógeno codificante de una acil-CoA tioesterasa y que además no incluye un gen exógeno codificante de una acil-CoA sintetasa. Adicionalmente, una célula huésped manipulada para la producción de ésteres de ácido graso, tal como, aunque sin limitación, ésteres de cera, puede ser una célula huésped que no incluye un gen exógeno codificante de una acil-ACP tioesterasa o un gen exógeno codificante de una acil-CoA sintetasa y presenta una expresión atenuada de un gen endógeno codificante de una acil-CoA sintetasa.

25 Alternativamente, una célula huésped manipulada para la producción de ésteres de ácido graso puede ser una célula huésped que no presenta en absoluto o que presenta una expresión atenuada de una acil-ACP tioesterasa y que no presenta en absoluto o presenta una expresión atenuada de un gen endógeno codificante de una acil-CoA sintetasa, por ejemplo la célula huésped puede no presentar genes endógenos de una acil-ACP tioesterasa, de una acil-CoA tioesterasa, o de ambas, y puede además no presentar un gen endógeno de una acil-CoA sintetasa. La célula huésped puede utilizarse para producir ésteres de ácido graso, incluyendo, aunque sin limitación, ésteres de cera, en la que la célula huésped puede producir uno o más alcoholes para la incorporación en el producto éster de ácido graso.

30 En determinadas realizaciones, un microorganismo transgénico utilizado para la producción de ésteres de cera incluye una éster de cera sintasa que puede utilizar acil-ACP como sustrato e incluye además una acil-CoA reductasa que puede utilizar acil-ACP como sustrato (y, de esta manera, se denomina "acil-ACP sintasa de éster de cera" y "acil-ACP reductasa formadora de alcohol", respectivamente). Por ejemplo, como primera etapa, la acil-ACP reductasa formadora de alcohol puede convertir directamente acil-ACP en un alcohol graso (ver, p.ej., la fig. 10) y, como segunda etapa, la acil-ACP sintasa de éster de cera condensa el alcohol graso producido con acil-ACP para formar un éster de cera (ver, p.ej., la fig. 11).

35 Debido a que las acil-ACP reductasas formadoras de alcohol son capaces de convertir directamente acil-ACP en alcoholes grasos, y las acil-ACP sintasas de éster de cera son capaces de utilizar acil-ACP como sustrato para condensarlo con un alcohol graso producido por la célula huésped, pueden evitarse las dificultades de introducir y equilibrar los diversos niveles de expresión y/o actividades enzimáticas para la producción de los ésteres de cera. Por ejemplo, los microorganismos dados a conocer en la presente memoria para producir ésteres de cera pueden ser microorganismos que no incluyen un gen exógeno de acil-ACP, de acil-CoA tioesterasa o ambos y, adicionalmente, pueden no presentar un gen exógeno de acil-CoA sintetasa. De esta manera, pueden evitarse las

etapas de introducción de dichos genes adicionales (o cepas manipuladas para la regulación positiva de tioesterasas endógenas o acil-CoA sintetetas) Entre las ventajas adicionales se incluyen la facilidad comparativa de mutagenizar o modificar el nivel de expresión de sólo dos genes, en comparación con múltiples genes, para conseguir, p.ej., niveles de producción más altos o diferentes especificidades de longitud de cadena.

Los inventores demuestran en la presente memoria que determinadas acil graso reductasas identificadas como reductasas formadoras de alcohol, tales como las de *Marinobacter aquaeolei* cepa VT8 y de *Hahella chejuensis* cepa KCTC2396, son acilo graso reductasas formadoras de alcohol promiscuas, capaces de reducir uno o más sustratos acil-tioéster además de acil-CoA y son capaces de actuar como acil-ACP reductasas formadoras de alcohol en los métodos de la presente invención. La secuencia de aminoácidos de la reductasa de *M. aquaeolei* ("Maqu_2220"), caracterizada anteriormente como aldehído reductasa (ver, p.ej., Wahlen et al., Appl. Environ. Microbiol. 75:2758-2764, 2009, y la publicación de patente US n° 2010/0203614), se encuentra disponibles bajo el número de acceso de GenBank ABM19299 (SEC ID n° 2). La secuencia de aminoácidos de la reductasa de *H. chejuensis* ("Hch_05075") se encuentra disponible bajo GenBank n° de acceso YP_436183 (SEC ID n° 4).

La célula huésped recombinante manipulada para la producción de ésteres de cera que incluye una secuencia de ácidos nucleicos no nativos que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol y una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una sintasa de éster de cera tal como se da a conocer en la presente memoria que puede utilizar acil-ACP como sustrato puede ser una célula huésped recombinante que no incluye un gen exógeno codificante de una acil-CoA sintetasa. Además, la célula huésped recombinante manipulada para la producción de ésteres de cera puede ser una célula huésped recombinante que no incluye un gen endógeno codificante de una acil-CoA sintetasa o que presenta una expresión atenuada de un gen endógeno codificante de una acil-CoA sintetasa. En cualquiera de las realizaciones anteriores, la célula huésped puede ser una célula huésped recombinante que no produce acil-CoA. Por ejemplo, la célula huésped recombinante puede ser una célula huésped que no incluye un gen exógeno de acil-CoA sintetasa y que no presenta un gen endógeno de acil-CoA sintetasa o que presenta una expresión atenuada de un gen endógeno de acil-CoA sintetasa, de manera que el enzima es producido a un nivel bajo o no es producido. Adicional o alternativamente, la célula huésped recombinante puede incluir un gen endógeno de acil-CoA sintetasa en el que el gen ha sido mutado de manera que se produce un enzima menos activo o inactivo.

Adicional o alternativamente a cualquiera de lo anterior, una célula huésped recombinante que incluye una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de cera y una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP reductasa puede ser una célula que no incluye un gen exógeno codificante de una acil-ACP tioesterasa o un gen exógeno codificante de una acil-CoA tioesterasa. Adicionalmente, la célula huésped recombinante puede ser una célula que no expresa, o que presenta una expresión atenuada, de acil-ACP tioesterasa, de acil-CoA tioesterasa o de ambos. Alternativamente, una célula huésped manipulada para la producción de ésteres de ácido graso puede ser una célula huésped que no incluye un gen exógeno codificante de una acil-ACP tioesterasa o un gen exógeno codificante de una acil-CoA tioesterasa y que además no incluye un gen exógeno codificante de una acil-CoA sintetasa. Adicionalmente, una célula huésped manipulada para la producción de ésteres de cera puede ser una célula huésped que no incluye un gen exógeno codificante de una acil-ACP tioesterasa o un gen exógeno codificante de una acil-CoA sintetasa y que presenta una expresión atenuada de un gen endógeno codificante de una acil-CoA sintetasa o que expresa una acil-CoA sintetasa mutante con actividad reducida.

Alternativamente, una célula huésped manipulada para la producción de ésteres de cera puede ser una célula huésped que no presenta expresión o que presenta una expresión atenuada de un gen endógeno codificante de una acil-ACP tioesterasa y que no presenta o que presenta una expresión atenuada de un gen endógeno codificante de una acil-CoA sintetasa. Por ejemplo, la célula huésped puede no presentar genes endógenos de acil-ACP tioesterasa, de acil-CoA tioesterasa o de ambos y puede no presentar un gen endógeno para una acil-CoA sintetasa. La célula huésped puede utilizarse para producir ésteres de ácido graso o ésteres de cera, en la que la célula huésped puede producir uno o más alcoholes o proporcionarse a la célula huésped para la incorporación en el producto éster de ácido graso.

La sintasa de éster de cera codificada por una secuencia de ácidos nucleicos no nativa en realizaciones particulares puede presentar una identidad de por lo menos 40%, de por lo menos 45%, de por lo menos 50%, de por lo menos 55%, de por lo menos 60%, de por lo menos 65%, de por lo menos 70%, de por lo menos 75%, de por lo menos 80%, de por lo menos 85%, de por lo menos 90%, de por lo menos 95%, de por lo menos 96%, de por lo menos 97%, de por lo menos 98% o de por lo menos 99% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 19 o a SEC ID n° 21 o a un fragmento funcional del polipéptido de SEC ID n° 19 o SEC ID n° 21. Por ejemplo, la sintasa de éster de cera codificada por una secuencia de ácidos nucleicos no nativa puede ser o comprender un polipéptido que presenta una identidad de por lo menos 85% respecto a la SEC ID n° 19 o a un fragmento funcional de la misma, o la sintasa de éster de cera puede ser o comprender un polipéptido que presenta una identidad de por lo menos 90% respecto a la SEC ID n° 19 o a un fragmento funcional de la misma. La sintasa de éster de cera puede ser o comprender, por ejemplo, el polipéptido de SEC ID n° 19 o a un fragmento funcional de la misma. En un ejemplo alternativo, la sintasa de éster de cera codificada por una secuencia de ácidos nucleicos no nativa puede ser o comprender un polipéptido que presenta una identidad de por lo menos 85% respecto al polipéptido de SEC ID n° 21

o a un fragmento funcional de la misma, o la sintasa de éster de cera puede ser o comprender un polipéptido que presenta una identidad de por lo menos 90% respecto al polipéptido de SEC ID nº 21 o a un fragmento funcional del mismo. La sintasa de éster de cera puede ser o comprender, por ejemplo, el polipéptido de SEC ID nº 21 o a un fragmento funcional de la misma.

5 Alternativa o adicionalmente, la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la sintasa de éster de cera puede presentar una identidad de por lo menos 30%, de por lo menos 40%, de por lo menos 45%, de por lo menos 50%, de por lo menos 55%, de por lo menos 60%, de por lo menos 65%, de por lo menos 70%, de por lo menos 75%, de por lo menos 80%, de por lo menos 85%, de por lo menos 90%, de por lo menos 95%, de por lo menos 96%, de por lo menos 97%, de por lo menos 98% o de por lo menos 99% respecto a la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 18 o a una parte de la misma que codifica un fragmento funcional del polipéptido de SEC ID nº 19. Por ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos puede comprender una secuencia de nucleótidos que presenta una identidad de por lo menos 85% o de por lo menos 90% respecto a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 18 o a una parte de la misma que codifica un fragmento funcional del polipéptido de SEC ID nº 19. Por ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos puede ser o comprender la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 18. En todavía otros ejemplos, la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la sintasa de éster de cera puede presentar una identidad de por lo menos 30%, de por lo menos 40%, de por lo menos 45%, de por lo menos 50%, de por lo menos 55%, de por lo menos 60%, de por lo menos 65%, de por lo menos 70%, de por lo menos 75%, de por lo menos 80%, de por lo menos 85%, de por lo menos 90%, de por lo menos 95%, de por lo menos 96%, de por lo menos 97%, de por lo menos 98% o de por lo menos 99% respecto a la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 20 o a una parte de la misma que codifica un fragmento funcional del polipéptido de SEC ID nº 21. Por ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos puede comprender una secuencia de nucleótidos que presenta una identidad de por lo menos 85% o de por lo menos 90% respecto a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 20 o a una parte de la misma que codifica un fragmento funcional del polipéptido de SEC ID nº 21. Por ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos puede ser o comprender la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 20.

Alternativamente a las realizaciones anteriores, la secuencia de ácidos nucleicos no nativa puede codificar un polipéptido con actividad de acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de por lo menos 40%, de por lo menos 45%, de por lo menos 50%, de por lo menos 55%, de por lo menos 60%, de por lo menos 65%, de por lo menos 70%, de por lo menos 75%, de por lo menos 80%, de por lo menos 85%, de por lo menos 90%, de por lo menos 95%, de por lo menos 96%, de por lo menos 97%, de por lo menos 98% o de por lo menos 99% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43 o a una parte de las mismas que codifica un fragmento funcional del polipéptido SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43. Por ejemplo, la molécula de ácidos nucleicos no nativa puede codificar un polipéptido con actividad de acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de por lo menos 85% o de por lo menos 90% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43 o a una parte de las mismas que codifica un fragmento funcional del polipéptido SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43. Por ejemplo, la sintasa de éster de cera puede ser o comprender, por ejemplo, el polipéptido de SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43. La secuencia de ácidos nucleicos codificante de la sintasa de éster de cera en realizaciones particulares puede presentar una identidad de por lo menos 30%, de por lo menos 40%, de por lo menos 45%, de por lo menos 50%, de por lo menos 55%, de por lo menos 60%, de por lo menos 65%, de por lo menos 70%, de por lo menos 75%, de por lo menos 80%, de por lo menos 85%, de por lo menos 90%, de por lo menos 95%, de por lo menos 96%, de por lo menos 97%, de por lo menos 98% o de por lo menos 99% respecto a la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 o 42 o a una parte de las mismas que codifica un fragmento funcional del polipéptido SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43. Por ejemplo, la molécula de ácidos nucleicos no nativa puede codificar un polipéptido con actividad de acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de por lo menos 85% o de por lo menos 90% respecto a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 o 42 o a una parte de las mismas que codifica un fragmento funcional del polipéptido SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43. En algunas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos es o comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 o 42.

La sintasa de éster de cera codificada por la molécula de ácidos nucleicos no nativa puede ser heteróloga respecto a la célula huésped recombinante y, opcionalmente, la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la sintasa de éster de cera puede optimizarse para sus codones para la expresión en la célula huésped. En algunas realizaciones, la célula huésped puede ser una célula huésped fotosintética, tal como, por ejemplo, una célula algal, y la sintasa de éster de cera puede optimizarse para sus codones para la expresión en la célula huésped fotosintética. La sintasa de éster de cera codificada por la secuencia de ácidos nucleicos no nativa en algunas realizaciones puede obtenerse de especies de *Marinobacter*, *Limnobacter*, *Alcanivorax*, *Hahella*, *Oceanobacter*, *gamma*proteobacterium o *Mycobacterium*.

Además, en cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas, la secuencia de ácidos nucleicos codificante de una sintasa de éster de cera puede integrarse en un cromosoma de la célula huésped recombinante, y alternativa o adicionalmente, puede encontrarse presente en un vector en la célula huésped recombinante. La secuencia de ácidos nucleicos codificante de la sintasa de éster de cera en un organismo huésped tal como se da a conocer en la presente memoria puede ligarse operablemente a un promotor y/o intensificador. El promotor en diversas

realizaciones alternativas puede ser heterólogo respecto al gen de sintasa de éster de cera y puede ser heterólogo o homólogo con respecto al organismo huésped, puede ser regulable y/o puede ser inducible.

La célula huésped recombinante, por ejemplo la célula huésped fotosintética indicada en el párrafo [0026] puede incluir, además de la secuencia de ácidos nucleicos no nativa de la acil-ACP sintasa de éster de cera, una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol. La acil-ACP reductasa formadora de alcohol puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos 40%, de por lo menos 45%, de por lo menos 50%, de por lo menos 55%, de por lo menos 60%, de por lo menos 65%, de por lo menos 70%, de por lo menos 75%, de por lo menos 80%, de por lo menos 85%, de por lo menos 90%, de por lo menos 95%, de por lo menos 96%, de por lo menos 97%, de por lo menos 98% o de por lo menos 99% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2, SEC ID nº 4, SEC ID nº 6, SEC ID nº 8 ó SEC ID nº 10 o respecto a un fragmento funcional de cualquiera de dichos polipéptidos. Por ejemplo, una célula huésped recombinante de la invención puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol que es o comprende un polipéptido que presenta una identidad de por lo menos 85% 2. Por ejemplo, una célula huésped recombinante de la invención puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol que es o que comprende el polipéptido de SEC ID nº 2. Alternativamente, una célula huésped recombinante de la invención puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol que es o que comprende un polipéptido que presenta una identidad de por lo menos 85% o de por lo menos 90% respecto a la SEC ID nº 4. Por ejemplo, una célula huésped recombinante de la invención puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol que es o que comprende el polipéptido de SEC ID nº 4. En alternativas adicionales, una célula huésped recombinante de la invención puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol que es o que comprende un polipéptido que presenta una identidad de por lo menos 85% o de por lo menos 90% respecto a la SEC ID nº 6, SEC ID nº 8 ó SEC ID nº 10. Por ejemplo, una célula huésped recombinante de la invención puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol que es o que comprende el polipéptido de SEC ID nº 6, SEC ID nº 8 ó SEC ID nº 10.

La acil-ACP reductasa puede obtenerse de una bacteria marina, tal como, por ejemplo, una especie de *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Oceanobacter*, *Limnobacter*, *gammaproteobacterium* o *Hahella*. La secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol contenida en una célula huésped recombinante tal como se da a conocer en la presente memoria puede ser, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 30%, de por lo menos 40%, de por lo menos 45%, de por lo menos 50%, de por lo menos 55%, de por lo menos 60%, de por lo menos 65%, de por lo menos 70%, de por lo menos 75%, de por lo menos 80%, de por lo menos 85%, de por lo menos 90%, de por lo menos 95%, de por lo menos 96%, de por lo menos 97%, de por lo menos 98% o de por lo menos 99% respecto a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 5, SEC ID nº 7, SEC ID nº 9 ó SEC ID nº 11. Por ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol contenida en una célula huésped recombinante tal como se da a conocer en la presente memoria puede ser, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 85% o de por lo menos 90% respecto a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 1 o SEC ID nº 3. La secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol puede ser, en algunas realizaciones, heteróloga respecto a la célula huésped recombinante y opcionalmente puede optimizarse respecto a sus codones para la expresión en una célula huésped fotosintética. El gen no nativo de acil-ACP reductasa formadora de alcohol puede encontrarse presente en un vector, que opcionalmente puede ser el mismo vector que comprende un gen no nativo de acil-ACP sintasa de cera. Un gen no nativo codificante de una acil-ACP reductasa puede asociarse al mismo promotor operablemente ligado a un gen de acil-ACP sintasa de cera o puede ligarse operablemente a un promotor diferente. Un promotor ligado operablemente a un gen no nativo de acil reductasa, a un gen no nativo de acil-ACP sintasa de cera o ambos, puede ser heterólogo respecto al organismo huésped y puede ser un promotor regulable, y opcionalmente puede ser un promotor inducible. En algunas realizaciones, un gen no nativo de acil-ACP reductasa formador de alcohol y/o un gen no nativo de acil-ACP sintasa de cera puede integrarse en un cromosoma de la célula huésped recombinante o, en realizaciones alternativas, cualquiera de dichos genes nativos o ambos pueden encontrarse presentes en un episoma de replicación autónoma.

En diversas realizaciones de una célula huésped recombinante tal como se proporciona en la presente memoria, tanto la acil-ACP reductasa formadora de alcohol como la acil-ACP sintasa de éster de cera codificadas por secuencias de ácidos nucleicos no nativas se derivan de una especie microbiana, y en algunas realizaciones, la acil-ACP reductasa formadora de alcohol, la acil-ACP sintasa de éster de cera o ambas se obtienen a partir de una especie procariótica. En algunos ejemplos, la acil-ACP reductasa formadora de alcohol y la acil-ACP sintasa de éster de cera pueden obtenerse del mismo género. Por ejemplo, en realizaciones particulares, la acil-ACP reductasa formadora de alcohol y la acil-ACP sintasa de éster de cera en una célula huésped recombinante tal como se proporciona en la presente memoria pueden derivarse ambas de la misma especie o de especies diferentes de *Marinobacter* o ambas pueden obtenerse de la misma especie o especies diferentes de *Hahella*, *Limnobacter*, *Alcanivorax*, *Oceanobacter*, *gammaproteobacterium* o *Mycobacterium*.

En realizaciones todavía adicionales, una célula huésped recombinante de la invención manipulada para la producción de ésteres de cera puede incluir, además de secuencias de ácidos nucleicos no nativas codificantes de una acil-ACP sintasa de éster de cera y una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una reductasa formadora de aldehído graso y/o, en algunas realizaciones, una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una reductasa formadora de aldehído graso. En realizaciones en las que la célula huésped recombinante incluye una reductasa endógena formadora de aldehído graso, la secuencia endógena codificante de reductasa formadora de aldehído graso puede ligarse operablemente a un promotor heterólogo que, en algunas realizaciones, puede ser un promotor regulable, por ejemplo, un promotor inducible. En algunas realizaciones ejemplares, la célula huésped recombinante es una cianobacteria e incluye un gen exógeno codificante de una acil-ACP reductasa formadora de aldehído graso, obtenida de la misma especie o de diferentes especies de cianobacteria.

Una célula huésped recombinante tal como se da a conocer en cualquiera de las realizaciones en la presente memoria puede ser una célula huésped microbiana, por ejemplo un hongo, levadura, heteroconto, microalga, cianobacteria o eubacteria. Por ejemplo, el huésped puede ser una especie de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Aspergillus*, *Pichia*, *Schizochytrium*, *Thraustochytriales*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus* o *Gluconobacter*.

Una célula huésped recombinante tal como se da a conocer en cualquiera de las realizaciones en la presente memoria puede ser una célula huésped fotosintética, por ejemplo un microorganismo fotosintético, tal como una microalga o cianobacteria. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la célula huésped recombinante puede ser una cianobacteria de una especie de *Agmenellum*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Anacystis*, *Aphanizomenon*, *Arthrospira*, *Asterocapsa*, *Borzia*, *Calothrix*, *Chamaesiphon*, *Chlorogloeopsis*, *Chroococcidiopsis*, *Chroococcus*, *Crinalium*, *Cyanobacterium*, *Cyanobium*, *Cyanocystis*, *Cyanospira*, *Cyanothece*, *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermum*, *Dactylococcopsis*, *Dermocarpella*, *Fischerella*, *Fremyella*, *Geitleria*, *Geitlerinema*, *Gloeobacter*, *Gloeocapsa*, *Gloeothece*, *Halospirulina*, *Iyengariella*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Microcystis*, *Myxosarcina*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Nostochopsis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Pleurocapsa*, *Prochlorococcus*, *Prochloron*, *Prochlorothrix*, *Pseudanabaena*, *Rivularia*, *Schizothrix*, *Scytonema*, *Spirulina*, *Stanieria*, *Starria*, *Stigonema*, *Symploca*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Thermosynechococcus*, *Tolypothrix*, *Trichodesmium*, *Tychonema* o *Xenococcus*. Por ejemplo, el microorganismo fotosintético recombinante puede ser una especie de *Synechococcus*, *Synechocystis* o *Thermosynechococcus*. Alternativamente, el microorganismo fotosintético recombinante puede ser una especie de *Cyanobium*, *Cyanothece* o *Cyanobacterium*, o más alternativamente, el microorganismo fotosintético recombinante puede ser una especie de *Gloeobacter*, *Lyngbya* o *Leptolyngbya*.

En realizaciones alternativas, la célula huésped recombinante puede ser una microalga eucariótica, por ejemplo una especie de *Achnanthes*, *Amphiprora*, *Amphora*, *Ankistrodesmus*, *Asteromonas*, *Boekelovia*, *Borodinella*, *Botryococcus*, *Bracteococcus*, *Chaetoceros*, *Carteria*, *Chlamydomonas*, *Chlorococcum*, *Chlorogonium*, *Chlorella*, *Chroomonas*, *Chryso-sphaera*, *Cricosphaera*, *Crypthecodinium*, *Cryptomonas*, *Cyclotella*, *Dunaliella*, *Ellipsoidon*, *Emiliania*, *Eremosphaera*, *Ernodesmium*, *Euglena*, *Franceia*, *Fragilaria*, *Gloeothamnion*, *Haematococcus*, *Halocafeteria*, *Hymenomonas*, *Isochrysis*, *Lepocinclis*, *Micractinium*, *Monoraphidium*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Navicula*, *Neochloris*, *Nephrochloris*, *Nephroselmis*, *Nitzschia*, *Ochromonas*, *Oedogonium*, *Oocystis*, *Ostreococcus*, *Pavlova*, *Parachlorella*, *Pascheria*, *Phaeodactylum*, *Phagus*, *Picochlorum*, *Platymonas*, *Pleurochrysis*, *Pleurococcus*, *Prototheca*, *Pseudochlorella*, *Pseudoneochloris*, *Pyramimonas*, *Pyrobotrys*, *Scenedesmus*, *Schizochlamydeella*, *Skeletonema*, *Spyrogyra*, *Stichococcus*, *Tetrachorella*, *Tetraselmis*, *Thalassiosira*, *Viridiella* o *Volvox*. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante puede ser una diatomea, tal como una especie de *Amphora*, *Chaetoceros*, *Cyclotella*, *Navicula*, *Phaeodactylum* o *Thalassiosira*. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante puede ser una especie de *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Scenedesmus* o *Tetraselmis*.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para producir un éster de ácido graso, que comprende las etapas de cultivar una célula huésped recombinante que incluye una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera en un medio de cultivo adecuado y permitir la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica la acil-ACP sintasa de éster de cera para producir el éster de ácido graso. Por ejemplo, la célula huésped puede producir un alcohol, que puede ser, por ejemplo, un alcohol de cadena corta (p.ej. etanol, propanol, butanol, isobutanol, 2-metilbutanol o 3-metilbutanol) que puede condensarse con acil-ACP mediante la cera sintasa expresada por la célula huésped. Alternativamente, la invención proporciona un método para producir un éster de cera mediante el cultivo de una célula huésped recombinante que incluye una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera en un medio de cultivo adecuado, suministrando por lo menos un alcohol al medio de cultivo y permitiendo la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de acil-ACP sintasa de éster de cera para producir un éster de cera. El alcohol puede ser, por ejemplo, un alcohol de cadena corta o un alcohol graso.

La invención proporciona además un método para producir un éster de cera mediante el cultivo de una célula huésped recombinante que incluye una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera y una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP reductasa formadora de

alcohol graso en un medio de cultivo adecuado y permitir la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos no nativas codificantes de la acil-ACP reductasa y la acil-ACP sintasa de éster de cera a fin de producir un éster de cera. Adicionalmente, la célula huésped recombinante puede cultivarse en un medio que no incluye un alcohol, tal como un alcohol de cadena corta o un alcohol graso.

5 Las células huésped recombinantes utilizadas en cualquiera de los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden ser células huésped recombinantes tal como se dan a conocer en la presente memoria, por ejemplo que no incluyen una molécula de ácidos nucleicos exógena codificante de una acil-CoA sintetasa. Alternativamente o adicionalmente, las células huésped recombinantes utilizadas en los métodos para producir
10 ésteres de ácidos grasos y ésteres de cera pueden ser células recombinantes que no presentan un gen endógeno codificante de una acil-CoA sintetasa o, alternativamente, las células recombinantes utilizadas en los métodos pueden ser células manipuladas para atenuar o eliminar la producción de acil-CoA. Por ejemplo, las células huésped recombinantes pueden ser células que no producen acil-CoA y/o que no producen una acil-CoA sintetasa.

15 Adicionalmente, tal como se da a conocer en la presente memoria, las células huésped utilizadas en los métodos pueden ser células huésped que no incluyen un gen exógeno de acil-ACP o un gen exógeno de acil-CoA tioesterasa o ambos. Adicionalmente, una célula huésped utilizada para producir un éster graso o éster de cera puede no presentar un gen endógeno codificante de una acil-ACP tioesterasa o un gen endógeno codificante de una acil-CoA
20 tioesterasa, o en determinadas realizaciones, la célula huésped puede presentar una expresión atenuada de un gen endógeno de acil-ACP tioesterasa y/o un gen endógeno de acil-CoA tioesterasa, de manera que los enzimas no son producidos o son producidos en cantidades reducidas. Por ejemplo, una célula huésped recombinante utilizada en los métodos puede ser una célula huésped que no produce una acil-ACP tioesterasa o una acil-CoA tioesterasa. En algunos ejemplos, una célula huésped recombinante utilizada en los métodos puede ser una célula huésped que no produce una acil-ACP tioesterasa o una acil-CoA tioesterasa y que no produce acil-CoA. En algunos ejemplos, una
25 célula huésped recombinante utilizada en los métodos puede ser una célula huésped que no incluye un gen exógeno codificante de una acil-ACP tioesterasa o una acil-CoA tioesterasa y no incluye un gen exógeno codificante de una acil-CoA sintetasa. En algunos ejemplos, una célula huésped recombinante utilizada en los métodos puede ser una célula huésped que no incluye un gen endógeno codificante de una acil-ACP tioesterasa o una acil-CoA tioesterasa y no incluye un gen exógeno codificante de una acil-CoA sintetasa. En algunos ejemplos, una célula huésped
30 recombinante utilizada en los métodos puede ser una célula huésped que no incluye un gen endógeno o exógeno codificante de cualquiera de entre una acil-ACP tioesterasa, una acil-CoA tioesterasa y una acil-CoA sintetasa.

Los métodos independientes de acil-CoA para producir un éster de ácido graso o éster de cera pueden utilizar
35 células recombinantes que presentan genes no nativos codificantes de cualquier acil-ACP sintasa de éster de cera, tal como cualquiera indicado en la presente memoria, y en métodos en los que los ésteres de cera son producidos por completo por las células huésped recombinantes, cualquier acil-ACP reductasa formadora de alcohol, tal como cualquiera indicada en la presente memoria.

En ejemplos particulares, los métodos pueden utilizar células recombinantes que presentan genes no nativos
40 codificantes de una acil-ACP sintasa de éster de cera con una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a *M. hydrocarbonoclasticus* WS1 (SEC ID nº 19) y WS2 (SEC ID nº 21), o una identidad de por lo menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43. Por ejemplo, los métodos para
45 producir un éster de ácido graso, tal como un éster de cera, pueden incluir la utilización de un microorganismo manipulado que incluye un gen codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera con una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 85% o 90% respecto a *M. hydrocarbonoclasticus* WS1 (SEC ID nº 19). Alternativamente, los métodos para producir un éster de ácido graso, tal como un éster de cera, pueden incluir la utilización de un microorganismo manipulado que incluye un gen codificante de una acil-ACP sintasa de éster de
50 cera con una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 85% o 90% respecto a *M. hydrocarbonoclasticus* WS2 (SEC ID nº 21). En algunos ejemplos, la invención proporciona métodos independientes de acil-CoA para producir un éster de cera utilizando una acil-ACP sintasa de éster de cera codificada por una secuencia de ácidos nucleicos con una identidad de secuencia de por lo menos 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a una secuencia de ácidos
55 nucleicos codificante de WS1 (SEC ID nº 18) o WS2 (SEC ID nº 20). Por ejemplo, los métodos para producir un éster de ácido graso, tal como un éster de cera pueden incluir la utilización de un microorganismo manipulado que incluye un gen con una identidad de secuencia de por lo menos 85% o 90% respecto a *M. hydrocarbonoclasticus* WS1 (SEC ID nº 18). Alternativamente, los métodos para producir un éster de ácido graso, tal como un éster de cera pueden incluir la utilización de un microorganismo manipulado que incluye un gen con una identidad de secuencia de por lo menos 85% o 90% respecto a *M. hydrocarbonoclasticus* WS2 (SEC ID nº 22).

Algunos o la totalidad de los sustratos de alcohol graso de la acil-ACP sintasa de éster de cera pueden producirse
65 en una célula huésped recombinante que incluye una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de cualquier acil-ACP reductasa formadora de alcohol, tal como cualquiera indicada en la presente memoria. Por ejemplo, los métodos pueden utilizar células recombinantes que presentan genes no nativos codificantes de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol con una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 40%,

45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a Maqu_2220 (SEC ID nº 2) o Hch_05075 (SEC ID nº 4), o una identidad de por lo menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 6, nº 8 o nº 10. Por ejemplo, los métodos para producir un éster de cera pueden incluir la utilización de un microorganismo manipulado que incluye un gen codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol con una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 85% o 90% respecto a Maqu_2220 (SEC ID nº 2). Alternativamente, los métodos para producir un éster de cera pueden incluir la utilización de un microorganismo manipulado que incluye un gen codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol con una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 85% o 90% respecto a Hch_05075 (SEC ID nº 4). Por ejemplo, los métodos para producir un éster de cera pueden incluir la utilización de un microorganismo manipulado que incluye un gen con una identidad de secuencia de por lo menos 85% o 90% respecto a Maqu_2220 (SEC ID nº 1). Alternativamente, los métodos para producir un éster de cera pueden incluir la utilización de un microorganismo manipulado que incluye un gen con una identidad de secuencia de por lo menos 85% o 90% respecto a Hch_05075 (SEC ID nº 3).

La célula huésped recombinante puede producir un nivel incrementado del éster de ácido graso o éster de cera respecto a una célula huésped de control idéntica a la célula huésped recombinante en todos los aspectos excepto en que no presenta la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP sintasa de éster de cera no nativa y la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol no nativa, en caso de hallarse presente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la célula huésped recombinante puede producir por lo menos 50% o más de un éster de ácido graso respecto a una célula huésped de control que no presenta la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la éster de cera sintasa no nativa. Alternativamente o adicionalmente, la célula huésped recombinante puede producir por lo menos 50% o más de un éster de cera respecto a una célula huésped de control que no presenta la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la éster de cera sintasa no nativa y la secuencia codificante de la acil-ACP reductasa no nativa. En algunos ejemplos, la célula huésped recombinante puede producir por lo menos 100% o más del éster de cera respecto a una célula huésped de control que no presenta la secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de acil-ACP sintasa de éster de cera y la secuencia no nativa codificante de la acil-ACP reductasa.

Adicionalmente, en algunos ejemplos de los métodos, la célula huésped recombinante puede producir por lo menos 1, 2, 5 o 10 mg/l del éster de cera en un periodo de cultivo de entre aproximadamente uno y aproximadamente treinta días, tal como entre aproximadamente tres y aproximadamente quince días, o entre aproximadamente cinco y aproximadamente diez días. Adicionalmente o alternativamente, la célula huésped recombinante puede producir menos de aproximadamente 1 g/l, 500 mg/l, 200 mg/l, 100 mg/l o 50 mg/l del éster de cera en un periodo de cultivo de entre aproximadamente uno y aproximadamente treinta días, tal como entre aproximadamente tres y aproximadamente quince días, o entre aproximadamente cinco y aproximadamente diez días.

En algunos ejemplos de los métodos proporcionados en la presente memoria, el método incluye producir por lo menos una molécula de éster de cera, en la que tanto la cadena A derivada de un alcohol graso como la cadena B derivada de un sustrato acilo (p.ej. acil-ACP) son producidos por la célula huésped, p.ej. un microorganismo recombinante tal como se da a conocer en la presente memoria y tanto la cadena A como la cadena B pueden presentar longitudes de cadena de C8-C24. Por ejemplo, por lo menos una molécula de éster de cera producida mediante un método dado a conocer en la presente memoria puede presentar tanto una cadena A como una cadena B de C12-C18. Adicional aunque opcionalmente, por lo menos una parte del éster de cera producido mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria puede ser secretado por la célula huésped. Adicional aunque opcionalmente, los métodos pueden incluir además la etapa de aislar un éster de cera o un producto de un éster de cera.

Adicional aunque opcionalmente, una célula huésped recombinante que produce un éster de cera también puede expresar preferentemente una reductasa formadora de aldehído graso, por ejemplo una acil-ACP reductasa formadora de aldehído graso. La reductasa formadora de aldehído graso puede ser endógeno de la célula huésped recombinante o alternativamente puede ser exógeno con respecto a la célula huésped recombinante.

Adicional aunque opcionalmente, la producción de acil-ACP puede regularse positivamente en la célula huésped recombinante, por ejemplo mediante la expresión o sobreexpresión de uno o más polipéptidos exógenos o endógenos, tales como, por ejemplo, una beta-cetoacil sintetasa, una acetil-CoA carboxilasa, una malonil CoA:ACP transacilasa, una acil-ACP sintetasa o una proteína portadora de acilos. Por ejemplo, la célula huésped recombinante puede expresar o sobreexpresar uno o más polipéptidos exógenos o endógenos que incrementan la fijación del carbono o eficiencia fotosintética de captación de luz o estimular la secreción del producto éster de cera, tal como, por ejemplo, ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa, una ficobiliproteína o un transportador transmembranal. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante presenta una expresión atenuada de uno o más de entre glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, acetaldehído-CoA deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa o acetato quinasa.

Una célula huésped recombinante que produce un éster de cera también puede expresar opcionalmente un transportador transmembranal, tal como, por ejemplo, un transportador de casete de unión a ATP (ABC, por sus

siglas en inglés), una proteína de flujo de salida multifármaco o una bomba de resistencia a división por nodulación (RND, por sus siglas en inglés) para facilitar la secreción de éster de cera.

5 La invención proporciona además métodos independientes de acil-CoA para producir un éster de cera en una célula huésped fotosintética. Las células huésped fotosintéticas son capaces de utilizar el carbono inorgánico (p.ej. El dióxido de carbono o un compuesto carbonato o bicarbonato) como fuente de carbono y, de esta manera, pueden proporcionar un método más eficiente y con mejor relación coste-eficacia de producción de éster de cera que las células huésped que dependen totalmente de fuentes de carbono reducidas y/o más largas.

10 La invención proporciona métodos para producir un éster de ácido graso, que comprende las etapas de cultivar una célula huésped fotosintética que incluye una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera en un medio de cultivo adecuado y permitir la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica la acil-ACP sintasa de éster de cera para producir el éster de ácido graso. La célula huésped fotosintética en algunos ejemplos puede producir uno o más alcoholes, que puede ser, por ejemplo, alcoholes de cadena corta o grasos, utilizados como un sustrato por la cera sintasa. El medio de cultivo adecuado puede ser, por ejemplo, un medio de cultivo que no incluye una cantidad sustancial de una fuente de carbono reducido y/o puede ser un medio de cultivo que no incluye un alcohol, tal como un alcohol de cadena corta o graso.

20 Alternativamente, la invención proporciona un método para producir un éster de cera mediante el cultivo de una célula huésped fotosintética recombinante que incluye una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera en un medio de cultivo adecuado, suministrando por lo menos un alcohol al medio de cultivo y permitiendo la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos no nativas codificantes de acil-ACP sintasa de éster de cera para producir un éster de cera. El alcohol suministrado puede ser, por ejemplo, un alcohol de cadena corta o un alcohol graso.

25 La invención proporciona además un método para producir un éster de cera mediante el cultivo de una célula huésped fotosintética que incluye una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera y una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol graso en un medio de cultivo adecuado y permitir la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos no nativas codificantes de la acil-ACP reductasa y la acil-ACP sintasa de éster de cera a fin de producir un éster de cera. El microorganismo fotosintético puede cultivarse en un medio de cultivo que no incluye un alcohol suministrado. Adicionalmente, la célula huésped fotosintética recombinante puede cultivarse en un medio que no incluye una cantidad sustancial de una fuente de carbono reducido, tal como, por ejemplo, un alcohol, azúcar o ácido orgánico. Adicionalmente, el método puede incluir exponer el cultivo a la luz durante por lo menos una parte del periodo de cultivo.

30 La célula huésped fotosintética puede incluir una secuencia no nativa de ácidos nucleicos codificante de cualquier gen de acil-ACP sintasa de éster de cera tal como se da a conocer en la presente memoria y puede incluir además una secuencia no nativa de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP reductasa, tal como cualquiera dada a conocer en la presente memoria. En algunas realizaciones, los métodos independientes de acil-CoA de la invención se llevan a cabo en un microorganismo fotosintético, p.ej. una cianobacteria o una microalga eucariótica. En determinadas realizaciones, el microorganismo fotosintético no produce endógenamente acil-CoA.

35 Una célula huésped fotosintética recombinante utilizada para la producción de ésteres de cera puede ser una microalga eucariótica, por ejemplo de una especie de *Achnanthes*, *Amphiprora*, *Amphora*, *Ankistrodesmus*, *Asteromonas*, *Boekelovia*, *Borodinella*, *Botryococcus*, *Bracteococcus*, *Chaetoceros*, *Carteria*, *Chlamydomonas*, *Chlorococcum*, *Chlorogonium*, *Chlorella*, *Chroomonas*, *Chryso-sphaera*, *Cricosphaera*, *Cryptocodinium*, *Cryptomonas*, *Cyclotella*, *Dunaliella*, *Ellipsoidon*, *Emiliania*, *Eremosphaera*, *Ernodesmus*, *Euglena*, *Franceia*, *Fragilaria*, *Gloeothamnion*, *Haematococcus*, *Halocafeteria*, *Hymenomonas*, *Isochrysis*, *Lepocinclis*, *Micractinium*, *Monoraphidium*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Navicula*, *Neochloris*, *Nephrochloris*, *Nephroselmis*, *Nitzschia*, *Ochromonas*, *Oedogonium*, *Oocystis*, *Ostreococcus*, *Pavlova*, *Parachlorella*, *Pascheria*, *Phaeodactylum*, *Phagus*, *Picochlorum*, *Platymonas*, *Pleurochrysis*, *Pleurococcus*, *Prototheca*, *Pseudochlorella*, *Pseudoneochloris*, *Pyramimonas*, *Pyrobotrys*, *Scenedesmus*, *Schizochlamydeella*, *Skeletonema*, *Spyrogyra*, *Stichococcus*, *Tetrachorella*, *Tetraselmis*, *Thalassiosira*, *Viridiella* o *Volvox*.

40 Los métodos de la invención pueden llevarse a cabo ventajosamente en células huésped cianobacterianas. Las cianobacterias sintetizan acil-ACP pero no producen naturalmente acil-CoA, alcoholes grasos o ésteres de cera. Además, los genomas cianobacterianos no incluyen genes codificantes de acil-ACP tioesterasas o acil-CoA tioesterasas. Por lo tanto, las células huésped cianobacterianas pueden manipularse para producir ésteres de cera mediante la introducción de una molécula de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera (p.ej. WA1 (SEC ID nº 19) o WS2 (SEC ID nº 21), o sintasas de éster cera que presentan una identidad de secuencia de por lo menos 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a WS1 o WS2, u otras dadas a conocer en la presente memoria, p.ej. cualquiera de las SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43) y un único gen de acil-ACP reductasa formador de alcohol (p.ej. codificante de una acil-ACP reductasa que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a, p.ej.,

Maqu_2220 (SEC ID nº 2), Hch_05075 (SEC ID nº 4), MDG893_11561 (SEC ID nº 6), HP15_810 (SEC ID nº 8) o RED65_09894 (SEC ID nº 10) u otros tal como se da a conocer en la presente memoria) sin necesidad de atenuar o eliminar la expresión de genes endógenos que funcionan en una ruta dependiente de acil-CoA, p.ej. una tioesterasa o una acil-CoA sintetasa. Además, debido a que las cianobacterias son microorganismos fotosintéticos que pueden utilizar fuentes de carbono inorgánico (no reducido), tales como CO₂, en comparación con, p.ej., células heterotróficas que dependen de fuentes de carbono orgánico, tales como azúcares que deben añadirse al medio, cianobacterias transformadas con una acil-ACP sintasa de éster de cera y un gen de acil-ACP reductasa formador de alcohol pueden proporcionar un sistema biológico simplificado y más energéticamente eficiente para producir ésteres de cera.

Entre las cianobacterias que pueden utilizarse como células huésped se incluyen, por ejemplo, especies de *Agmenellum*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Anacystis*, *Aphanizomenon*, *Arthrospira*, *Asterocapsa*, *Borzia*, *Calothrix*, *Chamaesiphon*, *Chlorogloeopsis*, *Chroococciopsis*, *Chroococcus*, *Crinalium*, *Cyanobium*, *Cyanocystis*, *Cyanospira*, *Cyanothece*, *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermum*, *Dactylococcopsis*, *Dermocarpella*, *Fischerella*, *Fremyella*, *Geitleria*, *Geitlerinema*, *Gloeobacter*, *Gloeocapsa*, *Gloeotheca*, *Halospirulina*, *Iyengariella*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Microcystis*, *Myxosarcina*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Nostochopsis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Pleurocapsa*, *Prochlorococcus*, *Prochloron*, *Prochlorothrix*, *Pseudanabaena*, *Rivularia*, *Schizothrix*, *Scytonema*, *Spirulina*, *Stanieria*, *Starria*, *Stigonema*, *Symploca*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Thermosynechococcus*, *Tolypothrix*, *Trichodesmium*, *Tychonema* o *Xenococcus*. Por ejemplo, el microorganismo fotosintético recombinante puede ser una especie de *Synechococcus*, *Synechocystis* o *Thermosynechococcus*. Alternativamente, el microorganismo fotosintético recombinante puede ser una especie de *Cyanobium*, *Cyanothece* o *Cyanobacterium*, o más alternativamente, el microorganismo fotosintético recombinante puede ser una especie de *Gloeobacter*, *Lyngbya* o *Leptolyngba*.

La invención proporciona además sistemas para producir un éster de ácido graso de una manera independiente de acil-CoA, p.ej. mediante el cultivo de microorganismos recombinantes que no producen acil-CoA y expresan una acil-ACP sintasa de éster de cera y ésteres de cera producidos utilizando dichos huéspedes y sistemas. Por ejemplo, en la presente memoria se proporciona un sistema para producir un éster de cera que incluye un microorganismo fotosintético recombinante que presenta una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera cultivada en un medio que no incluye una cantidad sustancial de una fuente de carbono reducido, en la que el microorganismo fotosintético se expone a la luz durante por lo menos una parte del periodo de producción. Adicionalmente, el microorganismo fotosintético puede incluir además una secuencia no nativa de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol. Opcionalmente, el sistema puede incluir además una fuente de carbono inorgánico (p.ej. no reducido), tal como, por ejemplo, CO₂, ácido carbónico, carbonato o bicarbonato. La fuente de carbono inorgánico en realizaciones preferentes proporciona el carbono para la síntesis de un producto éster de cera. En algunos ejemplos, el microorganismo fotosintético es una cianobacteria.

La invención proporciona además una molécula aislada de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera, una molécula aislada de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol y una molécula aislada de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera y una acil-ACP reductasa formadora de alcohol. En algunas realizaciones, la molécula aislada de ácidos nucleicos comprende además una secuencia adicional de ácidos nucleicos de por lo menos 50 nucleótidos procedente de un microorganismo fotosintético. Además, la invención proporciona vectores y células huésped recombinante que comprende por lo menos una molécula aislada de ácidos nucleicos o un vector codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera y que opcionalmente comprende además por lo menos una molécula aislada de ácidos nucleicos o vector codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, o que comprende por lo menos una molécula aislada de ácidos nucleicos codificante de tanto una acil-ACP sintasa de éster de cera y una acil-ACP reductasa formadora de alcohol.

En todavía otro aspecto de la invención, se proporciona una composición que incluye un éster de cera. El éster de cera se produce mediante los métodos proporcionados en la presente memoria y pueden incluir uno o más ésteres de cera que presentan tanto una cadena A como una cadena B con longitudes de cadena de C8-C24. En algunas realizaciones, la composición comprende por lo menos una molécula de éster de cera producida mediante un método dado a conocer en la presente memoria que presenta tanto una cadena A como una cadena B de C12-C18. Las composiciones de la invención pueden comprender, según determinadas realizaciones, una mezcla de diferentes ésteres de cera en la que la mezcla comprende diferentes ésteres de cera en proporciones similares (por ejemplo, dentro de +/-20%) a las producidas por una célula huésped recombinante de la invención. Adicional o alternativamente, una composición de éster de cera de la invención puede, según determinadas realizaciones, ser identificable como productora según un método de la invención mediante la detección de una impureza menor en la composición que identifica su fuente de una célula huésped recombinante de la invención. Por ejemplo, una composición puede contener una o más moléculas de ácidos nucleicos como componente menor que puede detectarse, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o mediante un método de detección alternativo de amplificación de ácidos nucleicos específica de secuencia, en la que la molécula o moléculas de ácidos nucleicos pueden presentar una secuencia correspondiente a por lo menos una parte de la SEC ID nº 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 o 42, etc. o secuencias que presentan una identidad de secuencia de por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a las

mismas que codifican por lo menos una parte de una acil-ACP sintasa de cera y/o las moléculas de ácidos nucleicos pueden presentar una secuencia correspondiente a por lo menos una parte de la SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 5, SEC ID nº 7, SEC ID nº 9 ó SEC ID nº 11, etc. o secuencias que presentan una identidad de secuencia de por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a las mismas que codifican por lo menos una parte de una acil-ACP reductasa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la acil-ACP reductasa de *Marinobacter aquaeolei* cepa VT8 Maqu_2220 ("Maqu_2220"; SEC ID nº 2).

La FIGURA 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol de *Hahella chejuensis* cepa KCTC 2396 ("Hch_05075, SEC ID nº 4).

La FIGURA 3 muestra la secuencia de aminoácidos de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol de *Marinobacter algicola* cepa DG893 ("MDG893_11561"; SEC ID nº 6).

La FIGURA 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol de *Marinobacter algicola* cepa HP15 ("HP15_810"; SEC ID nº 8).

La FIGURA 5 muestra la secuencia de aminoácidos de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol de *Oceanobacter* sp. cepa RED65 ("RED65_09894"; SEC ID nº 10).

La FIGURA 6 muestra la secuencia de aminoácidos de la sintasa de éster de cera de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* cepa 8798 WS1 ("sintasa de éster de cera WS1"; SEC ID nº 19).

La FIGURA 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la sintasa de éster de cera de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* cepa 8798 WS2 ("sintasa de éster de cera WS2"; SEC ID nº 21).

La FIGURA 8 muestra la secuencia de aminoácidos de la sintasa de éster de cera de *Marinobacter* sp. cepa ELB17 ("sintasa de éster de cera ELB17"; SEC ID nº 43).

La FIGURA 9 es una representación esquemática de rutas metabólicas de derivados de ácidos grasos.

La FIGURA 10 es una representación esquemática de una ruta metabólica ejemplar para producir alcoholes grasos a partir de acil-ACP.

La FIGURA 11 es una representación esquemática de una ruta metabólica en dos etapas para producir ésteres de cera a partir de alcoholes grasos y acil-ACP.

La FIGURA 12 muestra un mapa plasmídico (pSGE05075) de un vector de integración construido con el gen de acil-ACP reductasa Maqu_2220 de codones optimizados. RS1-down y RS1-up se refieren a sitios de integración en el cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

La FIGURA 13 A) muestra un cromatograma de cromatografía de fases de *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultivado fototrópicamente y que expresan una acil-CoA reductasa Maqu_2507 (SEC ID nº 12). B) muestra un cromatograma de cromatografía de gases de *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultivado fototrópicamente y que expresa un gen codificante de la acil-ACP reductasa Maqu_2220 optimizado con codones (SEC ID nº 11). Los productos lipídicos están marcados verticalmente para cada pico.

La FIGURA 14 muestra un gráfico que demuestra las cantidades de alcohol graso (C16 y C18:O-ol) producidas en *Synechocystis* sp. PCC 6803 que expresa acil-ACP reductasas Maqu_2220 de tipo salvaje (5074) y 6803 de codones optimizados (5075), en comparación con *Synechocystis* sp. PCC 6803 que expresa Maqu_2507 (5076), una acil-CoA reductasa que utiliza acil-CoA como sustrato. No se detectó ningún aldehído graso en ninguna de las muestras.

La FIGURA 15 muestra un gráfico que demuestra los alcoholes grasos totales producidos en *Synechocystis* sp. PCC 6803 que no expresa acil-ACP reductasa heteróloga ("Wt 6803") o que expresa acil-ACP reductasa formadora de alcohol graso Hch_05075 ("Hahella FAR").

La FIGURA 16 muestra un mapa plasmídico (pSGE05175) de un vector de integración construido con el gen de acil-ACP reductasa Maqu_2220 y el gen WS1. RS1-down y RS1-up se refieren a sitios de integración en el cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

La FIGURA 17 muestra un gráfico que demuestra la producción de éster de cera y alcohol graso en *Synechocystis* sp. PCC 6803 que expresa WS1 (SEC ID nº 19) y Maqu_2220 (SEC ID nº 2) ("5175 (WS1)"); *Synechocystis* sp. PCC 6803 que expresa WS de petunia (SEC ID nº 45) y Maqu_2220 (SEC ID nº 2) ("5174 (WS Petunia)") y *Synechocystis* sp. PCC 6803 que no expresa genes heterólogos ("6803 Ctrl neg").

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona métodos independientes de acil-CoA para producir un éster de cera en células huésped recombinantes, así como moléculas aisladas de nucleótidos, vectores y células huésped y sistemas recombinantes para producir un éster de cera mediante una ruta independiente de acil-CoA y composiciones que incluyen ésteres de cera preparados mediante los métodos de la invención.

El experto en la materia apreciará que la exposición de la presente solicitud incluye la exposición de realizaciones que comprenden combinaciones de dos o más elementos descritos por conveniencia mediante la referencia a realizaciones específicas. Los títulos en la solicitud se proporcionan únicamente para comodidad del lector y no limitan en modo alguno el alcance de la invención o sus realizaciones.

Todas las publicaciones y solicitud de patente citadas en la presente memoria se incorporan en la presente memoria como referencia como si cada publicación individual o solicitud de patente se encontrase específica e individualmente indicada como incorporada como referencia.

5 Definiciones

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención.

10 Durante toda la presente memoria y realizaciones, el término "comprende" o variaciones tales como "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de una entidad, ítem o grupo de ítems indicados pero sin excluir cualquier otra entidad, ítem o grupo de ítems.

15 Los artículos singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Una referencia a una célula, por ejemplo, incluye una pluralidad de células.

20 El término "y/o" tal como se utiliza en una expresión, tal como "A y/o B" en la presente memoria pretende incluir "A y B", "A o B", "A" y "B".

25 La expresión "acil-ACP reductasa formadora de alcohol" se refiere a una proteína que es capaz de convertir acil-ACP en un alcohol graso. Una "acil-CoA reductasa formadora de alcohol" es una proteína que es capaz de convertir acil-CoA en alcohol graso. La expresión "acilo graso reductasa formadora de alcohol" se refiere a enzimas que pueden convertir acil-ACP o acil-CoA en alcoholes grasos e incluye "acilo graso reductasas formadoras de alcohol promiscuas" que son capaces de utilizar tanto acil-ACP como acil-CoA como sustratos para la producción de alcoholes grasos.

30 Un "alcohol de cadena corta" es un alcohol que presenta entre 1 y 5 átomos de carbono. Un alcohol de cadena corta puede ser lineal o ramificado. Entre los ejemplos no limitativos de alcoholes de cadena corta se incluyen metanol, etanol, propanol, butanol, isobutanol, 2-metilbutanol y 3-metilbutanol.

35 Un "alcohol graso" es un alcohol primario que presenta la fórmula ROH, en la que R es un grupo alifático, preferentemente un grupo alquilo. R puede comprender entre aproximadamente 6 y aproximadamente 24 átomos de carbono. La cadena alifática puede ser saturada, monoinsaturada o poliinsaturada. La expresión "uno o más alcoholes grasos" se refiere a uno o más alcoholes grasos de diferente longitud de cadena y/o patrón de saturación, por ejemplo un alcohol graso C16:1, un alcohol graso C18:2 y un alcohol graso C14 son alcoholes grasos particulare.s

40 La expresión "acil reductasa formadora de aldehído" o "reductasa formadora de aldehído" se refiere a un enzima que produce un aldehído graso a partir de un sustrato acilo, tal como un ácido carboxílico (p.ej. un ácido graso libre), un acil-ACP o un acil-CoA. Una "acil-ACP reductasa formadora de aldehído" se refiere a una proteína que convierte acil-ACP en un aldehído graso.

45 Un "éster de ácido graso" es un éster de un ácido graso y un alcohol. La cadena de carbono que origina de un alcohol se denomina cadena A y la cadena de carbonos que se origina a partir de un ácido graso (la fracción ácido graso puede ser proporcionada por un acil-tioéster) se denomina cadena B. Un éster de ácido graso puede presentar un lado A de cualquier longitud, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 o más de 24 carbonos de longitud. Un éster de ácido graso puede presentar un lado B de cualquier longitud, por ejemplo de 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 o más de 24 carbonos de longitud. Las longitudes de las cadenas A y B de un éster de ácido graso pueden variar independientemente. Por ejemplo, la condensación de metanol (C1) y una cadena de acilo (ácido graso o acil-tioéster) de C4 o superior puede resultar en un metil-éster de ácido graso ("FAME", por sus siglas en inglés) y la condensación de etanol y una cadena de acilo puede resultar en un etil-éster de ácido graso ("FAEE", por sus siglas en inglés). La condensación de un alcohol graso (C8 o superior) con un acil-tioéster (C8 o superior) produce un éster de cera.

55 Un "éster de cera" es un éster de un ácido graso y un alcohol alifático de cadena larga. Los ésteres de cera presentan una cadena A, derivada de un alcohol graso, de por lo menos 8 carbonos y una cadena B, derivada de un acil-tioéster, de por lo menos 8 carbonos. El número de carbonos en las cadenas A y B de un éster de cera puede variar independientemente.

60 Una "éster de cera sintasa" o "cera sintasa" es un enzima que cataliza la condensación de un alcohol graso y un acil-tioéster, tal como, por ejemplo, acil-CoA o acil-ACP para producir un éster de cera. Una cera sintasa también puede condensar un alcohol de cadena corta con un acil-tioéster, por ejemplo para producir un éster de ácido graso, tal como un metil-éster de ácido graso o etil-éster de ácido graso.

65

La expresión "acil-ACP sintasa de éster de cera" o "acil-ACP sintasa de cera" se refiere a una proteína que es capaz de transferir una cadena de acilo de un sustrato acil-ACP a un alcohol graso para formar un éster de cera. Entre las acil-ACP sintasas de éster de cera se incluyen las sintasas de éster de cera que utilizan únicamente acil-ACP como sustratos acil-tioéster y las acil-ACP sintasas de éster de cera capaces de utilizar otros sustratos acil-tioéster (p.ej. acil-CoA) además de acil-ACP.

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se utilizan intercambiabilmente en la presente memoria, aunque "péptido", en algunos casos, puede utilizarse para referirse a un polipéptido que no presenta más de aproximadamente 100 aminoácidos o no más de aproximadamente 60 aminoácidos.

La expresión "fragmento funcional" se refiere a un polipéptido que presenta una deleción aminoterminal y/o carboxiterminal, en el que la secuencia de aminoácidos restante presenta una identidad de secuencias de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a las posiciones correspondientes en la secuencia de referencia y que conserva aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la actividad del polipéptido de longitud completa. Los fragmentos funcionales pueden comprender, p.ej., 90% o menos, 80% o menos, 70% o menos, 60% o menos, 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos o 20% o menos del polipéptido de longitud completa, y pueden incluir, por ejemplo, hasta aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% del polipéptido de longitud completa.

La presente solicitud da a conocer y se refiere a ácidos nucleicos y polipéptidos mediante identificadores utilizados en bases de datos establecidas desde hace mucho tiempo y ampliamente referenciadas que mantiene la National Center for Biotechnology Information (NCBI). Los números de acceso son identificadores únicos para un registro de secuencia disponible públicamente en el sitio de internet (ncbi.nlm.nih.gov) mantenido por el United States National Institutes of Health. El número de identificación de secuencia "GenInfo Identifier" (GI) es específica de una secuencia de nucleótidos o aminoácidos. En el caso de que la secuencia cambie de algún modo, se asigna un nuevo número GI. Se encuentra disponible una herramienta de historia de revisiones de la secuencia para realizar un seguimiento de los diversos números GI, números de versión y fechas de actualización de las secuencias que aparecen en un registro GenBank específico. La búsqueda y obtención de secuencias de ácidos nucleicos o génicas o de proteínas basándose en los números de acceso y números GI es bien conocida de las técnicas, p.ej. de la biología celular, bioquímica, biología molecular y genética molecular.

El porcentaje de identidad u homología con respecto a las secuencias de aminoácidos o nucleótidos se define en la presente memoria como el porcentaje de residuos aminoácidos o nucleótidos en la secuencia candidata que son idénticos a polipéptidos conocidos, después de la alineación de las secuencias para un porcentaje máximo de identidad y la introducción de huecos, en caso necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de homología. La homología o identidad en el nivel de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos puede determinarse utilizando métodos conocidos de la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, BLAST (por sus siglas en inglés, herramienta básica de búsqueda de alineaciones locales) utilizando los algoritmos utilizados por los programas `blastp`, `blastn`, `blastx`, `tblastn` y `tblastx` (Altschul, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997 y Karlin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, 1990) que se ajustan para la búsqueda de similitudes de secuencia.

"Pfam" es una gran colección de dominios de proteínas y familias de proteínas mantenida por el consorcio Pfam y se encuentra disponible en varios sitios de Internet patrocinados, entre ellos: pfam.sanger.ac.uk/ (Welcome Trust, Sanger Institute); pfam.sbc.su.se/ (Stockholm Bioinformatics Center); pfam.janelia.org/ (Janelia Farm, Howard Hughes Medical Institute); pfam.jouy.inra.fr/ (Institut national de la Recherche Agronomique) y pfam.cccb.re.kr/. La última versión de Pfam es Pfam 26.0 (noviembre de 2011, 13.672 familias) basada en la base de datos de proteínas UniProt versión 2020_05. Los dominios y familias de Pfam se identifican utilizando múltiples alineaciones de secuencias y modelos de Markov ocultos (HMM, por sus siglas en inglés). Las familias Pfam-A, basadas en asignaciones de alta calidad, son generadas por una alineación consolidada de la semilla utilizando miembros representativos de una familia de proteínas y modelos de Markov ocultos de perfil basados en la alineación de la semilla (a menos que se indique lo contrario, las correspondencias de una proteína problema con un Pfam son correspondencias de Pfam-A). Todas las secuencias identificadas pertenecientes a la familia se utilizan a continuación para generar automáticamente una alineación completa para la familia (Sonnhammer et al., *Nucleic Acids Research* 26: 320-322, 1998; Bateman et al., *Nucleic Acids Research* 26: 263-266, 2000; Bateman et al., *Nucleic Acids Research* 32, 2004, versión de la base de datos: D138-D141; Finn et al. *Nucleic Acids Research Database Issue* 34: D247-251, 2006; Finn et al. *Nucleic Acids Research Database Issue* 38: D211-222, 2010). Mediante el acceso a la base de datos pfam (por ejemplo utilizando cualquiera de los sitios de internet anteriormente indicados), pueden realizarse preguntas en secuencias de proteínas frente a los HMM utilizando el software de búsqueda de homología HMMER (p.ej. HMMER3 hmm.janelia.org/). Son correspondencias significativas que identifican una proteína interrogada como presente en una familia de pfam (o que presenta un dominio pfam particular) aquellas en las que la puntuación de bit es superior o igual al umbral de inclusión en la alineación para el dominio Pfam. Los valores esperados (valores e) también pueden utilizarse como criterio para la inclusión de una proteína interrogada en un pfam o para determinar si una proteína interrogada presenta un dominio de pfam

particular, en el que los valores de e bajos (muy inferiores a 1,0, por ejemplo inferiores a 0,1 o inferiores o iguales a 0,01) representan probabilidades bajas de que una correspondencia se deba al azar.

5 Una "variante conservada" de un polipéptido es un polipéptido que presenta una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos con respecto al polipéptido de referencia, en el que la actividad (p.ej. el efecto sobre la transcripción), la afinidad para correguladores o ligandos, o la afinidad de unión al ADN del polipéptido no difieren sustancialmente de las del polipéptido de referencia.

10 La expresión "sustitución conservadora de aminoácidos" o "mutación conservadora" se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido con una propiedad común. Un modo funcional de definir propiedades comunes entre aminoácidos individuales es analizar las frecuencias normalizadas de cambios de aminoácidos entre las proteínas correspondientes de organismos homólogos (Schulz, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1979). Según dichos análisis, pueden definirse grupos de aminoácidos en los que los aminoácidos dentro de un grupo se intercambian preferentemente entre sí y, por lo tanto, son más similares entre sí en su impacto sobre la estructura global de la proteína (Schulz, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1979). Entre los ejemplos de grupos de aminoácidos definidos de este modo pueden incluirse un "grupo cargado/polar", incluyendo Glu, Asp, Asn, Gln, Lys, Arg y His; un "grupo aromático o cíclico", incluyendo Pro, Phe, Tyr y Trp, y un "grupo alifático", incluyendo Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Ser, Thr y Cys. Dentro de cada grupo también pueden identificarse subgrupos. Por ejemplo, el grupo de aminoácidos cargados/polares puede subdividirse en subgrupos, incluyendo el "subgrupo cargado positivamente", que comprende Lys, Arg e His; el "subgrupo cargado negativamente", que comprende Glu y Asp, y el "subgrupo polar", que comprende Asn y Gln. En otro ejemplo, el grupo aromático o cíclico puede subdividirse en subgrupos, incluyendo el "subgrupo de anillo nitrogenado", que comprende Pro, His y Trp, y el "subgrupo fenilo", que comprende Phe y Tyr. En otro ejemplo adicional, el grupo alifático puede subdividirse en subgrupos, entre ellos: el "subgrupo no polar alifático grande", que comprende Val, Leu e Ile; el "subgrupo ligeramente polar alifático", que comprende Met, Ser, Thr y Cys, y el "subgrupo de residuo pequeño", que comprende Gly y Ala. Entre los ejemplos de mutaciones conservadoras se incluyen las sustituciones de aminoácidos dentro de los subgrupos indicados anteriormente, tales como, aunque sin limitación: Lys por Arg o viceversa, de manera que puede mantenerse una carga positiva; Glu por Asp o viceversa, de manera que puede mantenerse una carga negativa; Ser por Thr o viceversa, de manera que puede mantenerse un OH libre, y Gln por Asn o viceversa, de manera que puede mantenerse un NH_2 libre.

35 El término "gen" se utiliza ampliamente para referirse a cualquier segmento de molécula de ácidos nucleicos (típicamente de ADN aunque opcionalmente de ARN) codificante de una proteína o ARN expresado. De esta manera, entre los genes se incluyen secuencias codificantes de ARN expresado (que puede incluir secuencias codificantes de polipéptido). Los genes pueden comprender además las secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Los genes pueden obtenerse a partir de una diversidad de fuentes, incluyendo la clonación a partir de una fuente de interés o mediante síntesis a partir de información de secuencia conocida o predicha y puede incluir secuencias diseñadas para que presenten parámetros deseados.

40 La expresión "ácido nucleico" o "molécula de ácidos nucleicos" se refiere, p.ej., a ADN o ARN (p.ej., ARNm). Las moléculas de ácidos nucleicos pueden ser de doble cadena o monocatenarias; el ARN o ADN monocatenario puede ser la cadena codificante (de sentido) o la cadena no codificante (antisentido).

45 Las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención pueden aislarse o purificarse. Tal como se utiliza en la presente memoria, una molécula de ácidos nucleicos o secuencia de nucleótidos "aislada" se refiere a una molécula de ácidos nucleicos o secuencia de nucleótidos que no se encuentra flanqueada por secuencias de nucleótidos que normalmente flanquean la secuencia génica o de nucleótidos (tal como en secuencias genómicas) y, por lo tanto, pueden ser una molécula o secuencia de ácidos nucleicos recombinante y/o que ha sido completa o parcialmente extraída de su medio nativo (p.ej., una célula o un tejido). Por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos que han sido extraídas o purificadas a partir de células se consideran aisladas. En algunos casos, el material aislado forma parte de una composición (por ejemplo, un extracto en bruto que contiene otras sustancias), sistema tampón o mezcla de reactivos. En algunas realizaciones, las moléculas de ácidos nucleicos pueden purificarse hasta la práctica homogeneidad, por ejemplo según se determina mediante PAGE o cromatografía de columna, tal como HPLC. Una molécula de ácidos nucleicos o secuencia de nucleótidos aislada puede incluir una molécula de ácidos nucleicos o secuencia de nucleótidos que se sintetiza químicamente utilizando tecnología de DNA recombinante o utilizando cualquier otro método adecuado. Un ácido nucleico contenido en un vector también se incluye en la definición de "aislado" tal como se utiliza en la presente memoria. Los transcritos de ARN tanto in vivo como in vitro de una molécula de ADN aislada de la presente invención también se encuentran comprendidos en las secuencias de nucleótidos "aisladas".

60 La expresión "de codones optimizados" se refiere a cambios en los codones de una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína a los utilizados preferentemente en un organismo particular de manera que la proteína codificada se exprese eficientemente en el organismo de interés. En algunas realizaciones, una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína puede presentar codones optimizados para la producción óptima de la proteína de un organismo huésped. Tal como se utiliza en el contexto de la invención, un gen o molécula de ácidos nucleicos "de codones optimizados" de la invención no requiere que se altere todo codón para conformarse a la

preferencia de codones del organismo huésped deseado, ni se requiere que los codones alterados de un gen o molécula de ácidos nucleicos "de codones optimizados" sea modificada al codón más prevalente utilizado por el organismo de interés. Por ejemplo, un gen de codones optimizados puede cambios en uno o más codones a codones que son utilizados más frecuentemente que el codón o codones originales, se utilicen o no con la máxima frecuencia en el organismo para codificar un aminoácido particular.

La expresión "vector de expresión" o "constructo de expresión" se refiere a un ácido nucleico que ha sido generado mediante intervención humana, incluyendo por medios recombinantes y/o síntesis química directa, con una serie de "elementos de control de la expresión" de ácidos nucleicos especificados que permiten la transcripción y/o la traducción de un ácido nucleico particular en una célula huésped. El vector de expresión puede ser un plásmido, una parte de un plásmido, un constructo vírico, un fragmento de ácidos nucleicos o similar, o una combinación de los mismos.

Un "casete de expresión" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína o ARN funcional (p.ej. Un ARNt, un ARN de horquilla corta, uno o más microARN, un ARN ribosómico, etc.) operablemente ligado a elementos de control de la expresión, tales como un promotor, y opcionalmente, cualquiera o una combinación de otras secuencias de ácidos nucleicos que afectan a la transcripción o traducción del gen, tal como, aunque sin limitación, un terminador transcripcional, un sitio de unión ribosómica, una sitio de corte y empalme o una secuencia de reconocimiento de corte y empalme, un intrón, un intensificador, una señal de poliadenilación, un sitio interno de entrada ribosómica, etc. La expresión "ligamiento operable" o "ligado operablemente" se refiere a un ligamiento funcional entre dos secuencias de ácidos nucleicos, tal como una secuencia de control (tal como un promotor) y la secuencia ligada (tal como una secuencia que codifica una proteína y/o ARN funcional). Un promotor se encuentra en ligamiento operable con una secuencia de ácidos nucleicos en el caso de que medie en la transcripción del gen. Una secuencia de ácidos nucleicos derivada del genoma de un microorganismo huésped puede ligarse operablemente a una secuencia de ácidos nucleicos exógena respecto al microorganismo huésped, en el que la secuencia derivada del genoma puede promover la recombinación homóloga, resultando en la inserción de la secuencia de ácidos nucleicos exógena en el genoma del microorganismo huésped. Por ejemplo, una molécula de ácidos nucleicos de la invención puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos exógena al microorganismo huésped que codifica una proteína de interés, en la que la secuencia de ácidos nucleicos exógena se encuentra operablemente ligada a secuencias (por ejemplo, flanqueadas por secuencias) derivadas del microorganismo huésped que permiten la recombinación de la secuencia de ácidos nucleicos exógena en el genoma del huésped.

El término "operón", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una unidad de más de un gen bajo el control de una única señal reguladora o promotor. El gen puede transcribirse, p.ej., en una única molécula de ARNm.

Las "condiciones de astringencia" para la hibridación de secuencias de nucleótidos se refieren a las condiciones de incubación y lavado, p.ej. las condiciones de temperatura y la concentración del tampón, que permiten la hibridación de un ácido nucleico particular a un segundo ácido nucleico; el primer ácido nucleico puede ser perfectamente complementario (es decir, 100% complementario) respecto al segundo, o el primero y el segundo pueden compartir cierto grado de complementariedad, que es menos que perfecta, por ejemplo de 60%, 75%, 85%, 95% o superior. Por ejemplo, pueden utilizarse determinadas condiciones de alta astringencia para distinguir los ácidos nucleicos alta/perfectamente complementarios de los menos complementarios.

Las "condiciones de alta astringencia", las "condiciones de astringencia moderada" y las "condiciones de baja astringencia" para las hibridaciones de ácidos nucleicos se explican en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 2011. Las condiciones exactas que determinan la astringencia de la hibridación dependen no sólo de la fuerza iónica (p.ej., $0,2 \times$ SSC o $\sim 0,1 \times$ SSC, etc.) de los tampones de lavado, de la temperatura (p.ej., 23°C, 42°C, 68°C, etc.) y de la concentración de agentes desestabilizadores, tales como formamida o agentes desnaturizantes, tales como SDS, sino también de factores tales como la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos, la composición de bases, el porcentaje de no correspondencia entre secuencias hibridantes, la frecuencia de incidencia de subgrupos de dicha secuencia dentro de otras secuencias no idénticas. De esta manera, las condiciones de alta, moderada y baja astringencia pueden determinarse empíricamente.

Mediante la modificación de las condiciones de hibridación de un nivel de astringencia al que no se produce ninguna hibridación hasta el nivel al que se observa hibridación, pueden determinarse las condiciones que permiten que una secuencia dada se hibride con las secuencias más similares en la muestra.

Se describen condiciones ejemplares en Krause, Methods in Enzymology 200:546-556, 1991. El lavado es la etapa en la que se fijan habitualmente las condiciones que determinan un nivel mínimo de complementariedad de los híbridos. Generalmente, partiendo de la temperatura más baja a la que sólo se produce hibridación homóloga, cada grado (°C) por el que se reduce la temperatura final de lavado, mientras se mantiene la concentración de SSC constante, permite un incremento de aproximadamente 1% del grado máximo de no correspondencia entre las secuencias que se hibridan. Generalmente, la duplicación de la concentración de SSC puede resultar en un incremento de la Tm. Utilizando dichas directrices, puede determinarse la temperatura de lavado empíricamente para astringencia elevada, moderada o baja, dependiendo del nivel de no correspondencia buscado. Entre las

condiciones de alta astringencia ejemplares se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la hibridación en 50% de formamida, NaCl 1 M, SDS al 1% a aproximadamente 37°C y lavado en 0,1× SSC a aproximadamente 60°C. Entre las condiciones de astringencia progresivamente más alta se incluyen, tras la hibridación, el lavado con 0,2× SSC y SDS al 0,1% a aproximadamente temperatura ambiente (condiciones de baja astringencia); el lavado con 0,2× SSC y SDS al 0,1% a aproximadamente 42°C (condiciones de astringencia moderada) y el lavado con 0,1× SSC a aproximadamente 68°C (condiciones de alta astringencia). El lavado puede llevarse a cabo utilizando únicamente una de dichas condiciones, p.ej. bajo condiciones de alta astringencia, o el lavado puede comprender dos o más de las condiciones de astringencia con el fin de incrementar la astringencia. Las condiciones óptimas pueden variar dependiendo de la reacción de hibridación particular implicada y típicamente pueden determinarse empíricamente.

Pueden determinarse condiciones equivalentes mediante la modificación de uno o más de los parámetros proporcionados a título de ejemplo tal como es conocido de la técnica, manteniendo simultáneamente un grado similar de identidad o similitud entre la molécula de ácidos nucleicos diana y el cebador o sonda utilizado. Las secuencias de nucleótidos hibridables resultan útiles como sondas y cebadores para la identificación de organismos que comprenden un ácido nucleico de la invención y/o para aislar un ácido nucleico de la invención, por ejemplo.

Una molécula de ácidos nucleicos o secuencia de nucleótidos, o una proteína o secuencia polipeptídica, "purificada" se encuentra sustancialmente libre de material celular y componentes celulares. La molécula de ácidos nucleicos o proteína purificada puede encontrarse libre de compuestos químicos, más allá de tampón o solvente, por ejemplo. La expresión "sustancialmente libre" no pretende referirse a que otros componentes más allá de las nuevas moléculas de ácidos nucleicos son indetectables.

Una molécula de ácidos nucleicos "recombinante" o "manipulada" es una molécula de ácidos nucleicos que ha sido alterada mediante la manipulación humana. A modo de ejemplos no limitativos, una molécula de ácidos nucleicos recombinante es una molécula de ácidos nucleicos que: 1) ha sido sintetizada o modificada in vitro, por ejemplo utilizando técnicas químicas o enzimáticas (por ejemplo mediante la utilización de síntesis química de ácidos nucleicos o mediante la utilización de enzimas para la replicación, polimerización, digestión (exonucleolítica o endonucleolítica), ligación, transcripción inversa, transcripción, modificación de bases (incluyendo, p.ej., la metilación) o la recombinación (incluyendo la recombinación homóloga o específica de sitio) de moléculas de ácidos nucleicos; 2) incluye secuencias de nucleótidos unidas que no se encuentran unidas en la naturaleza; 3) ha sido manipulada utilizando técnicas de clonación molecular de manera que no presenta uno o más nucleótidos con respecto a la secuencia de la molécula de ácidos nucleicos natural, y/o 4) ha sido manipulada utilizando técnicas de clonación molecular de manera que presenta uno o más cambios de secuencia o reorganizaciones con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos natural. A modo de ejemplos no limitativos, un ADNc es una molécula de ADN recombinante, del mismo modo que cualquier molécula de ácidos nucleicos que ha sido generada por una o más reacciones in vitro de polimerasa, o a la que se han unido conectores, o que ha sido integrada en un vector, tal como un vector de clonación o vector de expresión.

En su aplicación a organismos, los términos recombinante, manipulado y genéticamente manipulado se refieren a organismos que han sido manipulados mediante la introducción de una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga o recombinante en el organismo, e incluye desactivaciones génicas, mutaciones dirigidas y sustitución de genes, sustitución, delección o inserción de promotores, sí como la introducción de transgenes en el organismo. La molécula de ácidos nucleicos heteróloga o recombinante puede integrarse en el genoma del organismo recombinante/manipulado genéticamente o, en otros casos, no integrada en el genoma del organismo recombinante/manipulado genéticamente.

La expresión "proteína recombinante" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una proteína producida mediante manipulación genética.

Las expresiones "natural" y "de tipo salvaje" se refieren a una forma que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, una molécula de ácidos nucleicos, secuencia de nucleótidos o proteína natural o de tipo salvaje, puede encontrarse presente en, aislada a partir de, una fuente natural y no ha sido modificada deliberadamente mediante manipulación humana.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "atenuado" se refiere a una reducción de la cantidad, grado, intensidad o fuerza. La expresión génica atenuada puede referirse a una cantidad y/o tasa de transcripción significativamente reducida del gen en cuestión o de la traducción, pliegue o ensamblaje de la proteína codificada. Un gen atenuado puede ser un gen interrumpido o delecionado que resulta en una producción indetectable de la proteína codificada.

La expresión "molécula exógena de ácidos nucleicos" o "gen exógeno" se refiere a una molécula de ácidos nucleicos o gen que ha sido introducido ("transformado") en una célula. Una célula transformada puede denominarse célula recombinante, en la que puede introducirse uno o más genes exógenos adicionales. Un descendiente de una célula que ha sido transformada con una molécula de ácidos nucleicos también se denomina "transformada" en el caso de que haya heredado la molécula exógena de ácidos nucleicos. El gen exógeno puede ser de una especie diferente (y por lo tanto es "heterólogo") o ser de la misma especie (y por lo tanto es "homólogo") respecto a la célula que se

transforma. Una molécula de ácidos nucleicos, gen o proteína "endógeno" es una molécula de ácidos nucleicos, gen o proteína nativa ya que se encuentra en, o es naturalmente producida por, el huésped.

El término "heterólogo" se utiliza ampliamente en dicho aspecto para referirse a moléculas de ácidos nucleicos o proteínas introducidas en una célula huésped, en las que las moléculas de ácidos nucleicos o proteínas se derivan de una cepa/organismo diferente. Un gen heterólogo puede presentar un equivalente en el huésped transformado, es decir, un gen que normalmente lleva a cabo la misma función o una función similar, o el gen heterólogo exógeno puede codificar una proteína que no presenta un homólogo endógeno en la cepa/organismo huésped. En referencia a una secuencia reguladora génica o a una secuencia de ácidos nucleicos auxiliar utilizada para el mantenimiento o la manipulación de una secuencia génica (p.ej. una región 5' no traducida, una región 3' no traducida, una secuencia de adición de poli-A, una secuencia de intrón, un sitio de corte y empalme, un sitio de unión ribosómica, una secuencia interna de entrada ribosómica, una región de homología del genoma, un sitio de recombinación, etc.), "heterólogo" se refiere a que la secuencia reguladora o secuencia auxiliar procede de una fuente diferente que la del gen respecto al que la secuencia de ácidos nucleicos reguladora o auxiliar es contigua en un constructo, genoma, cromosoma o episoma. De esta manera, un promotor operablemente ligado a un gen al que no se encuentra operablemente ligado en su estado natural (es decir, en el genoma de un organismo no manipulado genéticamente) en la presente memoria se denomina "promotor heterólogo", aunque el promotor puede derivar de la misma especie (o en algunos casos, del mismo organismo) a la que pertenece al gen al que se encuentra ligado.

El término "nativo" se utiliza en la presente memoria para referirse a secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de aminoácidos tal como se encuentran naturalmente en el huésped. La expresión "no nativo" se utiliza en la presente memoria para referirse a secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de aminoácidos que no se encuentran naturalmente en el huésped. Una secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de aminoácidos que ha sido extraída de una célula huésped, sometida a manipulación de laboratorio e introducida o reintroducida en una célula huésped se considera "no nativa". Los genes sintéticos o parcialmente sintéticos introducidos en una célula huésped son "no nativos". Entre los genes no nativos se incluyen además genes endógenos al microorganismo huésped operablemente ligados a una o más secuencias reguladoras heterólogas que han sido recombinadas en el genoma del huésped.

La expresión "composición de éster de cera" se refiere a una composición que comprende por lo menos una molécula de éster de cera. Entre los ésteres de cera se incluyen, p.ej., composiciones que comprenden únicamente moléculas de éster de cera (es decir, una composición que no contiene un derivado ácido graso diferente de las moléculas de éster de cera) y composiciones que comprenden ésteres de cera y por lo menos otro tipo de derivado de ácido graso seleccionado de entre, p.ej., alcoholes, aldehídos, alquenos, alquinos y alcanos. Los ésteres de cera pueden comprender únicamente un tipo de molécula de éster de cera o más de un tipo de molécula de éster de cera.

La expresión "composición de alcohol graso" se refiere a una composición que comprende por lo menos una molécula de alcohol graso. Entre las composiciones de alcohol graso se incluyen, p.ej., composiciones que comprenden únicamente moléculas de alcohol graso (es decir, una composición que no contiene un derivado de ácido graso diferente de las moléculas de alcohol graso) y composiciones que comprenden alcoholes grasos y por lo menos otro tipo de derivado de ácido graso seleccionado de entre, p.ej., aldehídos, ésteres, alquenos, alquinos y alcanos. Las composiciones de alcohol graso pueden comprender únicamente un tipo de molécula de alcohol graso o más de un tipo de molécula de alcohol graso.

Las expresiones "que libera" y "que secreta", tal como se utilizan en la presente memoria, se utilizan intercambiamente para referirse a mecanismos activos y/o pasivos de transporte de sustancias a través de la membrana celular. Entre los ejemplos de dichos mecanismos de transporte se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la difusión pasiva, la difusión en gradiente, la difusión facilitada, el transporte activo y las combinaciones de los mismos.

Los términos "recombinante", "manipulado" o "genéticamente manipulado" aplicados a las células huésped, se refieren a células que han sido manipuladas mediante la introducción de una secuencia de ácidos nucleicos no nativa (p.ej., heteróloga o recombinante) en la célula huésped, o la delección de una secuencia nativa de ácidos nucleicos de la célula huésped y entre ellos se incluyen, p.ej., desactivaciones génicas, mutaciones dirigidas y sustituciones génicas, sustituciones, delecciones o inserciones de promotor, así como la introducción de transgenes en la célula huésped. En algunas realizaciones, se integra una molécula introducida de ácidos nucleicos no nativa en el genoma del huésped recombinante/manipulado genéticamente. En otras realizaciones, se integra una molécula introducida de ácidos nucleicos no nativa en el genoma del huésped recombinante/manipulado genéticamente.

Los términos "transformación", "transfección", "conjugación" y "transducción", tal como se utilizan en el presente contexto, pretenden comprender una multiplicidad de métodos conocidos por el experto en la materia para la introducción de ácidos nucleicos foráneos (por ejemplo ADN exógeno) en una célula huésped, incluyendo la coprecipitación con fosfato de calcio y/o cloruro de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, la lipofección, la competencia natural, la transferencia mediada químicamente, la electroporación o el bombardeo con partículas, o similar, o combinaciones de los mismos. La transfección puede ser transitoria o estable (p.ej., integración genómica).

Pueden encontrarse ejemplos de métodos adecuados para la transformación y/o transfección de células huésped, p.ej., en *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010.

5 El término "cultivar" se refiere al fomento deliberado del crecimiento (p.ej. incrementos del tamaño celular, contenido celular y/o actividad celular, tal como la producción de moléculas biológicas) y/o propagación (p.ej. Incrementos del número celular mediante mitosis) de una o más células mediante la utilización de condiciones seleccionadas y/o controladas. La combinación de tanto crecimiento como propagación puede denominarse proliferación. Entre los ejemplos no limitativos de condiciones seleccionadas y/o controladas pueden incluirse la utilización de un medio definido (con características conocidas, tales como el pH, la fuerza iónica y/o la fuente de carbonos), una temperatura especificada, la tensión de oxígeno, los niveles de dióxido de carbono, el crecimiento en un biorreactor o similar, o combinaciones de los mismos.

15 El término "biorreactor" se refiere a un recipiente o recipiente parcial en el que se cultivan células (p.ej., células microalgales), opcionalmente en suspensión y, al suspenderlas, preferentemente en un líquido acuoso. El biorreactor puede utilizarse para cultivar células a través de las diversas etapas de su ciclo fisiológico.

Rutas metabólicas

20 La ruta de biosíntesis de ácidos grasos está altamente conservada en los procariotas y en los cloroplastos de las algas eucarióticas y plantas superiores. La fig. 9 ilustra la ruta de biosíntesis de ácidos grasos en bacterias, partiendo del metabolito central acetil-CoA. La biosíntesis de los ácidos grasos se inicia mediante la conversión del acetil-CoA en malonil-CoA, catalizada por la acetil-CoA carboxilasa (ACCase). A continuación, la malonil-CoA es convertida en malonil-ACP catalizada por la malonil-CoA-ACP transacilasa (FabD). Finalmente, la malonil-ACP es convertida en acil-ACP, catalizada por el complejo enzimático ácido graso sintasa (FAS, por sus siglas en inglés). El complejo ácido graso sintasa inicia el ciclo de elongación condensando en primer lugar malonil-ACP con acetil-ACP catalizado por una beta-cetoacil-ACP sintasa III (p.ej., FabH). El β -cetoacil-ACP (3-cetoacil-ACP) formado por las reacciones de FabH es reducido a β -hidroxiacil-ACP (3-hidroxiacil-ACP) por la 3-cetoacil-ACP reductasa (p.ej. FabG). A continuación, sobre β -hidroxiacil-ACP actúa una β -hidroxiacil-ACP deshidratasa (p.ej., FabA, FabZ) para formar trans-2-enoil-ACP, que a su vez es reducido por la enoil-ACP reductasa (p.ej. Fab I, Fab K y FabL) para formar el producto acil-ACP elongado en 2 carbonos. Los ciclos siguientes son iniciados por una condensación catalizada por beta-cetoacil-ACP sintasa I o II (p.ej., FabB o FabF) de malonil-ACP con un acil-ACP. Los ciclos de condensación, reducción, deshidratación y reducción se repiten, añadiendo cada ciclo dos carbonos de malonil-ACP hasta el corte de la cadena acilo de ACP por una tioesterasa, tal como FatA o FatB en los cloroplastos, formando un ácido graso libre o la transferencia a otra molécula (p.ej., glicerol-3-fosfato) por una transacilasa.

35 Al contrario que los cloroplastos vegetales, las cianobacterias no producen ácidos grasos libres y, al contrario que *E. coli* y otras bacterias heterótroficas, las cianobacterias no producen acil-CoA. Tras la elongación de ácido graso con la cadena acilo unida covalentemente a la proteína portadora de acilos, las acil transferasas pueden transferir la cadena acilo a un esqueleto glicerol para producir lípidos membranales.

40 Para producir derivados de ácidos grasos, tales como ésteres de cera en cianobacterias, típicamente se considera necesario introducir varios genes exógenos codificantes de enzimas para producir acil-CoA y la conversión del acil-CoA en el producto final deseado (p.ej., un alcohol, aldehído, alcano, alqueno, éster de ácido graso o éster de cera). Tal como se ilustra en la fig. 9, puede introducirse un gen codificante de una tioesterasa (p.ej., acil-ACP tioesterasa, 3.1.2.20) para hidrolizar el acil-ACP tioéster, liberando de esta manera el ácido graso libre. Puede introducirse un gen de acil-CoA sintetasa (p.ej., 6.2.1.3) para convertir los ácidos grasos libres en acil-CoA.

50 En el caso de que el producto final deseado sean aldehídos grasos y/o alcanos, puede introducirse un gen codificante de una aldehído graso reductasa formador de aldehído (p.ej., la acil-CoA reductasa formadora de aldehído 1.2.1.42 o 1.2.1.50; ver también la patente US nº 6.143.538) para reducir el acil-CoA a aldehídos grasos; adicional o alternativamente, puede introducirse un gen de ácido carboxílico reductasa (ver, p.ej., los documentos nº WO 20107135624 y nº WO 2010/042664) para reducir los ácidos grasos libres a aldehídos grasos. Además, puede introducirse uno o más genes codificantes de una alcohol graso oxidasa (p.ej. 1.1.3.20) o una alcohol graso deshidrogenasa (p.ej., 1.1.1.164) para convertir los alcoholes grasos en aldehídos grasos. Los aldehídos grasos pueden procesarse adicionalmente en alcanos con la introducción de un gen codificante de una aldehído graso descarboxilasa (p.ej., 4.1.99.5).

60 En el caso de que el producto final deseado sean alcoholes grasos, alquenos y/o ésteres de cera, puede introducirse un gen codificante de una acilo graso reductasa formadora de alcohol (p.ej. la acil-CoA reductasa formadora de alcohol 1.2.1.50). Además, puede introducirse un gen de aldehído graso reductasa para reducir los aldehídos grasos en alcoholes grasos. Los alcoholes grasos pueden procesarse adicionalmente en alquenos con la introducción de un gen codificante de una alcohol graso deshidratasa y/o con la deshidratación catalítica. Pueden formarse ésteres de cera mediante la introducción de un gen codificante de una éster de cera sintasa para catalizar la condensación de un alcohol graso con un acil-tioéster graso (fig. 9).

65

Tal como se demuestra en la presente memoria, determinados enzimas son capaces de convertir acil-ACP directamente en un derivado ácido graso. Por ejemplo, tal como se da a conocer en la solicitud de patente US comúnmente concedida nº 61/539.640, titulada "Fatty Alcohol Forming Acyl-ACP Reductases", presentada el 27 de septiembre de 2011, determinadas acil-ACP reductasas, tales como, p.ej., la acil-ACP reductasa Maqu_2220 acyl-ACP y la acil-ACP reductasa Hch_05075 pueden convertir acil-ACP directamente en alcoholes grasos. Dichos enzimas se denominan en la presente memoria "acil-ACP reductasas formadoras de alcohol". Además, tal como muestra la presente invención, ahora se ha encontrado que determinadas sintasas de éster de cera, p.ej., WS1 y WS2 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* son capaces de condensar acil-ACP con alcoholes grasos para producir ésteres de cera. De esta manera, la presente invención proporciona un nuevo método de producción de ésteres de cera en una ruta libre de acil-CoA que requiere únicamente dos enzimas exógenos: una acil-ACP reductasa formadora de alcohol y una acil-ACP sintasa de éster de cera.

En algunas realizaciones, la conversión de acil-ACP en alcohol graso puede producirse mediante la síntesis de un aldehído graso, en el que la reductasa formadora de aldehído graso (p.ej., una acil-ACP reductasas formadora de aldehído) expresada en la célula huésped en primer lugar reduce acil-ACP en un aldehído graso. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la célula huésped puede manipularse para sobreexpresar una acil-ACP reductasa formadora de aldehído graso endógena (p.ej. mediante la inserción de elementos de control transcripcional promotor y/o intensificador en proximidad al gen de la acil reductasa). En otras realizaciones, la célula huésped puede manipularse para expresar una acil reductasa formadora de aldehído graso exógena.

Sintasas de éster de cera

Se han encontrado diversos polipéptidos identificados o caracterizados como aciltransferasas, incluyendo acilo graso transferasas, alcohol aciltransferasas (AAT, EC 2.3.1.84), alcohol sintasa/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasas, diacilglicerol O-aciltransferasas o diacilglicerol aciltransferasas (DGAT, EC 2.3.1.20), O-aciltransferasas (p.ej., alcohol de cadena larga O-acilo graso transacilasas (EC 2.3.1.75) o acil-CoA:alcohol aciltransferasas, O-aciltransferasas unidas a membrana (MBOAT)), acil-CoA cera alcohol aciltransferasas y éster de cera sintasa/acil-CoA aciltransferasas bifuncionales, que presentan actividad de sintasa de éster de cera y se denominan en la presente memoria sintasas de cera o éster de cera sintasas. Una acil-ACP sintasa de éster de cera puede producir un éster de ácido graso, tal como un éster de cera utilizando aci-ACP como donante de acilos mediante la catálisis de una reacción del acil-ACP con un alcohol, por ejemplo, un alcohol graso.

Las éster de cera sintasas pueden someterse a ensayo, por ejemplo, utilizando métodos de la técnica o dados a conocer en la presente memoria, para la capacidad de utilizar acil-ACP como sustrato. En algunos ejemplos, las sintasas de éster de cera que pueden utilizar sustratos acil-ACP pueden identificarse como presentando el dominio Pfam "acil-CoA aciltransferasa de tipo éster de cera sintasa" PF03007, en el que la puntuación de bit de una correspondencia con el dominio es superior al corte de inclusión de 20,6 y opcionalmente también puede presentar la "proteína de función desconocida DUF1298" dominio Pfam PF06974, en el que la puntuación de alineación ('bit score') de una correspondencia es de por lo menos 20,7 (el umbral de inclusión en la alineación para PF06974). Las éster de cera sintasas que utilizan acil-ACP también pueden identificarse basándose en una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos, p.ej., 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a WS1 (SEC ID nº 19) o WS2 (SEC ID nº 21) de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. Por ejemplo, una célula huésped, tal como, por ejemplo, un microorganismo transgénico, puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de por lo menos 85% respecto a WS1 (SEC ID nº 19). En algunos ejemplos, una célula huésped puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de por lo menos 90% o de por lo menos 95% respecto a WS1 (SEC ID nº 19). Por ejemplo, una célula huésped puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de la acil-ACP sintasa de éster de cera de SEC ID nº 19. Alternativamente, una célula huésped, tal como un microorganismo transgénico, puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de por lo menos 85% respecto a WS2 (SEC ID nº 21). Por ejemplo, una célula huésped puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de por lo menos 90% o de por lo menos 95% respecto a WS2 (SEC ID nº 21). Por ejemplo, una célula huésped puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de la acil-ACP sintasa de éster de cera de SEC ID nº 21.

Las secuencias de aminoácidos que presentan menores grados de identidad pero actividad biológica comparable (es decir, comparable a la actividad biológica de las proteínas acil-ACP sintasa de éster de cera indicadas en la presente memoria) se consideran equivalentes. Los métodos de demostración y medición de la actividad de una acil-ACP sintasa de éster de cera pueden utilizar ensayos conocidos (p.ej., las patentes US nº 6.492.509, US nº 7.118.896 y US nº 7.897.369) en los que puede sustituirse acil-ACP por un sustrato acil-CoA, o pueden ser ensayos que detectan los ésteres de cera producidos por células o lisados de células que expresan una acil-ACP sintasa de cera putativa, en la que las células no producen y/o no están provistas de un sustrato acil-CoA (p.ej., la medición de tasas/niveles de producción de éster de cera utilizando, p.ej., cromatografía de gases-espectrometría de masas, cromatografía líquida-espectrometría de masas, cromatografía de capa fina, etc.).

Una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la SEC ID nº 18 o respecto a una parte de la SEC ID nº 18 que codifica un fragmento funcional de una éster de cera sintasa. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos 80%, de por lo menos aproximadamente 85%, de por lo menos aproximadamente 90% o de por lo menos aproximadamente 95% respecto a la SEC ID nº 18. Alternativamente, una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la SEC ID nº 20 o respecto a una parte de la SEC ID nº 20 que codifica un fragmento funcional de una éster de cera sintasa. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos 80%, de por lo menos aproximadamente 85%, de por lo menos aproximadamente 90% o de por lo menos aproximadamente 95% respecto a la SEC ID nº 20.

En algunas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos no nativa codifica una secuencia de ácidos nucleicos de una acil-ACP sintasa de éster de cera de una bacteria marina, es decir, una bacteria que se encuentra naturalmente en un medio marino. En determinadas realizaciones, la bacteria marina es una especie de *Marinobacter*, p.ej., *M. algicola*, *M. alkaliphilus*, *M. aquaeolei*, *M. adhaerens*, *M. arcticus*, *M. bryozoorum*, *M. daepoensis*, *M. excellens*, *M. flavimaris*, *M. guadonensis*, *M. hydrocarbonoclasticus*, *M. koreensis*, *M. lipolyticus*, *M. litoralis*, *M. lutaoensis*, *M. maritimus*, *M. sediminum*, *M. sp. ELB17*, *M. squalenivirans*, *M. vinifirmus*, etc. En otras realizaciones, la acil-ACP sintasa de éster de cera se deriva de una bacteria marina, tal como una especie de *Acinetobacter*, *Alcanivorax* (p.ej., *A. borkumensis* o *Alcanivorax sp. DG881*), *gammaproteobacteria* (p.ej., UPF0089), *Hahella chejuensis* (p.ej., 3839139), or *Limnobacter* (p.ej., sp. MED105AT).

En algunas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos no nativa codifica una ACIL-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% r respecto a una éster de cera sintasa putativa seleccionada de entre las siguientes:

Tabla 1. Genes microbianos de éster de cera sintasa

Especie de origen	GenBank nº de acceso	SEC ID nº
<i>Marinobacter aquaeolei</i> 0168	YP957462	23
<i>Marinobacter adhaerens</i> AT	ADP99639	25
<i>Alcanivorax borkumensis</i> AT 4213840	CAL18190	27
<i>Gammaproteobacteria</i> UPF0089	CBL44765	29
<i>Hahella chejuensis</i> 3839139	ABC31703	31
<i>Alcanivorax sp. DG881</i> AT	EDX89052	33
<i>Limnobacter sp. MED105</i> AT	EDM84445	35
<i>Marinobacter aquaeolei</i> 3067	YP_960328	37
<i>Marinobacter adhaerens</i> AT	ADP98710	39
<i>Marinobacter algicola</i> AT	EDM48092	41
<i>Marinobacter sp. ELB17</i>	EBA00388	43

Por ejemplo, un gen no nativo puede codificar una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 85%, de por lo menos 90% o de por lo menos 95% respecto a la SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43. Por ejemplo, una célula huésped, tal como, por ejemplo, un microorganismo transgénico, puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43.

En algunas realizaciones, una proteína con actividad de acil-ACP sintasa de éster de cera adicionalmente puede presentar otra actividad de éster de cera sintasa, p.ej. actividad de acil-CoA sintasa de éster de cera. Entre las proteínas con actividad de éster de cera sintasa pueden evaluarse para actividad de acil-ACP sintasa pueden incluirse, aunque sin limitarse a ellas, éster de cera sintasa de *Acinetobacter sp. M-1*, *A. calcoaceticus* WS/DGAT, éster de cera sintasa de *Acinetobacter baylyi* ADP1, éster de cera de joba sintasa, éster de cera sintasa de *Euglena gracilis*, éster de cera sintasa de *Micrococcus*, éster de cera sintasa de *Rhodococcus*, éster de cera sintasa de *Mycobacterium*, éster de cera sintasa de *Arabidopsis thaliana* WSD1, aciltransferasa GPAT de *Arabidopsis thaliana*, éster de cera sintasa de *Murraya koenigii*, éster de cera sintasa de *M. tuberculosis*, éster de cera sintasa de *M. smegmatis*, éster de cera sintasas de insecto y de mamífero, etc.

50 Acil-ACP reductasas

Las acil-ACP reductasas pueden utilizar acil-ACP directamente como sustrato para producir alcoholes grasos (ver la solicitud de patente US de titularidad compartida nº 61/539.640, titulada "Fatty Alcohol Forming Acyl-ACP

Reductases", presentada el 27 de septiembre de 2011). En algunas realizaciones, una acil-ACP reductasa formadora de alcohol útil en los métodos de la invención se identifica basándose en la identidad de secuencia de por lo menos, p.ej., 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a Maqu_2220 (SEC ID nº 2), Hch_05075 (SEC ID nº 4), MDG893_11561 (SEC ID nº 6), HP15_810 (SEC ID nº 8) o RED65_09894 (SEC ID nº 10). Por ejemplo, una célula huésped recombinante puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP reductasa que presenta una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 85% o de por lo menos 90% respecto a Maqu_2220 (SEC ID nº 2), por ejemplo una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 95% respecto a Maqu_2220 (SEC ID nº 2). Por ejemplo, una célula huésped recombinante puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica Maqu_2220 (SEC ID nº 2). Alternativamente, una célula huésped recombinante puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP reductasa que presenta una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 85% o de por lo menos 90% respecto a Hch_05075 (SEC ID nº 4), por ejemplo una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 95% respecto a Hch_05075 (SEC ID nº 4). Por ejemplo, una célula huésped recombinante puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica Hch_05075 (SEC ID nº 4). En alternativas adicionales, una célula huésped recombinante puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP reductasa que presenta una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 85% o de por lo menos 90% respecto a MDG893_11561 (SEC ID nº 6), HP15_810 (SEC ID nº 8) o RED65_09894 (SEC ID nº 10), por ejemplo una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 95% respecto a MDG893_11561 (SEC ID nº 6), HP15_810 (SEC ID nº 8) o RED65_09894 (SEC ID nº 10). Por ejemplo, una célula huésped recombinante puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica MDG893_11561 (SEC ID nº 6), HP15_810 (SEC ID nº 8) o RED65_09894 (SEC ID nº 10).

Las secuencias de aminoácidos con menos grados de identidad pero comparable actividad biológica (es decir, comparable con la actividad biológica de las proteínas acil-ACP reductasas formadoras de alcohol indicadas en la presente memoria) se consideran equivalentes. Los métodos de demostrar y medir la actividad de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol puede utilizar ensayos conocidos (p.ej., las patentes US nº 5.403.918, nº 5.723.747 y nº 6.143.538), en las que acil-ACP puede ser sustituido por un sustrato acil-Coa o puede detectar los alcoholes grasos producidos por células o lisados de células que expresan una acil-ACP reductasa formadora de alcohol putativa, en la que las células no producen y/o no se les proporciona un sustrato acil-CoA (p.ej., medición de las tasas/niveles de producción de alcohol graso utilizando, p.ej. cromatografía de gases-espectrometría de masas, cromatografía líquida-espectrometría de masas, cromatografía iónica-espectrometría de masas, detección amperométrica pulsada, espectroscopía de UV/VIS, etc.; ensayos espectrofotométricos para monitorizar las tasas de reducción de sustrato, etc.).

En algunas realizaciones, la acil-ACP reductasa formadora de alcohol se encuentra codificada por una molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a una secuencia correspondiente de ácidos nucleicos codificante de reductasa formadora de alcohol de *Marinobacter aquaeolei* (p.ej., SEC ID nº 2), *Hahella chejuensis* (p.ej., SEC ID nº 4), *Marinobacter algicola* (p.ej., SEC ID nº 6), *Marinobacter adhaerens* (p.ej., SEC ID nº 8), o una especie de *Oceanobacter* (p.ej., SEC ID nº 10).

En algunas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a una acil-ACP reductasa formadora de alcohol correspondiente de una bacteria marina, es decir, una bacteria que se encuentra naturalmente en un medio marino. En determinadas realizaciones, la bacteria marina es una especie de *Marinobacter*, p.ej., *M. algicola*, *M. alkaliphilus*, *M. aquaeolei*, *M. adhaerens*, *M. arcticus*, *M. bryozoorum*, *M. daepoensis*, *M. excellens*, *M. flavimaris*, *M. guadonensis*, *M. hydrocarbonoclasticus*, *M. koreenis*, *M. lipolyticus*, *M. litoralis*, *M. lutaoensis*, *M. maritimus*, *M. sediminum*, *M. sp. ELB17*, *M. squalenivirans*, *M. vinifirmus*, etc. En determinadas realizaciones, la bacteria marina es una especie de, p.ej., *Meptuniibacter caesariensis sp. cepa MED92*, *Reinekea sp. cepa MED297*, *Marinomonas sp. cepa MED121*, *Marinobacter sp. cepa ELB17* o la cepa no nombrada de gammaproteobacteria HTCC2207. En determinadas realizaciones, la bacteria marina es del orden *Oceanospirilliales*, p.ej. la familia *Oceanospirillaceae*, p.ej., el género *Oceanobacter*, p.ej., la especie *Oceanobacter sp. cepa RED65*, *Oceanobacter kriegii* o *Oceanobacter sp. cepa WH099*.

En algunas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a una acil-ACP reductasa formadora de alcohol correspondiente de un organismo, tal como *Vitis vinifera* (GenBank nº de acceso CAO22305.1 o CAO67776.1), *Desulfatibacillum alkenivorans* (GenBank nº de acceso NZ_ABI101000018.1), *Stigmatella aurantiaca* (NZ_AAMD01000005.1), *Phytophthora ramorum* (GenBank nº de acceso AAQXOIOOI 105.1), *Simmondsia chinensis* (jojoba), *Acinetobacter calcoaceticus*, etc.

En algunas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a FARJVlac (de la cepa de actinobacteria marina PHSC20C1), FARJVC (JCVI_ORF_1096697648832, GenBank nº de acceso EDD40059.1; de un metagenoma marino), FAR_Fer (JCVI_SCAF_1101670217388; de una bacteria marina observada a una profundidad de 12 m en una corriente ascendente en la zona de la isla Fernandina, Islas Galápagos, Ecuador), FAR Key (JCVI_SCAF_1097205236585, de una bacteria marina observada a una profundidad de 1,7 m frente a la costa de Key West Florida) y FAR_Gal (JCVI_SCAF_1101670289386, a una profundidad de 0,1 m en la isla Isabella, Islas Galápagos, Ecuador).

En algunas realizaciones, una proteína que es conocido o que se sospecha que presenta actividad de FAR, p.ej., actividad de acil-CoA reductasa formadora de alcohol, se encuentra que adicional o alternativamente presenta actividad de acil-ACP reductasa formadora de alcohol. Entre las proteínas que es conocido o que se sospecha que presentan actividad de FAR se incluyen, aunque sin limitación, Maqu_2220 (SEC ID nº 2), Hch_05075 (SEC ID nº 4), MDG893_11561 (SEC ID nº 6), HP15_810 (SEC ID nº 8) o RED65_09894 (SEC ID nº 10), y entre ellas pueden incluirse además, por ejemplo, bfar de *Bombyx mori*, jifar de *Simmondsia chinensis*, una acil-CoA reductasa de *Triticum aestivum*, mfar1 de *Mus musculus*, mfar2 de *Mus musculus*, hfar de *H. sapiens*, FARXIII de *Ostrinia scapulalis*, MS2 de *Z. mays*, o MS2, FAR4₃ FAR6, CER4 de *Arabidopsis thaliana*, etc.

Las sintasas de éster de cera anteriormente indicadas y acil-ACP reductasas formadoras de alcohol, y los ácidos nucleicos codificantes de las mismas, pueden utilizarse en cualquiera de los métodos de producción de éster de cera indicados en la presente memoria.

Métodos de producción de un éster de cera

La invención proporciona métodos independientes de acil-CoA para producir un éster de ácido graso en una célula huésped recombinante, p.ej., cualquiera de las células huésped recombinantes indicadas en la presente memoria. Por ejemplo, una célula huésped recombinante utilizada en los métodos proporcionados en la presente memoria comprende una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una sintasa de éster de cera capaz de producir un éster de cera en una ruta independiente de acil-CoA con la expresión en la célula huésped (p.ej., una acil-ACP sintasa de éster de cera). Adicionalmente, una célula huésped recombinante puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol. Por ejemplo, la célula huésped recombinante puede comprender cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos y/o vectores aislados que se indican en la presente memoria. El método puede comprender las etapas de: cultivar una célula huésped recombinante que comprende una molécula de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de cera en un medio de cultivo adecuado, y permitir la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos no nativa, en la que la expresión resulta en la producción de un éster de ácidos grasos o un éster de cera.

En Dichos métodos, el método de cultivo puede incluir opcionalmente un alcohol, tal como uno o más alcoholes de cadena corta que presentan uno a cinco carbonos, tales como, por ejemplo, uno o más de entre metanol, etanol, propanol, butanol, isobutanol, 2-metilbutanol o 3-metilbutanol, o uno o más alcoholes grasos, por ejemplo, uno o más alcoholes grasos con longitudes de cadena de entre 6 y 24 carbonos. Alternativamente, el medio de cultivo no incluye un alcohol y la célula huésped recombinante, que puede ser, por ejemplo, un microorganismo recombinante, puede producir un alcohol de cadena corta, tal como, por ejemplo, un alcohol C2, C3, C4 o C5, por ejemplo, etanol, propanol, butanol, isobutanol, 2-metilbutanol, 3-metilbutanol o pentanol. La sintasa de cera puede catalizar la condensación del alcohol de cadena corta producido por el microorganismo recombinante con acil-ACP producido por el microorganismo.

En ejemplos adicionales, el método comprende las etapas de: cultivar una célula huésped recombinante en un medio de cultivo adecuado, en el que la célula huésped recombinante comprende una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que produce una acil-ACP sintasa de éster de cera con la expresión en la célula huésped y una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que produce una acil-ACP reductasa formadora de alcohol con la expresión en la célula huésped, y permitir la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos, en la que la expresión resulta en la producción de un éster de cera.

El medio adecuado en dichos métodos puede ser un medio que no incluye un alcohol, por ejemplo no incluye un alcohol de cadena corta o un alcohol graso que puede utilizarse como sustrato por la acil-ACP sintasa de éster de cera y las células huésped recombinantes pueden producir tanto la cadena A como la cadena B del éster de cera.

La acil-ACP reductasa formadora de alcohol y la acil-ACP sintasa de éster de cera producidas por un microorganismo recombinante en los métodos para producir ésteres de cera son capaces de utilizar acil-ACP como sustrato en lugar de, o además de, acil-CoA. La célula huésped recombinante utilizada en los métodos puede ser una célula huésped que no incluye un gen exógeno codificante de una acil-CoA sintetasa. Adicionalmente, la célula huésped recombinante utilizada en los métodos puede presentar una expresión atenuada de un gen endógeno de acil-CoA.

Por ejemplo, la producción de un gen de acil-CoA sintetasa puede atenuarse o eliminarse mediante uno o cualquier combinación de: disrupción génica mediante recombinación homóloga utilizando constructos con genes desactivados con diana génica, constructos antisentido, constructos de ARNi, ARNhp o la expresión de microARN. En algunas realizaciones, la célula huésped puede presentar un gen de acil-CoA sintetasa atenuado o mutado, de manera que el enzima está inactivo o menos activo, no es producido sustancialmente o no es producido en absoluto.

La célula huésped recombinante puede ser una célula que no produce una acil-CoA sintetasa. En algunos ejemplos, las células huésped recombinantes no producen acil-CoA. Por ejemplo, la célula huésped recombinante puede ser una célula huésped que produce endógenamente acil-CoA pero que es manipulada para eliminar la producción de acil-CoA, por ejemplo mediante desplazamiento o disrupción génica utilizando la recombinación homóloga. Alternativamente, las células huésped recombinantes pueden no presentar un gen de acil-CoA sintetasa endógeno. Por ejemplo, el huésped recombinante puede ser una especie cianobacteriana, ya que las especies cianobacterianas no presentan genes de acil-CoA sintetasa (Kaczmarzyk y Fulda, *Plant Physiol.* 152: 1598-1610, 2010) y no producen acil-CoA.

Además de cualquiera de los ejemplos anteriormente proporcionados, la célula huésped recombinante puede ser una célula que no incluye un gen exógeno codificante de una acil-ACP tioesterasa o un gen exógeno codificante de una acil-CoA tioesterasa. Por ejemplo, la célula huésped recombinante puede no presentar tanto un gen exógeno de acil-ACP tioesterasa como un gen exógeno de acil-CoA tioesterasa. Adicionalmente, la célula huésped puede ser una célula que no incluye un gen endógeno codificante de una acil-ACP tioesterasa o un gen endógeno codificante de una acil-CoA tioesterasa y, en realizaciones particulares, el microorganismo huésped puede no presentar tanto un gen endógeno de acil-ACP tioesterasa como un gen endógeno de acil-CoA tioesterasa; por ejemplo, el microorganismo huésped puede ser una cianobacteria. En realizaciones alternativas, la célula huésped puede presentar un gen de acil-ACP tioesterasa atenuado y/o un gen de acil-CoA tioesterasa atenuado, de manera que uno o ambas enzimas se producen a un nivel reducido, no se producen sustancialmente o no se producen en absoluto.

La célula huésped recombinante en algunos ejemplos puede ser una célula huésped recombinante que no expresa, p.ej., una acil-ACP tioesterasa, una acil-CoA tioesterasa y una acil-CoA sintetasa. Por ejemplo, la célula huésped recombinante puede no presentar una secuencia de ácidos nucleicos exógeno codificante de una acil-ACP tioesterasa, una secuencia de ácidos nucleicos exógena codificante de una acil-CoA tioesterasa y una secuencia de ácidos nucleicos exógeno codificante de una acil-CoA sintetasa. Adicionalmente, la célula huésped recombinante puede ser un microorganismo huésped que no incluye un gen endógeno para cualquiera de entre una acil-ACP tioesterasa, una acil-CoA tioesterasa o una acil-CoA sintetasa. Por ejemplo, la célula huésped recombinante puede ser una cianobacteria que naturalmente no presenta genes para acil-ACP tioesterasa, una acil-CoA tioesterasa o una acil-CoA sintetasa.

Las células huésped recombinantes utilizadas en los métodos de la invención puede comprender cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera y cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, tal como se indica en la presente memoria.

Por ejemplo, una acil-ACP sintasa de éster de cera expresada por una célula huésped recombinante puede comprender o consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto al polipéptido de SEC ID nº 19 o 21, o a un fragmento funcional del polipéptido. En algunos ejemplos, las células huésped recombinantes utilizadas en los métodos de la invención pueden comprender una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de por lo menos 85% o de por lo menos 90% respecto a la SEC ID nº 19. Alternativamente, las células huésped recombinantes utilizadas en los métodos de la invención pueden comprender una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de por lo menos 85% o de por lo menos 90% respecto a la SEC ID nº 21. Por ejemplo, un microorganismo recombinante utilizado en los métodos puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de la SEC ID nº 18 o SEC ID nº 20. Alternativa o adicionalmente, un microorganismo recombinante utilizado en los métodos puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la SEC ID nº 18 o SEC ID nº 20 o a un fragmento de la secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento funcional de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol. Por ejemplo, el microorganismo recombinante puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 85% o 90% respecto a la SEC ID nº 18. Por ejemplo, el microorganismo recombinante puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 85% o 90% respecto a la SEC ID nº 20. En determinadas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 18 o SEC ID nº 20.

Alternativamente, una cepa huésped que produce ésteres de cera puede incluir un gen no nativo codificante de un acil-ACP éster de cera derivado de *Marinobacter aquaeolei* (p.ej., SEC ID nº 23, SEC ID nº 37), *Marinobacter adhaerens* (p.ej., SEC ID nº 25, SEC ID nº 39), *Marinobacter algicola* (p.ej., SEC ID nº 41), *Marinobacter* sp. ELB17 (p.ej., SEC ID nº 43), *Alcanivorax borkumensis* (p.ej., SEC ID nº 27), *gammaproteobacteria* UPF0089 (p.ej., SEC ID nº 29), *Hahella chejuensis* (p.ej., SEC ID nº 31), *Alcanivorax* sp. DG881 (p.ej., SEC ID nº 33) o *Limnobacter* sp. MED105 (p.ej., SEC ID nº 35) o codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a cualquiera de dichas sintasas de cera. Por ejemplo, una cepa huésped utilizada en los métodos para producir ésteres de cera puede incluir un gen no nativo codificante de una acil-ACP éster de cera que presenta una identidad de por lo menos aproximadamente 85%, de por lo menos aproximadamente 90% o de por lo menos aproximadamente 95% respecto a cualquiera de dichas sintasas de cera.

Adicionalmente, la acil-ACP reductasa formadora de alcohol expresada por la célula huésped puede comprender o consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto al polipéptido de SEC ID nº 2, 4, 6, 8, 10 o 12, o a un fragmento funcional del polipéptido. Por ejemplo, la acil-ACP reductasa formadora de alcohol expresada por la célula huésped puede comprender o consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 85% o de aproximadamente 90% respecto al polipéptido de SEC ID nº 2. Alternativamente, la acil-ACP reductasa formadora de alcohol expresada por la célula huésped puede comprender o consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 85% o de aproximadamente 90% respecto al polipéptido de SEC ID nº 4. Por ejemplo, la acil-ACP reductasa formadora de alcohol comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2, 4, 6, 8, 10 o 12. La acil-ACP reductasa formadora de alcohol puede encontrarse codificada por una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 1, 3, 5, 7, 9 o 11 o a un fragmento de la secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento funcional de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol. Por ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos puede comprender la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 1, 3, 5, 7, 9 o 11.

Adicionalmente, en donde una cepa huésped incluye un gen no nativo codificante de una acil-ACP sintasa de cera y un gen no nativo que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, una o ambas secuencias de ácidos nucleicos pueden integrarse en un cromosoma de la célula huésped recombinante y opcionalmente pueden ligarse operablemente a un promotor y/o intensificador (p.ej. un promotor endógeno y/o intensificador o un promotor y/o intensificador heterólogo), que en algunas realizaciones puede ser regulable. Alternativa o adicionalmente, una o ambas secuencias de ácidos nucleicos se encuentran presentes en un vector en la célula huésped recombinante y opcionalmente pueden ligarse operablemente a un promotor y/o intensificador (p.ej. un promotor y/o intensificador heterólogo), que en algunas realizaciones puede ser regulable. En determinadas realizaciones, el promotor y/o intensificador son inducibles y el método puede comprender además la etapa de inducir la expresión de la acil-ACP sintasa de éster de cera y/o la acil-ACP reductasa formadora de alcohol. La secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP sintasa de éster de cera y la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol pueden encontrarse en el mismo vector o en vectores separados. La secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP sintasa de éster de cera y la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol pueden opcionalmente ligarse operablemente al mismo promotor. Alternativamente, la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP sintasa de éster de cera y la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol pueden ligarse operablemente a promotor separados.

La secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP sintasa de éster de cera y/o la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol pueden ser heterólogos respecto a la célula huésped recombinante. La secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP sintasa de éster de cera y/o la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol pueden opcionalmente optimizarse para sus codones para la expresión en la célula huésped recombinante (p.ej. cualquiera de las especies anteriores de cianobacterias o microalgas eucarióticas).

La célula huésped recombinante utilizada en los métodos puede ser cualquier célula huésped recombinante indicada en la presente memoria. La célula huésped recombinante puede ser, por ejemplo, un microorganismo fotosintético. Opcional aunque preferentemente, un microorganismo fotosintético recombinante puede cultivarse fotoautóticamente para la producción de ésteres de cera. La célula huésped recombinante puede ser, en algunos ejemplos, una cianobacteria. En ejemplos particulares, la cianobacteria se selecciona de entre una lista que incluye, aunque sin limitación, las especies *Agmenellum*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Anacystis*, *Aphanizomenon*, *Arthrospira*, *Asterocapsa*, *Borzia*, *Calothrix*, *Chamaesiphon*, *Chlorogloeopsis*, *Chroococcidiopsis*, *Chroococcus*, *Crinalium*, *Cyanobium*, *Cyanocystis*, *Cyanospira*, *Cyanothece*, *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermum*, *Dactylococcopsis*, *Dermocarpella*, *Fischerella*, *Fremyella*, *Geitleria*, *Geitlerinema*, *Gloeobacter*, *Gloeocapsa*, *Gloeotheca*, *Halospirulina*,

Iyengariella, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Microcystis*, *Myxosarcina*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Nostochopsis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Pleurocapsa*, *Prochlorococcus*, *Prochloron*, *Prochlorothrix*, *Pseudanabaena*, *Rivularia*, *Schizothrix*, *Scytonema*, *Spirulina*, *Stanieria*, *Starria*, *Stigonema*, *Symploca*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Thermosynechococcus*, *Tolypothrix*, *Trichodesmium*, *Tychonema* o *Xenococcus*.

5 Por ejemplo, el microorganismo fotosintético recombinante puede ser una especie de *Synechococcus*, *Synechocystis* o *Thermosynechococcus*. Alternativamente, el microorganismo fotosintético recombinante puede ser una especie de *Cyanobium*, *Cyanothece* o *Cyanobacterium*, o más alternativamente, el microorganismo fotosintético recombinante puede ser una especie de *Gloeobacter*, *Lyngbya* o *Leptolyngba*.

10 En otros ejemplos, la célula huésped recombinante es una microalga eucariótica. En realizaciones particulares, la microalga eucariótica se selecciona de entre una lista que incluye, aunque sin limitación, las especies *Achnanthes*, *Amphiprora*, *Amphora*, *Ankistrodesmus*, *Asteromonas*, *Boekelovia*, *Borodinella*, *Botryococcus*, *Bracteococcus*, *Chaetoceros*, *Carteria*, *Chlamydomonas*, *Chlorococcum*, *Chlorogonium*, *Chlorella*, *Chroomonas*, *Chrysoisphaera*, *Cricosphaera*, *Cryptocodinium*, *Cryptomonas*, *Cyclotella*, *Dunaliella*, *Ellipsoidon*, *Emiliana*, *Eremosphaera*,
15 *Ernodesmius*, *Euglena*, *Franceia*, *Fragilaria*, *Gloeothamnion*, *Haematococcus*, *Halocafeteria*, *Hymenomonas*, *Isochrysis*, *Lepocinclis*, *Micractinium*, *Monoraphidium*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Navicula*, *Neochloris*, *Nephrochloris*, *Nephroselmis*, *Nitzschia*, *Ochromonas*, *Oedogonium*, *Oocystis*, *Ostreococcus*, *Pavlova*, *Parachlorella*, *Pascheria*, *Phaeodactylum*, *Phagus*, *Pichochlorum*, *Platymonas*, *Pleurochrysis*, *Pleurococcus*, *Prototheca*, *Pseudochlorella*, *Pseudoneochloris*, *Pyramimonas*, *Pyrobotrys*, *Scenedesmus*, *Skeletonema*, *Spyrogyra*,
20 *Stichococcus*, *Tetraselmis*, *Thalassiosira*, *Viridiella* o *Volvox*. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante puede ser una diatomea, tal como una especie de *Amphora*, *Chaetoceros*, *Cyclotella*, *Navicula*, *Phaeodactylum* o *Thalassiosira*. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante puede ser una especie de *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Scenedesmus* o *Tetraselmis*.

25 En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante secreta por lo menos una parte del éster de cera producido al medio de cultivo. En determinadas realizaciones, la proporción de cantidad de éster de cera producido respecto a la cantidad de éster de cera secretado es inferior a aproximadamente 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 o 1:1. En realizaciones particulares, la proporción de cantidad de éster de cera producido respecto a la cantidad de éster de cera secretado es inferior a aproximadamente 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 o 1:1. La célula huésped recombinante
30 puede expresar un transportador transmembranal exógeno (p.ej. un casete de unión a ATP o transportador ABC o una bomba RND) para facilitar la secreción del éster de cera. En algunas realizaciones, el transportador se encuentra codificado en por lo menos un gen seleccionado de entre un grupo que incluye, aunque sin limitación, los genes de *Arabidopsis* CER5, WBC11, AtMRPS, AmiS2 y AtPGPI o los genes de transportador de ácidos grasos (FATP, por sus siglas en inglés) de *Saccharomyces*, *Drosophila*, especies de micobacterias o especies de mamífero.
35 En algunas realizaciones, la expresión de una proteína transportadora incrementa la cantidad de un éster de cera liberada a partir de la célula huésped recombinante. En determinadas realizaciones, la expresión de una proteína transportadora incrementa la producción de un éster de cera por la célula huésped recombinante. En algunas realizaciones, la secreción del éster de cera es regulable. En determinadas realizaciones, la secreción del éster de cera es inducible.

40 Las acil-ACP sintetasas de éster de cera y las acil-ACP reductasas formadoras de alcohol de la presente invención son capaces de utilizar acil-ACP como sustrato en lugar de, o además de, acil-CoA. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante no produce endógenamente acil-CoA. En otras realizaciones, la célula huésped recombinante produce endógenamente acil-CoA pero es manipulada para atenuar o eliminar la producción de acil-CoA o la célula huésped recombinante produce una acil-CoA sintetasa mutante que presenta una actividad reducida en comparación con el enzima de tipo salvaje. En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante no expresa, p.ej., una acil-ACP tioesterasa, una acil-CoA tioesterasa y/o una acil-CoA sintetasa. En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante no expresa una reductasa formadora de aldehído (p.ej., una acil-CoA reductasa formadora de aldehído, una acil-ACP reductasa formadora de aldehído o una ácido carboxílico reductasa).
50 En realizaciones particulares, la célula huésped recombinante no expresa una reductasa formadora de aldehído no nativa, p.ej. exógena.

En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante expresa una reductasa formadora de aldehído graso exógena que puede ser, p.ej., una acil-ACP reductasa formadora de aldehído. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante expresa una reductasa formadora de aldehído graso endógena que puede ser, p.ej., una acil-ACP reductasa formadora de aldehído. En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante es manipulada para sobreexpresar una reductasa formadora de aldehído endógena, p.ej. mediante la manipulación de la célula huésped recombinante para que comprenda un promotor heterólogo operablemente ligado a la secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de la reductasa formadora de aldehído. En determinadas realizaciones, el promotor es regulable. En realizaciones particulares, el promotor es inducible y el método comprende además la etapa de inducir la expresión de la reductasa formadora de aldehído endógena.
60

Debido a que las acil-ACP sintetasas de éster de cera y las acil-ACP reductasas formadoras de alcohol de la presente invención utilizan acil-ACP como sustrato, el incremento de la concentración de acil-ACP en la célula huésped recombinante puede resultar en una producción incrementada de éster de cera. En algunas realizaciones, la producción de acil-ACP se encuentra regulada positivamente en la célula huésped recombinante. En algunas
65

realizaciones, la fijación de carbono se encuentra regulada positivamente en la célula huésped recombinante. En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante expresa un gen no nativo codificante de por lo menos un polipéptido seleccionado de entre una beta-cetoacilo sintetasa, una acetil-CoA carboxilasa, una malonil-CoA:ACP transacilasa, una acil-ACP sintetasa, una ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa, una ficobiliproteínas (p.ej., ficocianina), una proteína transportadora de acilos y un transportador transmembranal. El polipéptido puede ser exógeno o endógeno respecto al microorganismo huésped; en caso de ser endógeno, la célula huésped recombinante puede manipularse para sobreexpresar o sobreproducir el polipéptido endógeno. En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante expresa un gen no nativo codificante de una acil-ACP sintetasa endógena o exógena y se cultiva en presencia de ácidos grasos libres exógenos que se proporcionan al medio de cultivo.

La utilización de acil-ACP como sustrato permite la omisión de determinadas etapas requeridas para la conversión de acil-CoA en alcohol graso. Ventajosamente, los genes codificantes de enzimas que catalizan dichas etapas no necesitan manipularse en una célula huésped recombinante que no expresa endógenamente dichas enzimas. Las células huésped recombinantes que expresan endógenamente dichos enzimas pueden manipularse para atenuar o eliminar su expresión. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante no se transforma con un gen codificante de por lo menos una acil-CoA sintetasa, una acil-CoA deshidrogenasa, una acil-ACP tioesterasa o una acil-CoA tioesterasa; en el caso de que se exprese el gen endógenamente, la célula huésped recombinante puede manipularse para atenuar o eliminar la expresión. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante se manipula para atenuar o eliminar la expresión de uno o más enzimas de la ruta de beta-oxidación. En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante se manipula para atenuar o eliminar la expresión de por lo menos uno de entre glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, acetaldehído-CoA deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa y acetato quinasa. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante se manipula para atenuar o eliminar la expresión de una acil-ACP sintetasa.

Las mutaciones para atenuar o eliminar la expresión de genes conocidos pueden introducirse mediante métodos recombinantes o no recombinantes. Los genes pueden ser la diana específicamente mediante disrupción, deleción, sustitución o generación de secuencias antisentido, p.ej. mediante la utilización de microARN o constructos de ARNhp, la generación de ribozimas y/o otros enfoques recombinantes conocidos por el profesional. La inactivación de los genes puede, adicional o alternativamente, llevarse a cabo mediante técnicas de mutación aleatoria, tales como la exposición a UV y/o mutágenos químicos seguido del cribado de las células para los mutantes deseados. Adicional o alternativamente, las proteínas codificadas por los genes pueden inhibirse mediante la generación intracelular de anticuerpos apropiados, la generación intracelular de inhibidores peptídicos, o similar, o alguna combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el método puede comprender además la etapa de aislar el éster de ácido graso o éster de cera producido. Los ácidos grasos o derivados de ácido graso, tales como ésteres de cera, pueden recuperarse del medio de cultivo por medios de recuperación conocidos por el experto ordinario en la materia, tal como mediante extracción del cultivo completo, p.ej. utilizando solventes orgánicos. Adicional o alternativamente, pueden utilizarse adsorbentes particulados. Entre ellos pueden incluirse, p.ej., particulados lipofílicos y/o resinas de intercambio iónico, dependiendo del diseño del método de recuperación. Los adsorbentes particulados pueden circular en el medio separado y después ser recogidos, y/o el medio puede pasarse por una columna de lecho fijo, por ejemplo una columna cromatográfica, que contiene los particulados. Los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos seguidamente pueden eluirse respecto de los adsorbentes particulados, p.ej. mediante la utilización de un solvente apropiado. En determinadas realizaciones, el solvente puede seguidamente evaporarse, seguido del procesamiento adicional de los ácidos grasos aislados, derivados de ácidos grasos y lípidos, rindiendo compuestos químicos y/o combustibles que pueden utilizarse para una diversidad de propósitos. El aislamiento del éster de cera puede producirse simultáneamente con la producción de éster de cera. En algunas realizaciones, el aislamiento del éster de cera es continuo.

En algunas realizaciones, la recuperación de ácidos grasos o derivados de ácidos grasos (p.ej., ésteres de cera) puede potenciarse mediante homogeneización de las células huésped (mediante, p.ej., calor, tratamiento con un ácido o base, tratamiento con enzimas, choque osmótico, disrupción mecánica, sonicación, congelación, descongelación, etc.). En algunas realizaciones, el material que contiene células o fracciones celulares puede tratarse con proteasas para degradar las proteínas contaminantes. Tras la digestión, los hidrocarburos pueden purificarse respecto de las proteínas residuales, fragmentos peptídicos y aminoácidos, p.ej., mediante extracción con solvente, centrifugación y/o filtración. El método de recuperación puede adaptarse para recuperar eficientemente únicamente los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos liberados, únicamente los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos producidos y almacenados dentro de las células, o los ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos tanto almacenados como liberados.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención producen por lo menos 0,1, 0,5, 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 o 30 mg/l de uno o más ésteres de cera durante un periodo de cultivo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días. En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante produce por lo menos 1, 2, 5 o 10 mg/l de éster de cera. En una realización particular, los métodos de la invención producen por lo menos 1 mg/l de éster de cera durante un periodo de cultivo de siete días. Por ejemplo, los métodos pueden incluir el cultivo de un microorganismo fotosintético que incluye una secuencia de

ácidos nucleicos no nativa codificante de una sintasa de éster de cera y una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP reductasa y que permite la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos de manera que el microorganismo fotosintético recombinante produce por lo menos aproximadamente 0,5 miligramos por litro de ésteres de cera en un periodo de siete días, por ejemplo de por lo menos aproximadamente 1 mg/l, 2 mg/l, 5 mg/l o 10 mg/l de ésteres de cera en un periodo de siete días o una media de por lo menos aproximadamente 0,1 mg/l, 0,2 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l o 2 mg/l de ésteres de cera al día durante un periodo de cultivo de entre aproximadamente un día y aproximadamente treinta días, o de entre aproximadamente 0,5 miligramos por litro y aproximadamente 500 miligramos por litro, o de entre aproximadamente 1 mg/l y aproximadamente 250 mg/l o de entre aproximadamente 1 mg/l y aproximadamente 100 mg/l, o de entre aproximadamente 2 mg/l y aproximadamente 200 mg/l, o de entre aproximadamente 2 mg/l y aproximadamente 25 mg/l o de entre aproximadamente 5 mg/l y aproximadamente 100 mg/l, o de entre aproximadamente 2 mg/l y aproximadamente 50 mg/l, o de entre aproximadamente 2 mg/l y aproximadamente 25 mg/l, o de entre aproximadamente 5 mg/l y aproximadamente 25 mg/l, o de entre aproximadamente 5 mg/l y aproximadamente 50 mg/l o de entre aproximadamente 10 mg/l y aproximadamente 50 mg/l, o de entre aproximadamente 10 mg/l y aproximadamente 100 mg/l de ésteres de cera al día durante un periodo de cultivo de entre aproximadamente un día y aproximadamente treinta días.

En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de acil-ACP sintasa de éster de cera produjo un nivel incrementado (p.ej. Incrementado en por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% o 1.000%) de éster de cera respecto a una célula huésped de control que no presenta la secuencia de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera y una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol produjo un nivel incrementado (p.ej. incrementado en por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% o 1.000%) de éster de cera respecto a una célula huésped de control que no presenta las secuencias de ácidos nucleicos no nativas.

Los ésteres de cera comprenden una cadena A derivada de un alcohol graso y una cadena B derivada de acil-CoA (ver, p.ej., la fig. 11). En algunas realizaciones, los métodos de la invención producen ésteres de cera que comprenden por lo menos una molécula de éster de cera en la que tanto la cadena A como la cadena B presentan longitudes de cadena de C8-C24. En determinadas realizaciones, los ésteres de cera comprenden por lo menos una molécula de éster de cera, en la que tanto la cadena A como la cadena B son C12-C18. En determinadas realizaciones, la cadena A y/o B de un éster de cera en el éster de cera comprende longitudes de cadena de, p.ej., C6, C8, C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22 o C24, en cualquier combinación. En algunas realizaciones, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 92%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97% o por lo menos aproximadamente 99% en peso de los ésteres de cera producidos totales son ésteres de cera que comprenden cadenas A y/o B C8 a C24. En algunas realizaciones, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 92%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97% o por lo menos aproximadamente 99% en peso de los ésteres de cera producidos totales son ésteres de cera que comprenden cadenas A y/o B C10 a C20. En determinadas realizaciones, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 92%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97% o por lo menos aproximadamente 99% en peso de los ésteres de cera producidos totales son ésteres de cera que comprenden cadenas A y/o B C12 a C18. En una realización particular, tanto las cadenas A como B de un éster de cera producido mediante los métodos de la invención presentan longitudes de cadena de C8-C24. En otra realización particular, tanto las cadenas A como B de un éster de cera producido mediante los métodos de la invención presentan longitudes de cadena de C12-C18.

Las cadenas A y B de los ésteres de cera producidos mediante los métodos de la invención pueden comprender cadenas lineales, cadenas ramificadas y/o cadenas cíclicas, y pueden comprender cadenas saturadas, monoinsaturadas y/o poliinsaturadas. Se entiende que una referencia a un "ácido graso Cx" incluye ácidos grasos tanto saturados como insaturados con "x" átomos de carbono y que una referencia a un "alcohol graso Cx" incluye alcoholes grasos tanto saturados como insaturados con "x" átomos de carbono.

La invención proporciona además una composición que comprende n éster de cera aislado según los métodos de la invención. En determinadas realizaciones, los ésteres de cera indicados en la presente memoria pueden utilizarse para producir composiciones de combustible.

Los métodos de la invención tal como se indican en la presente memoria pueden llevarse a cabo utilizando una diversidad de moléculas de ácidos nucleicos, vectores, polipéptidos, células huésped y/o sistemas. Las secciones, a continuación, proporcionan datos adicionales sobre dichos componentes y otros que pueden resultar útiles en la práctica de los métodos de la invención.

65

Moléculas de ácidos nucleicos

Las moléculas de ácidos nucleicos y polipéptidos indicados en la presente memoria pueden utilizarse en cualquiera de los métodos de la invención y pueden incluirse en cualquiera de los vectores o células huésped de la invención.
 5 Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican acil-ACP sintasas de éster de cera y polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en una acil-ACP sintasa de éster de cera o un fragmento funcional del mismo, así como moléculas de ácidos nucleicos que codifican acil-ACP reductasas formadoras de alcohol y polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en una acil-ACP reductasa formadora de alcohol o un fragmento funcional del mismo se proporcionan para la utilización en células huésped y métodos para producir ésteres de ácidos grasos,
 10 incluyendo ésteres de cera. Una molécula de ácidos nucleicos o un polipéptido tal como se dan a conocer en la presente memoria pueden aislarse y/o purificarse.

En algunas realizaciones, la expresión en una célula huésped de una molécula o secuencia de ácidos nucleicos aislada o recombinante codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera tal como se indica en la presente memoria resulta en un nivel más elevado de producción de un éster de ácido graso (p.ej. un éster de cera) por la
 15 célula huésped que el nivel de producción en una célula huésped de control, en la que la célula huésped de control se cultiva bajo las mismas condiciones y es sustancialmente idéntica a la célula huésped que expresa la molécula o secuencia de ácidos nucleicos aislada o recombinante en todos los aspectos, con la excepción de que la célula huésped de control no expresa la molécula de ácidos nucleicos aislada o recombinante. En algunas de dichas realizaciones, la célula huésped es un microorganismo y puede ser, en realizaciones particulares, un microorganismo fotosintético.

En algunas realizaciones, la expresión de una molécula o secuencia de ácidos nucleicos aislada o recombinante codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera tal como se indica en la presente memoria en un
 25 microorganismo recombinante que no incluye un gen exógeno codificante de una acil-CoA sintetasa y/o un gen exógeno codificante de acil-ACP tioesterasa o una acil-CoA tioesterasa resulta en un nivel de producción más elevado de un éster de ácido graso por el microorganismo recombinante que el nivel de producción en un microorganismo de control, en el que el microorganismo de control se cultiva bajo las mismas condiciones y es sustancialmente idéntico al microorganismo recombinante que expresa la molécula o secuencia de ácidos nucleicos
 30 aislada o recombinante en todos los aspectos, con la excepción de que el microorganismo de control no expresa la molécula de ácidos nucleicos aislada o recombinante. En realizaciones particulares, la célula huésped es un microorganismo fotosintético.

En realizaciones adicionales, la expresión en una célula huésped de una o más moléculas o secuencias de ácidos nucleicos aisladas o recombinantes codificantes de una acil-ACP sintasa de éster de cera y una acil-ACP reductasa formadora de alcohol tal como se indica en la presente memoria resulta en un nivel de producción más elevado de un éster de cera por la célula huésped que el nivel de producción en una célula huésped de control en la que la célula huésped de control se cultiva bajo las mismas condiciones y es sustancialmente idéntica a la célula huésped que expresa la molécula o moléculas de ácidos nucleicos aisladas o recombinantes en todos los aspectos, con la
 35 excepción de que la célula huésped de control no expresa las moléculas o secuencias de ácidos nucleicos aisladas o recombinantes. En algunas de dichas realizaciones, la célula huésped es un microorganismo y puede ser, en realizaciones particulares, un microorganismo fotosintético.

En realizaciones adicionales, la expresión de una o más moléculas o secuencias de ácidos nucleicos aisladas o recombinantes codificantes de una acil-ACP sintasa de éster de cera y una acil-ACP reductasa formadora de alcohol tal como se indica en la presente memoria en un microorganismo recombinante que no incluye un gen exógeno codificante de una acil-CoA sintetasa y/o un gen exógeno codificante de acil-ACP tioesterasa o una acil-CoA
 45 tioesterasa resulta en un nivel de producción más elevado de un éster de cera por el microorganismo recombinante que el nivel de producción en un microorganismo de control, en el que el microorganismo de control se cultiva bajo las mismas condiciones y es sustancialmente idéntico al microorganismo recombinante que expresa la molécula o moléculas o secuencias de ácidos nucleicos aisladas o recombinantes en todos los aspectos, con la excepción de que el microorganismo de control no expresa la molécula o moléculas o secuencias de ácidos nucleicos aisladas o recombinantes. En realizaciones particulares, el microorganismo recombinante es un microorganismo fotosintético.

Las células huésped o microorganismos recombinantes pueden incluir, por ejemplo, una molécula de ácidos nucleicos aislada codificante de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%,
 55 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43 que presenta actividad de acil-ACP sintasa de éster de cera o a un fragmento funcional de las secuencias de aminoácidos que presentan actividad de acil-ACP sintasa de éster de cera y en realizaciones en las que las células huésped o microorganismo recombinantes incluyen una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, puede incluir una molécula de ácidos nucleicos aislada que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%,
 60 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID n° 2, 4, 6, 8

o 10 con actividad de acil-ACP reductasa formadora de alcohol o a un fragmento funcional de la secuencia de aminoácidos con actividad de acil-ACP reductasa formadora de alcohol.

5 Una molécula de ácidos nucleicos aislada o recombinante codificante de una acil-ACP sintasa puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que presenta actividad de acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 19 o a un fragmento funcional del polipéptido. Por ejemplo, una
 10 secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que presenta actividad de acil-ACP sintasa de éster de cera puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 85% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 19 o un fragmento funcional de la misma o puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 90% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 19 o un fragmento funcional de la misma o, por ejemplo, puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 95% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 19 o a un fragmento funcional de la misma. Por ejemplo, la molécula de ácidos nucleicos aislada puede comprender una secuencia de nucleótidos que
 15 codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 19. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera, en la que la secuencia de ácidos nucleicos presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,
 20 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 18 o a un fragmento de la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 18 que codifica un fragmento funcional de la acil-ACP sintasa de éster de cera de SEC ID nº 19. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada o recombinante que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera, en la que la secuencia de ácidos nucleicos presenta una identidad de secuencia de por lo menos
 25 aproximadamente 85%, de por lo menos aproximadamente 90% o de por lo menos aproximadamente 95% respecto a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 18 o a un fragmento de la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 18 que codifica un fragmento funcional de la acil-ACP sintasa de éster de cera de SEC ID nº 19. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 18. En determinadas realizaciones, cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos proporcionadas
 30 puede comprender además una secuencia adicional de ácidos nucleicos de por lo menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 800, 900, 1.000 o 1.500 nucleótidos de un organismo fotosintético.

35 Una molécula de ácidos nucleicos aislada o recombinante codificante de una acil-ACP sintasa puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que presenta actividad de acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 21 o a un fragmento funcional del polipéptido. Por ejemplo, una
 40 secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que presenta actividad de acil-ACP sintasa de éster de cera puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 85% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 21 o un fragmento funcional de la misma o puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 90% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 21 o un fragmento funcional de la misma o, por ejemplo, puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 95% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 21 o a un fragmento funcional de la
 45 misma. Por ejemplo, la molécula de ácidos nucleicos aislada puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 21. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera, en la que la secuencia de ácidos nucleicos presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,
 50 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 20 o a un fragmento de la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 20 que codifica un fragmento funcional de la acil-ACP sintasa de éster de cera de SEC ID nº 21. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada o recombinante que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera, en la que la secuencia de ácidos nucleicos presenta una identidad de secuencia de por lo menos
 55 aproximadamente 85%, de por lo menos aproximadamente 90% o de por lo menos aproximadamente 95% respecto a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 20 o a un fragmento de la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 20 que codifica un fragmento funcional de la acil-ACP sintasa de éster de cera de SEC ID nº 21. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 20. En determinadas realizaciones, cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos proporcionadas
 60 puede comprender además una secuencia adicional de ácidos nucleicos de por lo menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 800, 900, 1.000 o 1.500 nucleótidos de un organismo fotosintético.

65 En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada o recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que presenta una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta actividad una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%,

50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43 o a un fragmento funcional del polipéptido de SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que presenta actividad de acil-ACP sintasa de éster de cera puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 85%, de por lo menos aproximadamente 90% o de por lo menos aproximadamente 95% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43, o un fragmento funcional de la misma. En algunas realizaciones, una molécula de ácidos nucleicos aislada o recombinante puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que presenta actividad de acil-ACP sintasa de éster de cera, en la que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43. En algunas realizaciones adicionales, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera, en la que la secuencia de ácidos nucleicos presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 o 42 o a un fragmento de la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 o 42 que codifica un fragmento funcional de SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43 con actividad de acil-ACP sintasa de éster de cera. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera, en la que la secuencia de ácidos nucleicos presenta una identidad de por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90% o por lo menos aproximadamente 95% respecto a la secuencia SEC ID nº 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 o 42, en la que la secuencia de ácidos nucleicos codifica un polipéptido con actividad de acil-ACP sintasa de éster de cera. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 o 42, en la que la secuencia de ácidos nucleicos codifica un polipéptido con actividad de acil-ACP sintasa de éster de cera. En determinadas realizaciones, cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos proporcionadas puede comprender además una secuencia adicional de ácidos nucleicos de por lo menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 800, 900, 1.000 o 1.500 nucleótidos de un organismo fotosintético.

En algunas realizaciones, la invención comprende moléculas de ácidos nucleicos codificantes de mutantes por delección de una acil-ACP sintasa de éster de cera en la que uno o más aminoácidos han sido delecionados de la proteína. En una realización, el polipéptido codificado presenta 454, 453, 452, 451, 450, 449, 448, 447, 446 o 445 residuos o menos y presenta una secuencia de aminoácidos idéntica por lo menos aproximadamente al 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEC ID nº 19. En otra realización, el polipéptido codificado presenta 472, 471, 470, 469, 468, 467, 466, 465, 464 o 463 residuos o menos y presenta una secuencia de aminoácidos idéntica por lo menos aproximadamente al 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEC ID nº 21. En otras realizaciones, el polipéptido codificado presenta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos del extremo N- y/o C-terminal y presenta una secuencia de aminoácidos idéntica por lo menos aproximadamente al 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEC ID nº 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43.

La invención proporciona además una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a un fragmento que comprende una secuencia consecutiva de por lo menos aproximadamente 20, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 residuos aminoácidos de SEC ID nº 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43. Dichos fragmentos y variantes de fragmentos pueden resultar útiles, p.ej., como sondas y cebadores. En determinadas realizaciones, dichas sondas y cebadores pueden hibridarse selectivamente con moléculas de ácidos nucleicos codificantes de los polipéptidos indicados en la presente memoria. En determinadas realizaciones, los fragmentos codifican polipéptidos que conservan por lo menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100% de la actividad de la acil-ACP sintasa de éster de cera de la proteína de longitud completa al expresarse en una célula huésped recombinante. En realizaciones particulares, los fragmentos son fragmentos funcionales.

Además, la invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos codificantes de variantes de la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43, o fragmentos de las mismas. Las variantes pueden ser naturales o no naturales, tales como las inducidas por diversos mutágenos y procedimientos mutagénicos. En algunas realizaciones, una molécula de ácidos nucleicos codifica una variante de una sintasa de éster de cera en la que por lo menos un residuo aminoácido ha sido insertado en posición N- o C-terminal respecto a, y/o dentro de, la secuencia de referencia. En algunas realizaciones, por lo menos un residuo aminoácido ha sido delecionado N- y/o C-terminalmente respecto a la secuencia de referencia y/o dentro de misma. En algunas realizaciones, las moléculas de ácidos nucleicos pueden codificar variantes que pueden ser secuencias que contienen mutaciones predeterminadas generadas mediante, p.ej., recombinación homóloga o mutagénesis dirigida

a sitio o por PCR; las proteínas correspondientes de otras especies; alelos u otras variantes naturales, y/o derivados en los que la proteína ha sido modificada covalentemente por medios químicos, enzimáticos u otros medios apropiados con una fracción diferente de un aminoácido natural.

5 Una sustitución, inserción o delección puede afectar adversamente a la proteína en el caso de que la secuencia alterada inhiba sustancialmente una función biológica asociada a la proteína. En determinadas realizaciones, una variante de una acil-ACP sintasa de éster de cera puede presentar actividad que se encuentra reducida en no más de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o 80%,
 10 en comparación con la actividad de la acil-ACP sintasa de éster de cera a partir de la que se deriva la variante (p.ej., WS1 (SEC ID nº 19), WS2 (SEC ID nº 21) u otros polipéptidos de sintasa de éster de cera de SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43). En algunas realizaciones, la cantidad de éster de cera producida por una célula huésped que expresa la variante de acil-ACP sintasa de éster de cera no es inferior a aproximadamente 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 85%, 80% o 75% de la cantidad de éster de cera producida por una célula huésped que expresa la acil-ACP sintasa de éster de cera a partir de la que se deriva la variante (p.ej., WS1 (SEC ID nº 19), WS2 (SEC ID nº 21) u otros polipéptidos de sintasa de éster de cera de SEC ID nº 23, 25, 27, 29,
 15 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43).

La invención proporciona además fragmentos o variantes de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una actividad incrementada respecto a los polipéptidos de referencia. En determinadas realizaciones, el fragmento o variante de acil-ACP sintasa de éster de cera puede presentar una actividad que se encuentra incrementada en por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% o 1.000% respecto a la actividad de la acil-ACP sintasa de éster de cera a partir del que se deriva la variante (p.ej., WS1 (SEC ID nº 19) o WS2 (SEC ID nº 21) u otros polipéptidos de sintasa de éster de cera de SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43. En determinadas realizaciones, la cantidad de éster de cera producida por una célula huésped que expresa el fragmento o variante es por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% o 1.000% de la cantidad de éster de cera producida por una célula huésped que expresa la sintasa de éster de cera a partir de la que se deriva el fragmento o variante (p.ej., WS1 (SEC ID nº 19), WS2 (SEC ID nº 21) u otros polipéptidos de sintasa de éster de cera de SEC ID nº 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43.
 20 25 30

Una molécula de ácidos nucleicos aislada o recombinante codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que presenta actividad de acil-ACP reductasa formadora de alcohol que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2, 4, 6, 8 o 10 o a un fragmento funcional de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol de SEC ID nº 2, 4, 6, 8 o 10.
 35

Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que presenta actividad de acil-ACP reductasa formadora de alcohol puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 85% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 o un fragmento funcional de la misma o puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 90% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o un fragmento funcional de la misma o, por ejemplo, puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 95% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o a un fragmento funcional de la misma. Por ejemplo, la molécula de ácidos nucleicos aislada puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP sintasa formadora de alcohol, en la que la secuencia de ácidos nucleicos presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 1 o a un fragmento de la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 1 que codifica un fragmento funcional de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol de SEC ID nº 2. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada o recombinante que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, en la que la secuencia de ácidos nucleicos presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 85%, de por lo menos aproximadamente 90% o de por lo menos aproximadamente 95% respecto a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 1 o a un fragmento de la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 1 que codifica un fragmento funcional de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol de SEC ID nº 2. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol en la que la molécula de ácidos nucleicos aislada comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 1. En determinadas realizaciones, cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos aisladas proporcionadas puede comprender además una secuencia adicional de ácidos nucleicos de por lo menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 800, 900, 1.000 o 1.500 nucleótidos de un organismo fotosintético.
 40 45 50 55 60

En otro ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que presenta actividad de acil-ACP reductasa formadora de alcohol puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 85% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 4 o un fragmento funcional de la misma o puede
 65

presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 90% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4 o un fragmento funcional de la misma o, por ejemplo, puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 95% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4 o a un fragmento funcional de la misma. Por ejemplo, la molécula de ácidos nucleicos aislada puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP sintasa formadora de alcohol, en la que la secuencia de ácidos nucleicos presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 3 o a un fragmento de la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 3 que codifica un fragmento funcional de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol de SEC ID nº 4. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada o recombinante que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, en la que la secuencia de ácidos nucleicos presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 85%, de por lo menos aproximadamente 90% o de por lo menos aproximadamente 95% respecto a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 3 o a un fragmento de la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 3 que codifica un fragmento funcional de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol de SEC ID nº 4. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol en la que la molécula de ácidos nucleicos aislada comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 3. En determinadas realizaciones, cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos aisladas proporcionadas puede comprender además una secuencia adicional de ácidos nucleicos de por lo menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 800, 900, 1.000 o 1.500 nucleótidos de un organismo fotosintético.

Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que presenta actividad de acil-ACP reductasa formadora de alcohol puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 85% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 6, 8 o 10 o un fragmento funcional de la misma o puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 90% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 6, 8 o 10 o un fragmento funcional de la misma o, por ejemplo, puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 95% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 6, 8 o 10 o un fragmento funcional de la misma. Por ejemplo, la molécula de ácidos nucleicos aislada puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 6, nº 8 o nº 10. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP sintasa formadora de alcohol, en la que la secuencia de ácidos nucleicos presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 5, 7 o 9 o a un fragmento de la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 5, 7 o 9 que codifica un fragmento funcional de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol de SEC ID nº 6, 8 o 10. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada o recombinante que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, en la que la secuencia de ácidos nucleicos presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 85%, de por lo menos aproximadamente 90% o de por lo menos aproximadamente 95% respecto a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 5, 7 o 9 o a un fragmento de la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 5, 7 o 9 que codifica un fragmento funcional de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol de SEC ID nº 6, 8 o 10. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol en la que la molécula de ácidos nucleicos aislada comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 5, 7 o 9. En determinadas realizaciones, cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos aisladas proporcionadas puede comprender además una secuencia adicional de ácidos nucleicos de por lo menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 800, 900, 1.000 o 1.500 nucleótidos de un organismo fotosintético.

En algunas realizaciones, la invención comprende mutantes por delección de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol en la que una molécula de ácidos nucleicos codifica una proteína reductasa en la que uno o más aminoácidos han sido delecionados de la proteína. En una realización, el polipéptido presenta 512, 511, 510, 509, 508, 507, 506, 505, 504 o 503 residuos o menos y presenta una secuencia de aminoácidos idéntica por lo menos aproximadamente al 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEC ID nº 2. En otra realización, el polipéptido presenta 504, 503, 502, 501, 500, 499, 498, 497, 496 o 495 residuos o menos y presenta una secuencia de aminoácidos idéntica por lo menos aproximadamente al 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEC ID nº 4. En una realización adicional, el polipéptido presenta 511, 510, 509, 508, 507, 506, 505, 504, 503 o 502 residuos o menos y presenta una secuencia de aminoácidos idéntica por lo menos aproximadamente al 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEC ID nº 6. En todavía otra realización, el polipéptido presenta 511, 510, 509, 508, 507, 506, 505, 504, 503 o 502 residuos o menos y presenta una secuencia de aminoácidos idéntica por lo menos aproximadamente al 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEC ID nº 8. En otra realización, el polipéptido presenta 513, 512, 511, 510, 509, 508, 507, 506, 505 o 504 residuos o menos y presenta una secuencia de aminoácidos idéntica por lo menos aproximadamente al 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEC ID nº 10. En otras realizaciones, el polipéptido codificado no presenta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos del extremo N- y/o C-terminal y presenta una secuencia de aminoácidos idéntica por lo menos aproximadamente al 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEC ID nº 2, 4, 6, 8 o 10.

La invención proporciona además una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a un fragmento que comprende una secuencia consecutiva de por lo menos aproximadamente 20, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 residuos aminoácidos de SEC ID nº 2, 4, 6, 8 o 10. Dichos fragmentos y variantes de fragmentos pueden resultar útiles como sondas y cebadores. En determinadas realizaciones, dichas sondas y cebadores pueden hibridarse selectivamente con la molécula de ácidos nucleicos codificante de los polipéptidos indicados en la presente memoria. En determinadas realizaciones, los fragmentos codifican polipéptidos que conservan por lo menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100% de la actividad de la acil-ACP sintasa de éster de cera de la proteína de longitud completa al expresarse en una célula huésped recombinante. En realizaciones particulares, los fragmentos son fragmentos funcionales.

Además, la invención proporciona variantes de la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2, 4, 6, 8 o 10 o fragmentos de la misma. Las variantes pueden ser naturales y/o no naturales, tales como las inducidas por diversos mutágenos y procedimientos mutagénicos. En algunas realizaciones, por lo menos un residuo aminoácido ha sido insertado N- y/o C-terminalmente respecto a la secuencia de referencia y/o se encuentra dentro de misma. En algunas realizaciones, por lo menos un residuo aminoácido ha sido delecionado N- y/o C-terminalmente respecto a la secuencia de referencia y/o dentro de misma. En algunas realizaciones, por lo menos un residuo aminoácido ha sido sustituido dentro de la secuencia de referencia. En algunas realizaciones, las variantes pueden ser secuencias que contienen mutaciones predeterminadas generadas mediante, p.ej., recombinación homóloga o mutagénesis dirigida a sitio o por PCR; las proteínas correspondientes de otras especies; alelos u otras variantes naturales, y/o derivados en los que la proteína ha sido modificada covalentemente por medios químicos, enzimáticos u otros medios apropiados con una fracción diferente de un aminoácido natural.

Una sustitución, inserción o delección puede afectar adversamente a la proteína en el caso de que la secuencia alterada inhiba sustancialmente una función biológica asociada a la proteína. En determinadas realizaciones, una variante de una acil-ACP sintasa formadora de alcohol puede presentar actividad que se encuentra reducida en no más de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o 80% respecto a la actividad de la acil-ACP sintasa formadora de alcohol a partir de la que se deriva la variante (p.ej., Maqu_2220 (SEC ID nº 2), Hch_05075 (SEC ID nº 4), MDG893_11561 (SEC ID nº 6), HP15_810 (SEC ID nº 8) o RED65_09894 (SEC ID nº 10)). En algunas realizaciones, la cantidad de alcohol graso producida por una célula huésped que expresa la variante de acil-ACP reductasa formadora de alcohol no es inferior a aproximadamente 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 85%, 80% o 75% de la cantidad de alcohol graso producida por una célula huésped que expresa la acil-ACP reductasa formadora de alcohol a partir de la que se deriva la variante (p.ej., Maqu_2220 (SEC ID nº 2), Hch_05075 (SEC ID nº 4), MDG893_11561 (SEC ID nº 6), HP15_810 (SEC ID nº 8) o RED65_09894 (SEC ID nº 10)).

La invención proporciona además fragmentos y variantes de una acil-ACP sintasa formadora de alcohol que presenta una actividad incrementada respecto al polipéptido de referencia. En determinadas realizaciones, el fragmento o variante puede presentar una actividad que se encuentra incrementada en por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% o 1.000% respecto a la actividad de la acil-ACP sintasa formadora de alcohol a partir del que se deriva la variante (p.ej., Maqu_2220 (SEC ID nº 2), Hch_05075 (SEC ID nº 4), MDG893_11561 (SEC ID nº 6), HP15_810 (SEC ID nº 8) o RED65_09894 (SEC ID nº 10)). En determinadas realizaciones, la cantidad de alcoholes grasos producida por una célula huésped que expresa el fragmento o variante es por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% o 1.000% de la cantidad de alcohol graso producida por una célula huésped que expresa la acil-ACP sintasa formadora de alcohol a partir de la que se deriva el fragmento o variante (p.ej., Maqu_2220 (SEC ID nº 2), Hch_05075 (SEC ID nº 4), MDG893_11561 (SEC ID nº 6), HP15_810 (SEC ID nº 8) o RED65_09894 (SEC ID nº 10)).

En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende, además de una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una sintasa de éster cera con una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de

5 SEC ID nº 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43 o a un fragmento funcional de cualquiera de entre SEC ID nº 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43 con actividad de sintasa de éster de cera, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2, 4, 6, 8 o 10, o a un fragmento funcional de SEC ID nº 2, 4, 6, 8 o 10 que presenta actividad de acil-ACP reductasa formadora de alcohol. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende, además de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera, en la que la secuencia de ácidos nucleicos presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 o 42 o a un fragmento de la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 o 42 que codifica un fragmento funcional de la acil-ACP sintasa de éster de cera de SEC ID nº 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, en la que la secuencia de ácidos nucleicos presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 1, 3, 5, 7, 9 o 11 o a un fragmento de la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 1, 3, 5, 7 o 11 que codifica un fragmento funcional de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol de SEC ID nº 2, 4, 6, 8 o 10. En algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol y una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, en la que la molécula de ácidos nucleicos aislada comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 o 42 y la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 1, 3, 5, 7, 9 o 11, en cualquier combinación. En determinadas realizaciones, cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos proporcionadas puede comprender además una secuencia adicional de ácidos nucleicos de por lo menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 800, 900, 1.000 o 1.500 nucleótidos de un organismo fotosintético.

30 La invención proporciona además moléculas de ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones de hibridación de alta astringencia, tal como condiciones de hibridación selectiva a las secuencias de nucleótidos indicadas en la presente memoria. Entre las sondas de hibridación se incluyen oligonucleótidos sintéticos que se unen de una manera específica de base a una cadena complementaria de ácidos nucleicos. Entre las sondas adecuadas se incluyen los ácidos nucleicos, tal como se describen en Nielsen, Science 254:1497-1500, 1991. En algunas realizaciones, las moléculas de ácidos nucleicos de la invención pueden detectarse y/o aislarse mediante condiciones de hibridación específica, p.ej., bajo condiciones de alta astringencia.

40 En realizaciones particulares, cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos indicadas anteriormente o posteriormente pueden comprender además una secuencia adicional de ácidos nucleicos de por lo menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 800, 900, 1.000 o 1.500 nucleótidos de un organismo fotosintético.

Otras modificaciones

45 La invención proporciona además variantes adicionales de las secuencias de nucleótidos de la invención. En algunas realizaciones, las variantes de secuencia de nucleótidos codifican fragmentos o variantes de los polipéptidos tal como se indican en la presente memoria. En algunas realizaciones, las variantes de secuencia de nucleótidos son naturales. En otras realizaciones, las variantes de secuencia de nucleótidos son no naturales, tales como las inducidas por diversos mutágenos y procedimientos mutagénicos. En determinadas realizaciones, las variantes de secuencia de nucleótidos son una combinación de naturales y no naturales. Una secuencia de ácidos nucleicos dada también puede modificarse, por ejemplo mediante métodos de mutagénesis estándar, evolución artificial o intercambio de dominios a fin de producir secuencias modificadas. Se describen métodos de evolución acelerada en, por ejemplo, Stemmer, Nature 370:389-391, 1994, y en Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751, 1994. La alteración química o enzimática de los ácidos nucleicos y polipéptidos expresados puede llevarse a cabo mediante métodos estándares. Por ejemplo, una secuencia puede modificarse mediante la adición de grupos fosfato, grupos metilo, lípidos, azúcares, péptidos, compuestos orgánicos o inorgánicos, mediante la inclusión de nucleótidos o aminoácidos modificados, o similares.

60 Para la expresión óptima de una proteína recombinante, en determinados casos puede resultar beneficioso utilizar secuencias codificantes que producen ARNm con codones utilizados preferentemente por la célula huésped que debe transformarse ("optimización de codones"). De esta manera, para una expresión incrementada de los transgenes, el uso de los codones del transgén puede corresponderse con el sesgo de codones específico del organismo en el que se desea que se exprese el transgén. Los métodos de recodificación de genes para la expresión en microalgas se describen en, p.ej., la patente US nº 7.135.290. Los mecanismos exactos que subyacen a este efecto se cree que son múltiples pero podrían incluir el equilibrio correcto de los pools de ARNt aminoacilados disponibles con las proteínas que se sintetizan en la célula, acoplados con una traducción más eficiente del ARN mensajero (ARNm) transgénico al satisfacerse dicha necesidad. En algunas realizaciones, sólo se modifica una

parte de los codones para reflejar un uso de codones preferente de un microorganismo huésped. En determinadas realizaciones, se modifica uno o más codones por codones que no son necesariamente el codón más preferente del microorganismo huésped codificante de un aminoácido particular. Se encuentra disponible información adicional para la optimización de codones por ejemplo en la base de datos de uso de codones de GenBank. Pueden optimizarse los codones de las secuencias codificantes para la producción óptima de un producto deseado en el organismo huésped seleccionado para la expresión. En determinadas realizaciones, se optimizan los codones de la secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera y/o de la secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol para la expresión en un microorganismo fotosintético, p.ej. una cianobacteria o una microalga eucariótica.

En algunas realizaciones, las moléculas de ácidos nucleicos de la invención codifican proteínas de fusión que comprenden una acil-ACP sintasa de éster de cera o una acil-ACP reductasa formadora de alcohol. Las moléculas de ácidos nucleicos de la invención pueden, alternativa o adicionalmente, codificar proteínas de fusión que comprenden una acil-ACP reductasa. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender secuencias polinucleótidas que codifican glutatión-S-transferasa (GST) o una parte de la misma, tioredoxina o una parte de la misma, proteína de unión a maltosa o una parte de la misma, polihistidina (p.ej. His₆), poli-HN, polilisina, una secuencia de etiqueta hemaglutinina, etiqueta de VHS y/o por lo menos una parte de VIH-Tat fusionada con la secuencia de la acil-ACP sintasa de éster de cera y/o de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol.

En algunas realizaciones, las moléculas de ácidos nucleicos de la invención comprenden secuencias no codificantes adicionales, tales como secuencias 3' y 5' no codificantes (incluyendo, p.ej., secuencias reguladoras).

Constructos de ácidos nucleicos

En algunas realizaciones, la molécula de ácidos nucleicos aislada de la invención puede comprender tanto una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera como una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol. Las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de la acil-ACP sintasa de éster de cera y la acil-ACP reductasa formadora de alcohol pueden ser cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos indicadas en la presente memoria.

En determinadas realizaciones, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican una acil-ACP sintasa de éster de cera y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol puede ligarse operablemente al mismo promotor y/o intensificador. Por ejemplo, en realizaciones particulares, los dos genes (codificantes de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol y una acil-ACP sintasa de éster de cera) pueden organizarse como operón, en el que, por ejemplo, a una secuencia de promotor sigue, en la dirección 5' a 3', una secuencia codificante de acil-ACP reductasa formadora de alcohol y después una secuencia codificante de acil-ACP sintasa de éster de cera. En una configuración alternativa del operón, a una secuencia de promotor sigue, en la dirección 5' a 3', una secuencia codificante de acil-ACP sintasa de éster de cera y después una secuencia codificante de acil-ACP reductasa formadora de alcohol. En algunas realizaciones, una molécula aislada de ácidos nucleicos puede incluir dos o más genes dispuestos en tándem, en el que la molécula de ácidos nucleicos aislada no incluye una secuencia de promotor que opera en el microorganismo huésped deseado cadena arriba de los genes. En dichas realizaciones, el operón sin promotor puede diseñarse para la integración (p.ej. la recombinación homóloga) en un sitio del genoma huésped que puede incluir una secuencia de promotor, de manera que el operón sintético puede encontrarse regulada transcripcionalmente por un promotor en el genoma del microorganismo huésped. Además, el operón puede diseñarse para la integración (p.ej., la recombinación homóloga) en un sitio del genoma huésped que puede incluir una secuencia de intensificador, de manera que el operón introducido puede encontrarse regulado transcripcionalmente por un intensificador en el genoma del microorganismo huésped. En cualquiera de las realizaciones anteriores de los operones que incluyen genes de acil-ACP reductasa formadora de alcohol y de acil-ACP sintasa de éster de cera, una o más secuencias reguladoras adicionales pueden incluirse en la molécula de ácidos nucleicos aislada, o ejemplo una secuencia para intensificar la traducción puede incluirse cadena arriba de las secuencias codificantes de gen y puede incluirse opcionalmente un terminador transcripcional en el extremo 3' o en proximidad al mismo del operón sintético.

Además del gen de acil-ACP sintasa de éster de cera y un gen de acil-ACP reductasa formadora de alcohol, pueden incluirse opcionalmente uno o más genes adicionales en un operón sintético tal como se proporciona en la presente memoria, en el que uno o más genes adicionales pueden incluir, por ejemplo, uno o más genes codificantes de enzimas o proteínas de la ruta de síntesis de éster de cera y/o uno o más genes codificantes de enzimas o proteínas que pueden intensificar la síntesis de éster de cera, uno o más genes que pueden potenciar la fotosíntesis o la fijación de carbonos y/o uno o más genes informadores o marcadores seleccionables.

En algunas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol pueden ligarse operablemente a diferentes promotores y/o intensificadores de la transcripción. Los promotores e intensificadores pueden ser, p.ej., cualquiera de los promotores e intensificadores transcripcionales indicados en la presente memoria.

La invención comprende además constructos que comprenden una molécula aislada de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera, una molécula aislada de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol y una molécula aislada de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera y una acil-ACP reductasa formadora de alcohol. Un constructo de ácidos nucleicos de la invención puede comprender cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de una acil-ACP sintasa de éster de cera y/o cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, tal como se indica en la presente memoria, y puede incluir además secuencias que regulan o median en la transcripción, traducción o integración de secuencias de nucleótidos en el genoma del huésped. En algunas realizaciones, la invención proporciona constructos de expresión que comprenden una o más secuencias que promueven la expresión de una acil-ACP sintasa de éster de cera y/o una acil-ACP reductasa formadora de alcohol. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera y/o una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, puede ligarse operablemente a un promotor en un constructo de expresión o "casete de expresión". En algunas realizaciones, el promotor es regulable, p.ej., inducible.

En realizaciones en las que el constructo de ácidos nucleicos no contiene un promotor en ligamiento operable con la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP sintasa de éster de cera y/o la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol, una o ambas secuencias de ácidos nucleicos codificantes de enzima puede transformarse en las células huésped de manera que se encuentren operablemente ligadas a un promotor endógeno de la célula huésped mediante, p.ej., recombinación homóloga, integración específica de sitio y/o integración del vector. En algunas realizaciones, entre las secuencias genómicas del huésped incluidas en un constructo de ácidos nucleicos para mediar en la recombinación homóloga en el genoma del huésped se incluyen secuencias reguladoras génicas, por ejemplo una secuencia de promotor que puede regular la expresión de un gen de acil-ACP sintasa de éster de cera y/o un gen de acil-ACP reductasa formadora de alcohol del constructo de ácidos nucleicos. En dichas realizaciones, el transgén o transgenes del constructo se ligan operablemente, de esta manera, con un promotor que es endógeno al microorganismo huésped. En algunas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP sintasa de éster de cera y la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol se encuentran operablemente ligados al mismo promotor que es endógeno al microorganismo huésped. En otras realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP sintasa de éster de cera y la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol se encuentran operablemente ligadas a diferentes promotores endógenos del huésped. En algunas realizaciones, el promotor o promotores endógenos son constitutivos, o el promotor o promotores endógenos pueden ser regulables, p.ej., inducibles.

Un promotor operablemente ligado a una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera de la invención y/o una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un acil-ACP reductasa formadora de alcohol de la invención puede ser un promotor que es heterólogo respecto al gen de sintasa de éster de cera o de acil-ACP reductasa. En algunas realizaciones, el promotor puede ser un promotor inducible, es decir, un promotor que media en la transcripción de un gen ligado operablemente en respuesta a un estímulo particular. Dichos promotores pueden resultar ventajosos, p.ej. para minimizar cualesquiera efectos deletéreos sobre el crecimiento de la célula huésped y/o para maximizar la producción de la composición de alcohol graso y/o el éster de cera. Un promotor inducible puede ser sensible respecto a, p.ej., luz u oscuridad o temperatura elevada o baja, y/o puede ser sensible a compuestos específicos. El promotor inducible puede ser, por ejemplo, un promotor ara, un promotor lac, un promotor tet (p.ej., patente US nº 5.851.796), un promotor trp o un promotor híbrido que incluye una o más partes de un promotor ara, tet, trp y/o lac. La secuencia de promotor puede proceder de cualquier organismo, con la condición de que sea funcional en el organismo huésped. En determinadas realizaciones, los promotores inducibles se forman mediante la fusión de una o más partes o dominios de un promotor inducible conocido con por lo menos una parte de un promotor diferente que puede operar en la célula huésped, p.ej. para conferir inducibilidad a un promotor que opera en la especie huésped.

En algunas realizaciones, una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera de la invención y/o una acil-ACP reductasa formadora de alcohol de la invención se encuentran operablemente ligadas a un promotor que funciona en procariotas, tal como cianobacterias, incluyendo, aunque sin limitación, los promotores lac, tac y trc, así como derivados, tal como, aunque sin limitación, los promotores *trcE* y *trcY* que son inducibles mediante la adición de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), promotores que están asociados naturalmente a genes de resistencia a antibiótico portados en transposones o cromosomas bacterianas (p.ej. la neomicina fosfotransferasa, la cloranfenicol acetiltransferasa, la espectinomicina adeniltransferasa, etc., o combinaciones de las mismas), promotores asociados a diversos genes bacterianos y cianobacterianos nativos heterólogos, promotores de virus y fagos, promotores sintéticos y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, los promotores son promotores cianobacterianos, p.ej. *secA* (secreción; controlado por el estado redox de la célula), *rbc* (operón Rubisco) y *psaAB* (PSI, proteínas de centro de reacción; reguladas por la luz), promotor *NtcA* o *glnA* y *psbA* (proteína D1 del PSII; inducible por la luz). En algunas realizaciones, el constructo que incluye un promotor cianobacteriano o una parte del mismo puede recombinarse en el genoma de una célula huésped cianobacteriana, de manera que la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acilreductasa, la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la sintasa de cera, o ambas, se ligan operablemente a un promotor cianobacteriano en el genoma del huésped. En algunas realizaciones, los promotores están regulados por

compuestos de nitrógeno, tales como, por ejemplo, los promotores nar, ntc, nir o nrt. En algunas realizaciones, los promotores están regulados por fosfato (p.ej., los promotores pho o pst) o por el níquel (p.ej., el promotor nrs). Los promotores para la utilización en cianobacterias pueden modificarse respecto a los promotores naturales y pueden incluir combinaciones de promotores naturales, incluyendo, aunque sin limitación, los dados a conocer en la presente memoria. En algunas realizaciones, el promotor o promotores se seleccionan de entre promotores procarióticos de un abanico de especies, incluyendo especies eubacterianas y cianobacterianas, tales como, por ejemplo, un promotor araC o pBAD, un promotor rha, un promotor Pm, un promotor xylS, un promotor nir, un promotor nar, un promotor pho, un promotor tet, un promotor cys, un promotor metalotioneína, un promotor nrt, un promotor gln, un promotor de choque térmico, un promotor inducible por frío o un promotor vírico. Los promotores anteriormente proporcionados son ejemplares y no limitativos.

Puede utilizarse una amplia diversidad de terminadores transcripcionales en cualquiera de los vectores de la invención. Entre los ejemplos de posibles terminadores pueden incluirse, aunque sin limitarse a ellos, psbA, psaAB, rbc, secA, la proteína de cubierta de T7, rrnB y similares, y combinaciones de los mismos.

En determinadas realizaciones, el vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera y/o una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol está diseñada para la transformación en cianobacterias. En una realización particular, el vector permite la recombinación homóloga de la secuencia codificante de la acil-ACP sintasa de éster de cera y/o la secuencia codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol con el genoma cianobacteriano.

Una molécula de ácidos nucleicos aislada de la presente invención puede incluir las secuencias dadas a conocer en la presente memoria que codifican una o más de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol o una acil-sintasa de éster de cera en un vector, tal como, aunque sin limitación, un vector de expresión. Un vector puede incluir, por ejemplo, uno o más de entre: 1) un origen de replicación para la propagación de las secuencias de ácidos nucleicos en uno o más huéspedes (que pueden o no incluir el huésped de producción), 2) uno o más marcadores seleccionables, 3) uno o más genes informadores, 4) una o más secuencias de control de la expresión, tales como, aunque sin limitación, secuencias de promotor, secuencias de intensificador, secuencias de terminador, secuencias para intensificar la traducción, etc. y/o 5) una o más secuencias para promover la integración de las secuencias de ácidos nucleicos en un genoma huésped, por ejemplo una o más secuencias con homología respecto a una o más secuencias de nucleótidos del microorganismo huésped.

En algunas realizaciones, los vectores de transformación pueden incluir un marcador seleccionable, tal como, aunque sin limitación, un gen de resistencia a fármaco, un gen de resistencia a herbicida, un enzima y/o factor metabólico requerido para la supervivencia del huésped (por ejemplo, un marcador auxotrófico) o similar, o una combinación de los mismos. Las células transformadas pueden seleccionarse opcionalmente basándose en la capacidad de crecer en presencia del antibiótico y/o otro marcador seleccionable bajo condiciones en las que las células que no poseen el casete de resistencia o marcador auxotrófico no pueden crecer. Adicional o alternativamente, un marcador no seleccionable (p.ej. un gen informador) puede encontrarse presente en un vector, tal como un gen codificante de una proteína fluorescente o un enzima que genera un producto de reacción detectable.

En algunas realizaciones, el vector es un vector de integración que incluye una o más secuencias que promueven la integración de un gen de interés o casete de expresión génica en el genoma de la célula huésped. Por ejemplo, un vector de integración utilizado para transformar una célula huésped puede incluir por lo menos una secuencia de por lo menos aproximadamente 50, de por lo menos 100, de por lo menos 200, de por lo menos 300, de por lo menos 400, de por lo menos 500, de por lo menos 600, de por lo menos 700, de por lo menos 800, de por lo menos 900, de por lo menos 1.000, de por lo menos 1.200 o de por lo menos 1.500 nucleótidos con homología respecto a una secuencia en el genoma de la célula huésped para permitir la integración del gen o casete de expresión génica en el genoma de la célula huésped mediante recombinación homóloga. En algunos ejemplos, el gen o casete de expresión génica se encuentra flanqueado por secuencias homólogas a una región del cromosoma del huésped promoviendo la integración del gen de interés en el cromosoma del huésped. Alternativa o adicionalmente, un vector de integración puede incluir una o más secuencias que estimulan la recombinación específica de sitio o la integración aleatoria, tal como, aunque sin limitación, secuencias reconocidas por recombinasas, integrasas o transposasas. En algunas realizaciones, el vector de integración puede incluir además un gen codificante de una recombinasa, integrasa o transposasa. En determinadas realizaciones, el vector de integración está diseñado para promover la integración de un gen de acil-ACP sintasa de éster de cera, un gen de acil-ACP reductasa formadora de alcohol, o ambos, en cianobacterias. En realizaciones particulares, el vector promueve la integración en el sitio RS1 o en el sitio RS2 en cianobacterias (p.ej. en *Synechocystis* sp. PCC6803).

Pueden introducirse vectores en células huésped (p.ej., cualquiera de las células huésped indicadas en la presente memoria) mediante técnicas convencionales de transformación y/o transfección. Las cianobacterias, por ejemplo, pueden transformarse mediante cualesquiera métodos adecuados, incluyendo, p.ej., incorporación natural de ADN (Zang, J. Microbiol. 45:241-245, 2007), conjugación (Wolk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1561-1565, 1984), transducción, transformación de perlas de vidrio (Feng, Mol. Biol. Rep. 36:1433-9, 2009), la transformación con fibras de carburo de silicio (Dunahay, Methods Mol. Biol. 62:503-9, 1997), labiolística (Kroth, Methods Mol. Biol.

390:257-267, 2007), electroporación (Ludwig, Appl. Microbiol. Biotechnol. 78:729-35, 2008), transformación mediada por láser (documento nº WO2009/140701), incubación con ADN en presencia de o después del tratamiento con cualquier dendrímero de poli(amidoamina) (Pasupathy, Biotechnol. J. 3:1078-82, 2008), polietilenglicol (Ohnuma, Plant Cell Physiol. 49:117-120, 2008), lípidos catiónicos (Muradawa, J. Biosci. Bioeng. 105:77-80, 2008), dextrano, fosfato de calcio y/o cloruro de calcio (Mendez-Alvarez, J. Bacteriol. 176:7395-7397, 1994), opcionalmente después del tratamiento con enzimas degradantes de la pared celular (Perrone, Mol. Biol. Cell 9:3351-3365, 1998), o similares, o combinaciones de los mismos. La transformación mediada por *Agrobacterium* puede llevarse a cabo, adicional o alternativamente, en células de algas, por ejemplo tras eliminar o romper la pared celular del alga (Kumar, Plant Sci. 166:731-738, 2004).

Los vectores anteriormente indicados pueden utilizarse en cualquiera de los métodos para producir un éster de cera tales como los indicados en la presente memoria.

Células huésped recombinantes

La invención proporciona además una célula huésped recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol. En algunas realizaciones, la secuencia o secuencias de ácidos nucleicos comprende además secuencias adicionales de ácidos nucleicos de por lo menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 o 1.500 nucleótidos de un organismo fotosintético. La célula huésped recombinante puede comprender, p.ej., cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos aisladas anteriormente indicadas codificantes de una sintasa de éster de cera (p.ej., una acil-ACP sintasa de éster de cera) o una reductasa formadora de alcohol (p.ej., una acil-ACP reductasa formadora de alcohol) o codificante de tanto una sintasa de éster de cera como una reductasa formadora de alcohol. La célula huésped recombinante puede comprender, p.ej., cualquiera de los vectores indicados en la presente memoria. En algunas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la sintasa de éster de cera es no nativa de la célula huésped recombinante. En algunas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la reductasa formadora de alcohol es no nativa de la célula huésped recombinante.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona una célula huésped recombinante manipulada para la producción de ésteres de ácidos grasos, en la que la célula huésped recombinante comprende una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una sintasa de éster de cera capaz de producir un éster de ácido graso en una ruta independiente de acil-CoA con la expresión en la célula huésped. En algunas realizaciones, la sintasa de éster de cera es capaz de utilizar acil-ACP como sustrato. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante comprende además una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una reductasa formadora de alcohol. En algunas realizaciones, la reductasa formadora de alcohol es capaz de utilizar acil-ACP como sustrato. En realizaciones particulares, la célula huésped recombinante produce un éster de cera en una ruta independiente de acil-CoA con la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de la sintasa de éster de cera y la secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de la reductasa formadora de alcohol, en caso de hallarse presente, en la célula huésped.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona una célula huésped recombinante manipulada genéticamente para la producción de ésteres de cera a partir de acil-ACP en una ruta de dos genes, en la que la célula huésped recombinante comprende una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol y una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera. En realizaciones particulares, la célula huésped recombinante produce un éster de cera a partir de acil-ACP en una ruta de dos genes con la expresión en la célula huésped. En algunas realizaciones, la acil-ACP reductasa formadora de alcohol de la invención es una acil-ACP reductasa microbiana y/o la acil-ACP sintasa de éster de cera de la invención es una sintasa de éster de cera microbiana. En algunas realizaciones, tanto la acil-ACP reductasa formadora de alcohol de la invención como la acil-ACP sintasa de éster de cera de la invención son de origen procariótico. En algunas realizaciones, la acil-ACP reductasa formadora de alcohol de la invención es una acil-ACP reductasa de una especie de *Marinobacter* y/o la acil-ACP sintasa de éster de cera de la invención es una sintasa de éster de cera de una especie de *Marinobacter*.

En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante es una célula de mamífero, una célula vegetal, una célula de insecto, una célula de levadura (p.ej., *Y. lipolytica* o *S. cerevisiae*), una célula fúngica, una célula fúngica filamentosa, una célula algal o una célula bacteriana (p.ej., *E. coli*). Por ejemplo, la célula huésped puede ser, a modo de ejemplos no limitativos, una especie de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Aspergillus*, *Pichia*, *Schizochytrium*, *Thraustochytriales*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus* o *Gluconobacter*.

En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante es un microorganismo recombinante. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante es cualquier microorganismo procariótico, incluyendo, aunque sin limitación, una eubacteria, una arqueobacteria, una bacteria verde no del azufre, una bacteria púrpura no del azufre o una cianobacteria. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante es una célula huésped fotosintética,

p.ej., un microorganismo fotosintético. En determinadas realizaciones, el microorganismo fotosintético es una cianobacteria. Las cianobacterias no es conocido que produzcan acil-CoA y basándose en el análisis de genes de especies cianobacterianas que presentan genomas secuenciados, se ha determinado que estas especies no presentan genes de acil-CoA sintetasa (Kaczmarzyk y Fulda, *Plant Physiol.* 152: 1598-1610, 2010). Se conocen varias especies de cianobacterias y han sido manipuladas utilizando técnicas de biología molecular, incluyendo las cianobacterias unicelulares *Synechocystis* sp. PCC6803 y *Synechococcus elongates* PCC7942, los genomas de las cuales han sido secuenciados por completo. En algunas realizaciones, la cianobacteria se selecciona de entre, p.ej., las especies de *Agmenellum*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Anacystis*, *Aphanizomenon*, *Arthrospira*, *Asterocapsa*, *Borzia*, *Calothrix*, *Chamaesiphon*, *Chlorogloeopsis*, *Chroococciopsis*, *Chroococcus*, *Crinallium*, *Cyanobium*, *Cyanocystis*, *Cyanotheca*, *Cyanothece*, *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermum*, *Dactylococcopsis*, *Dermocarpella*, *Fischerella*, *Fremyella*, *Geitleria*, *Geitlerinema*, *Gloeobacter*, *Gloeocapsa*, *Gloeotheca*, *Halospirulina*, *Iyengariella*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Microcystis*, *Myxosarcina*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Nostochopsis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Pleurocapsa*, *Prochlorococcus*, *Prochloron*, *Prochlorothrix*, *Pseudanabaena*, *Rivularia*, *Schizothrix*, *Scytonema*, *Spirulina*, *Stanieria*, *Starria*, *Stigonema*, *Symploca*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Thermosynechococcus*, *Tolypothrix*, *Trichodesmium*, *Tychonema* o *Xenococcus*. Por ejemplo, el microorganismo huésped puede ser una especie de *Synechococcus*, *Thermosynechococcus* o *Synechocystis*. Alternativamente, el microorganismo fotosintético recombinante puede ser una especie de *Cyanobium*, *Cyanotheca* o *Cyanobacterium*, o más alternativamente, el microorganismo fotosintético recombinante puede ser una especie de *Gloeobacter*, *Lyngbya* o *Leptolyngba*. En algunas realizaciones, la cepa cianobacteriana es una especie de *Synechocystis*.

En determinadas realizaciones, el microorganismo fotosintético es una microalga eucariótica seleccionada de entre, p.ej., especies de *Achnanthes*, *Amphiprora*, *Amphora*, *Ankistrodesmus*, *Asteromonas*, *Boekelovia*, *Borodinella*, *Botryococcus*, *Bracteococcus*, *Chaetoceros*, *Carteria*, *Chlamydomonas*, *Chlorococcum*, *Chlorogonium*, *Chlorella*, *Chroomonas*, *Chrysothaera*, *Cricosphaera*, *Cryptocodinium*, *Cryptomonas*, *Cyclotella*, *Dunaliella*, *Ellipsoidon*, *Emiliana*, *Eremosphaera*, *Ernodesmius*, *Euglena*, *Franceia*, *Fragilaria*, *Gloeothamnion*, *Haematococcus*, *Halocafeteria*, *Hymenomonas*, *Isochrysis*, *Lepocinclis*, *Micractinium*, *Monoraphidium*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Navicula*, *Neochloris*, *Nephrochloris*, *Nephroselmis*, *Nitzschia*, *Ochromonas*, *Oedogonium*, *Oocystis*, *Ostreococcus*, *Pavlova*, *Parachlorella*, *Pascheria*, *Phaeodactylum*, *Phagus*, *Picochlorum*, *Platymonas*, *Pleurochrysis*, *Pleurococcus*, *Prototheca*, *Pseudochlorella*, *Pseudoneochloris*, *Pyramimonas*, *Pyrobotrys*, *Scenedesmus*, *Skeletonema*, *Spyrogyra*, *Stichococcus*, *Tetraselmis*, *Thalassiosira*, *Viridiella* o *Volvox*. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante puede ser una diatomea, tal como una especie de *Amphora*, *Chaetoceros*, *Cyclotella*, *Navicula*, *Phaeodactylum* o *Thalassiosira*. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante puede ser una especie de *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Scenedesmus* o *Tetraselmis*.

En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 o 42, o a un fragmento de la secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento funcional de la acil-ACP sintasa de éster de cera. En determinadas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP sintasa de éster de cera comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 o 42. En determinadas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP sintasa de éster de cera se deriva de, p.ej., una especie de *Marinobacter*, *Limnobacter*, *Alcanivorax*, *Hahella*, *gammaproteobacterium*, *Oceanobacter* o *Mycobacterium*. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante expresa una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43, o a un fragmento funcional del polipéptido. En determinadas realizaciones, la acil-ACP sintasa de éster de cera comprende o consiste esencialmente en el polipéptido de SEC ID nº 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante comprende un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP sintasa de éster de cera operablemente ligada a un promotor. En determinadas realizaciones, el promotor es regulable. En realizaciones particulares, el promotor es inducible. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante es una célula huésped fotosintética, p.ej., un microorganismo fotosintético.

En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante comprende además una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 1, 3, 5, 7, 9 o 11 o a un fragmento de la secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento funcional de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol. En determinadas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 1, 3, 5, 7, 9 o 11. En determinadas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos se deriva de una bacteria marina, p.ej. una especie de *Marinobacter* o *Hahella*. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante expresa una acil-ACP reductasa formadora de alcohol que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%,

55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2, 4, 6, 8 o 10, o a un fragmento funcional del polipéptido. En determinadas realizaciones, la acil-ACP reductasa formadora de alcohol comprende o consiste esencialmente en el polipéptido de SEC ID nº 2, 4, 6, 8 o 10. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante comprende un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol operablemente ligada a un promotor. En determinadas realizaciones, el promotor es regulable. En realizaciones particulares, el promotor es inducible. El vector puede ser el mismo vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP sintasa de éster de cera o puede ser un vector separado. El promotor operablemente ligado a la secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol puede ser el mismo promotor operablemente ligado a la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP sintasa de éster de cera o puede ser un promotor separado. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante es una célula huésped fotosintética, p.ej., un microorganismo fotosintético.

En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante comprende secuencias de ácidos nucleicos codificantes de más de una sintasa de éster de cera. En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante comprende secuencias de ácidos nucleicos codificantes de más de una acil-ACP sintasa de éster de cera. En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 19 o un fragmento funcional de la misma; una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 21 o un fragmento funcional de la misma; una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de nucleótidos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera de SEC ID nº 23 o un fragmento funcional de la misma; una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 25 o un fragmento funcional de la misma; una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 27 o un fragmento funcional de la misma; una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 29 o un fragmento funcional de la misma; una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 31 o un fragmento funcional de la misma; una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 33 o un fragmento funcional de la misma; una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 35 o un fragmento funcional de la misma; una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 37 o un fragmento funcional de la misma; una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 39 o un fragmento funcional de la misma; una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 41 o un fragmento funcional de la misma; una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 43 o a un fragmento funcional de la misma, en cualquier combinación.

En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante comprende secuencias de ácidos nucleicos codificantes de más de una reductasa formadora de alcohol. En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante comprende secuencias de ácidos nucleicos codificantes de más de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol. En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 o un fragmento funcional de la misma; una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 4 o un fragmento funcional de la misma; una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 6 o un fragmento funcional de la misma; una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8 o un fragmento funcional de la misma, y/o una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 10 o a un fragmento funcional de la misma, en cualquier combinación.

En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante es una célula huésped fotosintética y las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de la acil-ACP sintasa de éster de cera y/o la acil-ACP reductasa formadora de alcohol han sido optimizadas para sus codones para la expresión en la célula huésped fotosintética.

En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante expresa una acil-ACP reductasa formadora de alcohol microbiana (p.ej., procariótica) y una acil-ACP sintasa de éster de cera microbiana (p.ej., procariótica).

En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante expresa por lo menos una acil-ACP reductasa formadora de alcohol y por lo menos una acil-ACP sintasa de éster de cera que se derivan de la especie del mismo género, p.ej. *Marinobacter* o *Hahella*.

En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante que expresa una acil-ACP sintasa de éster de cera produce una mayor cantidad de un éster de ácido graso que una célula huésped de control que no expresa la acil-ACP sintasa de éster de cera. En algunas realizaciones, la cantidad de éster de ácido graso producida por un cultivo de la célula huésped recombinante que expresa una acil-ACP sintasa de éster de cera es por lo menos aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 225%, 250%, 275%, 300%, 325%, 350%, 375%, 400%, 425%, 450%, 475%, 500%, 525%, 550%, 575%, 600%, 625%, 650%, 675%, 700%, 725%, 750%, 775%, 800%, 825%, 850%, 875%, 900%, 925%, 950%, 975% o 1000% superior a la cantidad de éster de cera producida por una célula huésped de control que no expresa la acil-ACP sintasa de éster de cera.

En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante que expresa una acil-ACP sintasa de éster de cera y una acil-ACP reductasa formadora de alcohol produce una mayor cantidad de un éster de cera que una célula huésped de control que no expresa la acil-ACP sintasa de éster de cera y la acil-ACP reductasa formadora de alcohol. En algunas realizaciones, la cantidad de éster de cera producida por un cultivo de la célula huésped recombinante que expresa una acil-ACP sintasa de éster de cera y una acil-ACP reductasa formadora de alcohol es por lo menos aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 225%, 250%, 275%, 300%, 325%, 350%, 375%, 400%, 425%, 450%, 475%, 500%, 525%, 550%, 575%, 600%, 625%, 650%, 675%, 700%, 725%, 750%, 775%, 800%, 825%, 850%, 875%, 900%, 925%, 950%, 975% o 1000% superior a la cantidad de éster de cera producida por una célula huésped de control que no expresa la acil-ACP sintasa de éster de cera y la acil-ACP reductasa formadora de alcohol.

En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante que expresa una acil-ACP sintasa de éster de cera y, opcionalmente una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, expresan por lo menos un gen recombinante o exógeno adicional o sobreexpresan un gen endógeno adicional que funciona en la ruta de biosíntesis de éster de cera. El gen adicional puede encontrarse codificado por una molécula de ácidos nucleicos que es igual a la molécula de ácidos nucleicos que codifica la acil-ACP sintasa de éster de cera y/o que la molécula de ácidos nucleicos que codifica la acil-ACP reductasa formadora de alcohol o el gen adicional puede encontrarse codificado por moléculas de ácidos nucleicos separadas o por la misma molécula de ácidos nucleicos. En el caso de que dos o más genes se encuentran codificados por la misma molécula de ácidos nucleicos (p.ej., en el mismo vector de expresión), la expresión de cada gen puede opcionalmente encontrarse regulada independientemente por un mismo promotor o un promotor y/o intensificador diferente. En determinadas realizaciones, el gen adicional puede incrementar la tasa y/o nivel de producción de éster de cera. Adicional y/o alternativamente, el gen adicional puede, p.ej., incrementar la

concentración de precursores de éster de cera, tales como acil-ACP y alcohol graso, reducir el nivel de conversión de acil-ACP, alcohol graso o éster de cera en otros productos (tales como, por ejemplo, otros derivados de ácidos graso o productos de degradación de alcohol graso o éster de cera) o reducir la toxicidad del alcohol graso y/o éster de cera para la célula. En determinadas realizaciones, el polipéptido codificado por el gen adicional se selecciona de entre, p.ej., uno o más enzimas del complejo de ácido graso sintasa (p.ej., una beta-cetoacil-ACP sintasa, una 3-cetoacil-ACP reductasa, una β -hidroxiacil-ACP deshidratasa, una enoil-ACP reductasa, etc.), una acetil-CoA carboxilasa, una malonil-CoA:ACP transacilasa, una proteína portadora de acilos o una acil-ACP sintetasa. Adicional o alternativamente, la célula huésped recombinante que expresa una acil-ACP reductasa formadora de alcohol puede expresar una ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa y/o una ficobiliproteína (p.ej., ficocianina).

En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante no es manipulada para expresar acil-CoA exógena, p.ej., no incluye un gen exógeno codificante de una acil-CoA sintetasa. En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante no produce endógenamente acil-CoA. En otras realizaciones, la célula huésped recombinante produce endógenamente acil-CoA pero es manipulada para atenuar o eliminar la producción de acil-CoA. Por ejemplo, en el caso de que la célula huésped recombinante sea *E. coli* u otra bacteria, la célula huésped puede manipularse para atenuar o eliminar la expresión de los genes *fadD* y/o *fadK* de acil-CoA sintetasa u ortólogos de los mismos. Además, la célula huésped recombinante puede, adicional o alternativamente, presentar un gen mutado codificante de una acil-CoA sintetasa, de manera que el huésped recombinante produce una acil-CoA sintetasa con actividad reducida o ninguna actividad. Por ejemplo, en algunas circunstancias, una reducción o eliminación de la expresión o actividad de acil-CoA puede mejorar los rendimientos de éster de cera mediante la regulación negativa de las rutas de degradación de los ácidos grasos, que utilizan acil-CoA. En todavía otras realizaciones, la célula huésped recombinante produce endógenamente acil-CoA y genera un éster de cera mediante rutas tanto dependientes de acil-CoA como independientes de acil-CoA.

En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante no incluye un gen exógeno de una acil-ACP tioesterasa o de una acil-CoA tioesterasa. En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante no expresa, p.ej., una acil-ACP tioesterasa o una acil-CoA tioesterasa. La célula huésped puede ser una célula que no presenta genes endógenos de una acil-ACP tioesterasa o una acil-CoA tioesterasa o de ambas. La célula huésped puede presentar una expresión atenuada de un gen endógeno codificante de una acil-ACP tioesterasa o de una acil-CoA tioesterasa o de ambas.

En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante no expresa una acil-ACP tioesterasa, una acil-CoA tioesterasa o una acil-CoA sintetasa. Por ejemplo, el huésped puede no presentar un gen endógeno de una acil-ACP tioesterasa o una acil-CoA tioesterasa y/o el huésped puede presentar una expresión atenuada de un gen de una acil-ACP tioesterasa o de una acil-CoA tioesterasa. Adicionalmente, la célula huésped puede no presentar un gen endógeno de una acil-CoA sintetasa o puede presentar una expresión atenuada de un gen endógeno codificante de una acil-CoA sintetasa. Por ejemplo, la célula huésped puede ser un microorganismo, tal como una especie cianobacteriana, que no presenta genes endógenos de acil-CoA tioesterasa, de una acil-CoA tioesterasa y de una acil-CoA sintetasa.

En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante no expresa una reductasa formadora de aldehído (p.ej., acil-CoA reductasa, acil-ACP reductasa formadora de aldehído o ácido carboxílico reductasa). En realizaciones particulares, la célula huésped recombinante no expresa una reductasa formadora de aldehído no nativa, p.ej. exógena.

En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante puede manipularse para expresar un transportador transmembranal exógeno para facilitar la secreción de éster de cera. Por ejemplo, la célula huésped recombinante puede incluir un gen no nativo codificante de un transportador de casete de unión a ATP (ABC, por sus siglas en inglés) o una bomba de RND. En algunas realizaciones, el transportador es por lo menos 80% idéntico en su secuencia a una proteína transportadora codificada por los genes de *Arabidopsis* CER5, WBC11, AtMRPS, AmiS2 y AtPGP1, o de transportador de ácidos grasos (FATP, por sus siglas en inglés) de *Saccharomyces*, *Drosophila*, especies micobacterianas o especies de mamífero.

Las células huésped recombinantes anteriormente indicadas pueden utilizarse en cualquiera de los métodos de producción de un éster de cera indicado en la presente memoria.

Sistemas

La invención proporciona además un sistema independiente de acil-CoA para la producción de un éster de ácido graso. En algunas realizaciones, el sistema comprende una célula huésped recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP sintasa de éster de cera y una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol. En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante no incluye un gen exógeno codificante de una acil-CoA sintetasa. En determinadas realizaciones, la célula huésped recombinante no produce acil-CoA. La célula huésped recombinante puede ser, p.ej., cualquiera de las células huésped recombinantes indicadas en la presente memoria y puede comprender cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos y/o vectores indicados en la presente memoria. En

algunas realizaciones, la célula huésped recombinante es un microorganismo fotosintético recombinante y se cultiva en un medio que no incluye una cantidad sustancial de fuente de carbono reducido. En algunas realizaciones, el microorganismo fotosintético recombinante se expone a luz durante por lo menos una parte del periodo de producción.

El microorganismo fotosintético recombinante puede cultivarse mixotróficamente, utilizando tanto luz como una fuente de carbono reducido, o puede cultivarse fototróficamente. En el cultivo fototrópico, el microorganismo fotosintético puede utilizar ventajosamente la luz como fuente de energía. Una fuente de carbono "inorgánica" o no reducida puede utilizarse para la síntesis de biomoléculas por el microorganismo fotosintético. Típicamente, una "fuente de carbono no reducido" puede encontrarse en forma de CO₂ (dióxido de carbono), ácido carbónico, sales de bicarbonato, sales de carbonato, sales de hidrogenocarbonato o similares, o como una combinación de los mismos, los cuales no pueden oxidarse adicionalmente para obtener energía sostenible ni ser utilizadas como fuente de poder reductor por parte de las células huésped. En realizaciones particulares, el carbono inorgánico es sustancialmente la única fuente de carbono presente en el medio de cultivo. En dichas realizaciones, en el caso de que se encuentre presente una fuente o compuesto de carbono orgánico (reducido) en el medio de cultivo de una célula huésped cultivada fototróficamente, generalmente no puede ser incorporado y/o metabolizado por la célula para energía o como fuente de carbono para la síntesis de biomoléculas y/o no se encuentra presente en una cantidad suficiente para proporcionar energía sostenible para el crecimiento del cultivo celular o la producción de moléculas orgánicas.

Los microorganismos que pueden resultar útiles como células huésped de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden encontrarse en diversas localizaciones y entornos en todo el mundo. Sin restringirse a ninguna teoría en particular, se observa que, tal vez como consecuencia de su aislamiento de otras especies y/o su divergencia evolutiva, el medio de cultivo particular para el crecimiento óptimo y la generación de lípidos y/o constituyentes hidrocarburo puede variar. En algunos casos, determinadas cepas de microorganismos podrían ser incapaces de crecer en un medio de cultivo particular debido a la presencia de algún componente inhibitorio o la ausencia de algún requisito nutricional esencial requerido por la cepa particular de microorganismo.

Se encuentran generalmente disponibles medios de cultivo sólidos y líquidos de una amplia diversidad de fuentes, al igual que instrucciones para la preparación de medios particulares adecuados para una amplia diversidad de tipos de células huésped. Por ejemplo, son bien conocidos de la técnica diversos medios de agua dulce y salada, p.ej. los indicados en Barsanti, *Algae: Anatomy, Biochemistry & Biotechnology*, CRC Press, 2005, como medios y métodos de cultivo de algas.

Entre los métodos de cultivo pueden incluirse la inducción de la expresión de un gen particular indicado en la presente memoria para la producción de ésteres de ácidos grasos, tales como ésteres de cera (p.ej., un gen de acil-ACP sintasa de éster de cera y opcionalmente un gen de acil-ACP reductasa formadora de alcohol) y/o para regular rutas metabólicas en el microorganismo. La inducción de la expresión puede incluir la adición de un nutriente o compuesto al medio de cultivo, la eliminación de uno o más componentes del medio de cultivo, el incremento o reducción de la luz y/o temperatura, y/o otras manipulaciones que pueden estimular la expresión del gen de interés. Dichas manipulaciones pueden depender en gran medida de la naturaleza del promotor operablemente ligado al gen de interés.

En algunas realizaciones de la presente invención, las células huésped recombinantes pueden cultivarse en un biorreactor. Los biorreactores pueden ofrecer muchas ventajas para la utilización en los métodos de crecimiento y propagación heterotrófica. Con el fin de producir biomasa para la utilización en alimentos, preferentemente se fermentan microorganismos en grandes cantidades en líquido, tal como, p.ej., en cultivos en suspensión. Los biorreactores, tales como los fermentadores de acero, pueden contener volúmenes de cultivo muy grandes (pueden utilizarse biorreactores de más de 40.000 litros de capacidad en diversas realizaciones de la invención). Los biorreactores también pueden permitir típicamente el control de una o más condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH, la tensión de oxígeno, los niveles de dióxido de carbono y similares, así como combinaciones de los mismos. Los biorreactores típicamente pueden ser configurables, por ejemplo utilizando puertos unidos a tubos, para permitir que componentes gaseosos tales como CO₂, aire enriquecido en CO₂, oxígeno y/o nitrógeno, entren en contacto con (p.ej. mediante burbujeo) un cultivo líquido. Otros parámetros de cultivo, tales como el pH del medio de cultivo, la identidad y/o la concentración de elementos traza y/o nutrientes, la identidad y/o concentración de otros constituyentes del medio, o similares, o combinaciones de los mismos, típicamente pueden ser más fácilmente manipulados utilizando un biorreactor.

En algunas realizaciones, las células (p.ej., microorganismos fotosintéticos) pueden cultivarse en un biorreactor dotado de una fuente de luz natural o artificial (un "fotobiorreactor") y/o pueden presentar una o más paredes que son suficientemente transparentes a la luz, incluyendo la luz solar, para permitir, facilitar y/o mantener un crecimiento aceptable de los microorganismos. Para la producción de ésteres de cera, las células huésped recombinantes pueden adicional o alternativamente cultivarse en matraces de agitación, probetas, viales, placas de microtitulación, placas Petri o similares, o combinaciones de los mismos.

Los microorganismos fotosintéticos manipulados genéticamente también pueden cultivarse en, p.ej., estanques, canales, zanjas, estanques de corriente, conductos o similares, o combinaciones de los mismos. Al igual que con los biorreactores estándares, puede suministrarse al cultivo una fuente de carbono inorgánico, incluyendo, aunque sin limitación, aire, aire enriquecido en CO₂, gas de escape, etc., o combinaciones de los mismos. Al suministrar gas de escape y/o otras fuentes inorgánicas que pueden contener CO además de CO₂, puede resultar necesario pretratar dichas fuentes de manera que el nivel de CO introducido en el (foto)biorreactor no constituya una dosis peligrosa y/o letal para el crecimiento y/o supervivencia de los microorganismos. En algunas realizaciones, la fuente de carbono es una fuente de carbono no reducido, p.ej., tal como, aunque sin limitación, CO₂, bicarbonato, sales de carbonato y similares. En algunas realizaciones, la fuente de carbono no proporciona una fuente de energía en la producción de un éster de ácido graso o éster de cera.

En algunas realizaciones, el éster de ácido graso o éster de cera producido por un sistema de la invención es secretado al medio de cultivo por la célula huésped recombinante. Adicional o alternativamente, el éster de ácido graso o éster de cera puede extraerse de la célula huésped recombinante. En algunas realizaciones, el éster de ácido graso o éster de cera se aísla utilizando un método indicado en la presente memoria.

En algunas realizaciones, los sistemas de la invención resultan en la producción de por lo menos 0,1, 0,5, 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 o 30 mg/l de un éster de ácido graso o éster de cera durante un periodo de cultivo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días mediante el cultivo de las células huésped recombinantes indicadas en la presente memoria.

Un éster de ácido graso producido utilizando los métodos proporcionados en la presente memoria puede presentar una cadena B de entre 6 y 14 carbonos, por ejemplo de entre 12 y 18 carbonos. Un éster de cera producido utilizando los métodos proporcionados en la presente memoria puede presentar una cadena A de entre 6 y 14 carbonos, por ejemplo de entre 12 y 18 carbonos, y una cadena B de entre 6 y 14 carbonos, por ejemplo de entre 12 y 18 carbonos.

Los sistemas de la invención tales como los indicados en la presente memoria pueden utilizar una diversidad de moléculas de ácidos nucleicos, vectores, polipéptidos y/o células huésped. En algunas realizaciones, los sistemas utilizan una o más moléculas de ácidos nucleicos, vectores, polipéptidos y/o células huésped indicados en la presente memoria. Además, los sistemas pueden utilizarse para llevar a cabo cualquiera de los métodos para producir un éster de cera tal como se indica en la presente memoria.

Debe entenderse que la exposición de la presente invención se extiende a métodos, productos y sistemas según los diversos aspectos de la invención que comprende combinaciones de una o más características comentadas en la presente memoria haciendo referencia a determinadas realizaciones de la invención, comentando en la presente memoria una o más características adicionales haciendo referencia a otras realizaciones determinadas de la invención.

Adicional o alternativamente, la presente invención puede incluir una o más de las realizaciones siguientes.

Realizaciones

Realización 1: una célula huésped recombinante manipulada genéticamente para la producción de ésteres de ácidos grasos, en la que la célula huésped recombinante comprende una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una sintasa de éster de cera capaz de producir un éster de ácido graso en una ruta independiente de acil-CoA al expresarse en la célula huésped, en la que la célula huésped recombinante no incluye una molécula de ácidos nucleicos exógena codificante de una acil-ACP tioesterasa, una molécula de ácidos nucleicos exógena codificante de una acil-CoA tioesterasa y/o una molécula de ácidos nucleicos exógena codificante de una acil-CoA sintetasa, y opcionalmente no incluye ninguna de las moléculas de ácidos nucleicos exógenas indicadas anteriormente.

Realización 2: la célula huésped recombinante según la realización 1, en la que la sintasa de éster de cera es capaz de utilizar acil-ACP como sustrato, adicionalmente en la que la sintasa de éster de cera comprende un polipéptido que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto al polipéptido de SEC ID nº 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43 o a un fragmento funcional del polipéptido de SEC ID nº 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43.

Realización 3: una célula huésped recombinante manipulada genéticamente para la producción de ésteres de cera, en la que la célula huésped recombinante comprende:

Una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera, opcionalmente en la que la acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una secuencia de identidad de por lo menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto al polipéptido de SEC ID nº 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43, o a un

fragmento funcional del polipéptido codificado por cualquiera de las SEC ID nº 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43 y

una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, opcionalmente en la que la acil-ACP reductasa formadora de alcohol comprende un polipéptido que presenta una secuencia de identidad de por lo menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto al polipéptido de SEC ID nº 2, 4, 6, 8 o 10, o a un fragmento funcional del polipéptido codificado por cualquiera de las SEC ID nº 2, 4, 6, 8 o 10, en la que la célula huésped recombinante no incluye una molécula de ácidos nucleicos exógena codificante de una acil-ACP tioesterasa, una acil-CoA tioesterasa y/o una acil-CoA sintetasa, y opcionalmente en la que la célula huésped recombinante no incluye una molécula de ácidos nucleicos exógena codificante de una acil-ACP tioesterasa, una molécula de ácidos nucleicos exógena codificante de una acil-CoA tioesterasa y una molécula de ácidos nucleicos exógena codificante de una acil-CoA sintetasa.

Realización 4: la célula huésped recombinante según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que se satisface cualquiera de las condiciones siguientes:

(a) la célula huésped no presenta una secuencia de ácidos nucleicos exógena codificante de una acil-ACP tioesterasa; la célula huésped no presenta una secuencia de ácidos nucleicos exógena codificante de una acil-CoA tioesterasa y la célula huésped no presenta una secuencia de ácidos nucleicos exógena codificante de una acil-CoA sintetasa,

(b) la célula huésped presenta una expresión atenuada o presenta una mutación que confiere actividad reducida al enzima codificado en una o más de entre una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-ACP tioesterasa, una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-CoA tioesterasa y una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-CoA sintetasa,

(c) la célula huésped no expresa uno o más de entre una acil-ACP tioesterasa, un acil-CoA tioesterasa y una acil-CoA sintetasa,

(d) la célula huésped no expresa ninguna de una acil-ACP tioesterasa, una acil-CoA tioesterasa y una acil-CoA sintetasa,

(e) la célula huésped no comprende una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-ACP tioesterasa, una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-CoA tioesterasa o una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-CoA sintetasa,

(f) la célula huésped no comprende una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-ACP tioesterasa, una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-CoA tioesterasa y una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-CoA sintetasa, Opcionalmente, las condiciones (a) y (b) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a) y (c) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a) y (d) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a) y (e) resultan satisfechas.

Opcionalmente, las condiciones (a) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (b) y (c) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (b) y (d) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (b) y (e) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (b) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (c) y (d) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (c) y (e) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (c) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (d) y (e) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (d) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (e) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (b) y (c) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (b) y (d) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (b) y (e) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (b) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (c) y (d) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (c) y (e) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (c) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (d) y (e) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (d) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (e) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (b), (c) y (d) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (b), (c) y (e) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (b), (c) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (b), (d) y (e) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (b), (d) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (b), (e) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (c), (d) y (e) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (c), (d) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (c), (e) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (d), (e) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (b), (c) y (d) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (b), (c) y (e) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (b), (c) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (b), (d) y (e) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (b), (d) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (b), (e) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (c), (d) y (e) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (c), (d) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (c), (e) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (d), (e) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (b), (c), (d) y (e) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (b), (c), (e) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (b), (d), (e) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (b), (c), (d) y (e) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (b), (c), (d) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (b), (c),

(e) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (b), (d), (e) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (b), (d), (e) y (f) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (b), (c), (d), (e) y (f) resultan satisfechas.

5 Realización 5: la célula huésped recombinante según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que se satisface cualquiera de las condiciones siguientes:

10 (a) la sintasa de éster de cera y/o la acil-ACP reductasa formadora de alcohol, en caso de hallarse presentes, son heterólogas respecto a la célula huésped recombinante, opcionalmente en las que la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la sintasa de éster de cera y/o la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol, en caso de hallarse presente, han sido optimizadas para sus codones para la expresión en la célula huésped.

15 (b) la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la sintasa de éster de cera y/o la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol se integran en el genoma de la célula huésped recombinante.

20 (c) la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la sintasa de éster de cera y/o la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol se encuentran presentes en uno o más vectores en la célula huésped recombinante. Opcionalmente, las condiciones (a) y (b) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a) y (c) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (b) y (c) resultan satisfechas. Opcionalmente, las condiciones (a), (b) y (c) resultan satisfechas.

25 Realización 6: la célula huésped recombinante según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la sintasa de éster de cera y/o la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol, en caso de hallarse presentes, se ligan operablemente a un promotor y/o intensificador, en la que el promotor y/o intensificador pueden opcionalmente ser heterólogos respecto a la célula huésped y en la que el promotor y/o intensificador pueden opcionalmente ser regulables y opcionalmente inducibles.

30 Realización 7: la célula huésped recombinante según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la sintasa de éster de cera y/o la acil-ACP reductasa formadora de alcohol es de una especie microbiana o procariótica, opcionalmente en la que la sintasa de éster de cera y la acil-ACP reductasa o ambas se derivan de una especie de *Marinobacter*, *Limnobacter*, *Alcanivorax*, *Hahella*, *Gammaproteobacterium* o *Mycobacterium*.

35 Realización 8: la célula huésped recombinante según cualquiera de las realizaciones 3 a 7, en la que tanto la secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una sintasa de éster de cera como la secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol se encuentran presentes en la célula huésped y ambas se derivan del mismo género, que opcionalmente puede ser del género *Marinobacter* o *Hahella*.

40 Realización 9: la célula huésped recombinante según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la célula huésped recombinante comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP reductasa exógena formadora de aldehído graso y/o una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP reductasa endógena formadora de aldehído graso, en las que la secuencia o secuencias de ácidos nucleicos pueden ligarse operablemente a un promotor, en el que el promotor y/o intensificador puede ser heterólogo respecto a la célula huésped y en las que el promotor y/o intensificador (u opcionalmente, ambos) pueden opcionalmente ser regulables y opcionalmente inducibles.

50 Realización 10: la célula huésped recombinante según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la producción de acil-ACP se encuentra regulada positivamente en la célula huésped recombinante.

55 Realización 11: la célula huésped según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la célula huésped recombinante expresa o produce por lo menos un polipéptido exógeno, o sobreexpresa o sobreproduce por lo menos un polipéptido endógeno, seleccionado de entre una beta-cetoacil sintetasa, una acetil-CoA carboxilasa, una malonil CoA:ACP transacilasa, una acil-ACP sintetasa, ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa, una ficobiliproteína, una proteína portadora de acilos y un transportador transmembranal.

60 Realización 12: la célula huésped recombinante según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la célula huésped recombinante presenta una expresión atenuada de una acil-ACP sintasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, acetaldehído-CoA deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa o acetato quinasa.

Realización 13: la célula huésped recombinante según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la célula huésped recombinante es una célula huésped microbiana, por ejemplo un hongo, levadura, heteroconto, microalga, cianobacteria o eubacteria.

65 Realización 14: la célula huésped recombinante según la realización 13, en la que la célula huésped recombinante es una especie de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*,

Aspergillus, Pichia, Schizochytrium, Thraustochytriales, Escherichia, Klebsiella, Bacillus, Streptomyces, Corynebacterium, Pseudomonas, Arthrobacter, Nocardia, Rhodococcus o *Gluconobacter*.

5 Realización 15: la célula huésped recombinante según cualquiera de las realizaciones 1 a 12, en la que la célula huésped recombinante es una célula huésped fotosintética, opcionalmente en la que la célula huésped recombinante es: (a) un microorganismo fotosintético, (b) una cianobacteria, (c) una especie de *Agmenellum, Anabaena, Anabaenopsis, Anacystis, Aphanizomenon, Arthrospira, Asterocapsa, Borzia, Calothrix, Chamaesiphon, Chlorogloeopsis, Chroococcidiopsis, Chroococcus, Crinalium, Cyanobium, Cyanocystis, Cyanospira, Cyanothece, Cylandrospermopsis, Cylandrospermum, Dactylococcopsis, Dermocarpella, Fischerella, Freymyella, Geitleria, Geitlerinema, Gloeobacter, Gloeocapsa, Gloeotheca, Halospirulina, Iyengariella, Leptolyngbya, Limnothrix, Lyngbya, Microcoleus, Microcystis, Myxosarcina, Nodularia, Nostoc, Nostochopsis, Oscillatoria, Phormidium, Planktothrix, Pleurocapsa, Prochlorococcus, Prochloron, Prochlorothrix, Pseudanabaena, Rivularia, Schizothrix, Scytonema, Spirulina, Stanieria, Starria, Stigonema, Symploca, Synechococcus, Synechocystis, Thermosynechococcus, Tolypothrix, Trichodesmium, Tychonema* o *Xenococcus*, (d) una microalga eucariótica, o (e) una especie de

10 *Achnanthes, Amphipora, Amphora, Ankistrodesmus, Asteromonas, Boekelovia, Borodinella, Botryococcus, Bracteococcus, Chaetoceros, Carteria, Chlamydomonas, Chlorococcum, Chlorogonium, Chlorella, Chroomonas, Chrysosphaera, Cricosphaera, Crypthecodinium, Cryptomonas, Cyclotella, Dunaliella, Ellipsoidon, Emilia, Eremosphaera, Ernodesmium, Euglena, Franceia, Fragilaria, Gloeothamnion, Haematococcus, Halocafeteria, Hymenomonas, Isochrysis, Lepocinclis, Micractinium, Monoraphidium, Nannochloris, Nannochloropsis, Navicula, Niochloris, Nephrochloris, Nephroselmis, Nitzschia, Ochromonas, Oedogonium, Oocystis, Ostreococcus, Pavlova, Parachlorella, Pascheria, Phaeodactylum, Phagus, Picochlorum, Platymonas, Pleurochrysis, Pleurococcus, Prototheca, Pseudochlorella, Pseudoneochloris, Pyramimonas, Pyrobutyrus, Scenedesmus, Skeletonema, Spyrogyra, Stichococcus, Tetraselmis, Thalassiosira, Viridiella* o *Volvox*.

25 Realización 16: un método para producir un éster de ácido graso, que comprende las etapas de cultivar una célula huésped recombinante según cualquiera de las realizaciones anteriores en un medio de cultivo adecuado y permitir la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una sintasa de éster de cera y, en caso de hallarse presente, la secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, en la que los resultados de expresión en la producción del éster graso.

30 Realización 17: el método según la realización 16, en el que el medio adecuado comprende por lo menos un alcohol de cadena corta o por lo menos un alcohol graso.

35 Realización 18: el método según la realización 16, en el que la célula huésped recombinante comprende una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una sintasa de cera y una secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, en la que el medio adecuado no comprende un alcohol de cadena corta o un alcohol graso.

40 Realización 19: el método según la realización 18, en el que el éster de cera comprende tanto una cadena A derivada de un alcohol graso como una cadena B derivada de acil-ACP que presenta longitudes de cadena de C8-C24, opcionalmente que presenta longitudes de cadena de C12-C18.

45 Realización 20: el método según cualquiera de las realizaciones 16 a 19, en el que la célula huésped recombinante es una célula huésped fotosintética, opcionalmente un microorganismo fotosintético, en el que el medio de cultivo adecuado no incluye una cantidad sustancial de una fuente de carbono reducido, además en el que la célula huésped fotosintética recombinante se expone a la luz durante por lo menos una parte del periodo de cultivo.

50 Realización 21: el microorganismo o método según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la célula huésped recombinante produce un nivel incrementado de un éster de ácido graso respecto a una célula huésped de control que no presenta la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la sintasa de éster de cera o produce un nivel incrementado del éster de cera respecto a una célula huésped de control que no presenta la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la sintasa de éster de cera y la secuencia codificante de la acil-ACP reductasa, en caso de hallarse presente, en la que la célula huésped recombinante opcionalmente produce por lo menos 50% o 100% más del éster de cera que la célula huésped de control y en la que la célula huésped recombinante

55 opcionalmente produce por lo menos 1, 2, 5 o 10 mg/l de un éster de cera.

Realización 22: el método según cualquiera de las realizaciones 16 a 21, en el que por lo menos una parte del éster de ácido graso o éster de cera producido es secretado por la célula huésped.

60 Realización 23: el método según cualquiera de las realizaciones 16 a 22, que comprende además la etapa de aislar el éster de ácido graso o éster de cera producido.

Realización 24: una composición que comprende un éster de cera aislado según el método según la realización 23, en la que el éster de cera comprende tanto una cadena A derivada de un alcohol graso como una cadena B derivada de acil-ACP que presenta longitudes de cadena de C8-C24 u opcionalmente C12-C18.

65

Realización 25: un sistema que lleva a cabo el método según cualquiera de las realizaciones 16 a 24.

Con el fin de que la presente invención se entienda mejor, se proporcionan los ejemplos siguientes. Los presentes ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no deben interpretarse en modo alguno como limitativas del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Constructos para la expresión de acil-ACP reductasas formadoras de alcohol en *Synechocystis* sp. PCC 6803

Las moléculas de ácidos nucleicos con una secuencia de Maqu_2220 de codones optimizados (SEC ID nº 11), una secuencia de un gen de *Marinobacter aquaeolei* codificante de una reductasa que es conocido que utiliza acil-CoA como sustrato, Maqu_2507 (SEC ID nº 12) o la secuencia del gen Hch_05075 de tipo salvaje (SEC ID nº 3) fueron sintetizadas químicamente mediante DNA 2.0 (Menlo Park, CA). El gen Maqu_2220 (de tipo salvaje (SEC ID nº 1) y las versiones de codones optimizados (SEC ID nº 11), el gen de reductasa Maqu_2507 (SEC ID nº 12) y el gen Hch_05075 (SEC ID nº 3) se clonaron individualmente en el vector de integración pSGE05141 "RS1" (fig. 12). Los genes se clonaron sin la adición de un promotor entre "RS1-up" (SEC ID nº 14) y "RS1-down" (SEC ID nº 15) secuencias de ADN genómico de *Synechocystis*. La región de 'aterizaje' RS1 del genoma de *Synechocystis*, que comprende las secuencias 2298515 a 2300500 (secuencia genómica número de acceso AP012205.1; GI:339272262) y utilizada para la recombinación homóloga incluye el gen slr0338 de la familia de oxidoreductasas (de unión a NAD pliegue Rossmann; número de acceso de proteína de NCBI BAA10046; gi:1001423) y es próxima a slr0168 (marco de lectura abierto hipotético; número de acceso de proteína de NCBI BAA10047; gi:1001424). La secuencia "RS1-up" incluye aproximadamente 830 nucleótidos de secuencia cadena arriba del gen slr0338, así como aproximadamente 158 nucleótidos del extremo 5' del gen slr0338. La clonación de un gen cadena abajo de dicha secuencia (tal como se ilustra en la fig. 12) puede permitir que secuencias de expresión génica de la secuencia genómica "RS1-up" medien en la transcripción del transgén de reductasa.

Con el fin de introducir los genes Maqu_2220 de tipo salvaje y de codones optimizados del gen Maqu_2507 y el gen Hch_05075 de *H. chejuensis* en cianobacterias, se cultivaron células *Synechocystis* sp. PCC 6803 se cultivaron en medio BG-11 hasta una DO (730 nm) de aproximadamente 0,7 a 0,9. Aproximadamente 10 ml del cultivo se pelletizaron a aproximadamente 2.000 g durante 15 minutos y después se resuspendió el pellet celular en 1 ml de medio BG-11 fresco. Se transformó una alícuota de 300 µl de células con aproximadamente 100 ng de vector de integración. Las células se incubaron bajo luz (80 µE) durante aproximadamente 6 horas y después se extendieron sobre filtros Minipore y se aplicaron en placas de agar BG-11 que no contenían antibióticos. Las placas se incubaron a aproximadamente 30°C bajo aproximadamente 80 µE de luz durante aproximadamente 24 horas. A continuación, se transfirieron los filtros a placas de agar al 1,5% BG-11 fresco con 20 µg/ml de canamicina y se cultivaron durante 7 días. Se recolectaron las colonias de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y se aplicaron sobre placas de agar nuevas.

Tabla 2: Medio BG-11 ATCC 616 para cianobacterias

NaNO ₃	1,5 g	
K ₂ HPO ₄	0,04 g	
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,075 g	
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,036 g	
Ácido cítrico	6,0 mg	
Citrato de amonio férrico	6,0 mg	
EDTA	1,0 mg	
Na ₂ CO ₃	0,02 g	
Mezcla de metales traza A5 [#]	1,0 ml	
Agar (en caso necesario)	(hasta) 10,0 g	
Agua destilada	1,0 l	
Mezcla de metales traza A5		
	H ₃ BO ₃	2,86 g
	MnCl ₂ * 4H ₂ O	1,81 g
	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0,22 g
	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,39 g
	CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,080 g
	Co(NO ₃) ₂ * 6H ₂ O	49,4mg
	Agua destilada	hasta 1,0 l

Ejemplo 2: producción de alcohol graso por cepas de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que expresan acil-ACP reductasas formadoras de alcohol

Los cultivos de *Synechocystis* sp. PCC 6803 transformados por el gen Maqu_2220 de tipo salvaje, el gen Maqu_2220 de codones optimizados o el gen Maqu_2507 se cultivaron para someter a ensayo la producción de

alcohol graso. Se inocularon tres zonas de colonias diferentes de cada clon en 20 ml de viales de centelleo de vidrio que contenían 10 ml de medio líquido BG-11 con 50 µg/ml de canamicina. El medio BG-11, que no incluye una cantidad sustancial de una fuente de carbono reducido, permite el crecimiento fotoautotrófico de *Synechocystis*. Se taparon los cultivos con cinta de material filtrante. Los viales de centelleo se incubaron a aproximadamente 30°C con CO₂ ambiente aproximadamente 5% y se agitó continuamente a aproximadamente 200 rpm bajo aproximadamente 70 µE de luz durante 7 días. A continuación, se peletizaron 5 ml de cada cultivo a aproximadamente 5.000 rpm y se resuspendieron en 0,4 ml de agua, después se extrajeron con un sistema de solventes de hexano/ácido sulfúrico para extraer lípidos neutros.

5 Ejemplo 3: cromatografía de gases de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que expresa una acil-ACP reductasa formadora de alcohol

Las cepas de *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultivadas tal como anteriormente se analizaron mediante cromatografía de gases para la producción de alcohol graso.

15 Un dispensador de inóculo y un tubo de centrifuga de 2,0 ml se utilizaron para añadir 0,5 ml de perlas de vidrio lavadas con ácido de 212 a 300 µm a las muestras. A continuación, se añadieron 50 µl de H₂SO₄ al 50% y 100 µl de NaCl 5 M. Las muestras se introdujeron en el modelo 2010 del aparato SPEX GenoGrinder para la rotura de las perlas durante 5 min a 1.000 rpm con el fin de lisar las células. Tras la rotura de las perlas, se añadieron 2 ml de hexanos, se taparon los viales y se rompieron las perlas repetidamente durante 5 min a 1.000 rpm. A continuación, las muestras se agitaron con vórtex en un agitador vórtex multitubo durante 30 min a 1.000 rpm y después durante 20 30 s a 2.500 rpm. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 4 min a 2.000 rpm. Se transfirieron 0,5 ml de la capa de hexanos (superior) a un vial de CG de 2,0 ml y se añadieron 50 µl de estándar interno (1 mg/ml de 1-pentadecanol en CH₂Cl₂) hasta una concentración final de estándares internos de 100 µg/ml. A continuación, los 25 viales se agitaron con vórtex y se analizaron mediante CG/EM-SCAN/SIM. Las condiciones de la tanda de CG fueron las siguientes: H₂ 1,4 ml/min con una temperatura de horno de 100°C durante 0,5 min, después se incrementó a razón de 20°C/min hasta 270°C y se mantuvo durante 1 min. El tiempo de espera del solvente se fijó en 4,3 min. Se llevó a cabo una inyección de 1 µl en una entrada a 280°C utilizando una división 3:1 y que contenía un único revestimiento de cuello de cisne desactivado con lana de vidrio. La columna de CG era un Agilent HP-5MS, 30 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. El rango de barrido del espectrómetro de masas se fijó para m/z 35 a 275, los iones SIM monitorizados fueron 55,0 y 41,0 y se utilizó un tiempo de toma de muestras de 10 ms. Se cuantificaron los analitos mediante una curva de calibración de 5 puntos entre 2 y 200 µg/ml. La fig. 13A muestra un registro de CG del extracto de *Synechocystis* transformado con el gen de acil-CoA reductasa Maqu_2507, que no mostraba picos de alcohol graso, y la fig. 13B muestra un registro de CG de un transformante que expresa el gen Maqu_2220 de 35 codones optimizados (SEC ID nº 11), que muestra picos para los alcoholes grasos C16 y C18.

La fig. 14 muestra que la expresión del ADN de Maqu_2220 de tanto tipo salvaje (aislados 5074) como de codones optimizados (aislados 5075) en *Synechocystis*, que no presenta acil-CoA, resultó en la producción de alcoholes C16 y C18. En contraste, la expresión de ADN de Maqu_2507 (aislados 5076) no resultó en ninguna producción detectable de alcohol, demostrando que la reductasa Maqu_2507 de control (SEC ID nº 13) no producía niveles detectables de alcoholes grasos en un cultivo de 7 días de *Synechocystis*, una especie que no produce acil-CoA.

45 Ejemplo 4: producción de alcohol graso en cepas de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que expresan acil-ACP reductasa formadora de alcohol

Se cultivaron células de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que comprendía el gen Hch_05075 en 25 ml de medio BG-11 en matraces de vidrio de 125 ml, agitando bajo aproximadamente 80 µE de luz en presencia de 1% de CO₂, durante diez días. Se peletizó el cultivo entero y se resuspendió en 0,4 ml de agua y después se extrajo con un sistema de solventes hexano/ácido sulfúrico para extraer los lípidos neutros. A modo de control, se cultivó la cepa 50 *Synechocystis* sp. PCC 6803 que no presentaba un constructo de gen de reductasa y se extrajo mediante el mismo método.

La fig. 15 demuestra la producción de alcohol graso por *Synechocystis* sp. PCC 6803 que expresa el gen de reductasa Hch_05075 ("Hahella FAR", SEC ID nº 3) sin producción de alcohol graso detectado en la cepa huésped no transformada ("Wt 6803").

55 Ejemplo 5: producción de éster de cera en *Synechocystis* sp. PCC 6803 que expresa una acil-ACP reductasa formadora de alcohol y una acil-ACP sintasa de éster de cera

60 Con el fin de medir la producción de éster de cera independiente de acil-CoA en una célula huésped fotosintética que expresaba una acil-ACP reductasa formadora de alcohol graso y una acil-ACP sintasa de éster de cera, se transformó *Synechocystis* sp. PCC 6803 con un vector que presentaba secuencias para: (1) Maqu_2220 y WS1 (la secuencia de ácidos nucleicos del constructo de dos genes se proporciona como SEC ID nº 46) y (2) Maqu_2220 y aciltransferasa de *Petunia x hybrida* ("Petunia WS", GenBank nº de acceso AAZ9058051.1; la secuencia de ácidos nucleicos del constructo de dos genes se proporciona como SEC ID nº 47). Se ha demostrado que *Petunia* WS produce ésteres de cera en *Synechocystis* manipulada para expresar una acil-ACP tioesterasa, una acil-CoA

5 sintetasa y una reductasa formadora de alcohol además de la Petunia WS, tal como se muestra en la solicitud provisional de patente estadounidense de titularidad compartida n° 61/539.640, presentada el 27 de septiembre de 2011, titulada "Fatty Alcohol Forming Acyl-ACP Reductases". La fig. 16 proporciona un mapa del vector de dos genes en el que WS1 es el gen de sintasa de éster de cera. Se situó un sitio de unión ribosómica desde el promotor trcE (SEC ID n° 48) en el lado 5' del gen de acil-ACP reductasa y en el lado 5' del gen de sintasa de éster de cera en cada uno de los constructos (etiquetados como 'rbs' en la fig. 16). Tal como en el Ejemplo 1, se clonó el operón de dos genes en el vector sin un promotor; la secuencia genómica en la que se inserta el operón probablemente incluye un promotor responsable de la expresión del operón. La región de aterrizaje utilizada para la recombinación homóloga era la región "RS1" del genoma de *Synechocystis* que incluía los genes slr0338 de la familia de oxidorreductasa (pliegue de Rossman de unión a NAD) y slr0168 (marco de lectura abierta hipotético).

15 El ADN_g de Maqu_2220 se amplificó por PCR a partir de una cepa de tipo salvaje de *Marinobacter* aislada a partir de un estanque de pesca en Pacific Aquafarms situado al norte de Salton Sea en California del Sur. Las sintasas de éster de cera y Maqu_2220 se sintetizaron y se clonaron químicamente en los vectores mediante DNA 2.0. Las transformaciones se llevaron a cabo en células de *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultivadas en medio BG-11 hasta una DO (730 nm) de aproximadamente 0,7 a 0,9. Se peletizaron cultivos de aproximadamente 10 ml de *Synechocystis* sp. PCC 6803 a aproximadamente 2.000 g durante aproximadamente 15 minutos. El pellet celular resultante se resuspendió en aproximadamente 1 ml de medio BG-11 fresco. A continuación, se transformó una alícuota de 300 µl de las células con aproximadamente 100 ng de vector de integración.

20 Las células transformadas se incubaron bajo luz (~80 µE) durante aproximadamente seis horas. A continuación, se extendieron las células sobre filtros Minipore y se aplicaron sobre placas de agar BG11 que no contenía antibióticos. Las placas se incubaron a aproximadamente 30°C bajo aproximadamente 80 µE de luz durante aproximadamente 24 horas. Seguidamente los filtros se transfirieron a placas de agar BG11 frescas con aproximadamente 10 µg/ml de canamicina y se cultivaron durante aproximadamente 7 días.

25 Se recolectaron colonias de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (cultivadas sobre placas de agar al 1,5% BG-11 que contenían aproximadamente 10 µg/ml de canamicina) y se inocularon en viales de centelleo de vidrio de 4 ml que contenían aproximadamente 1,5 ml de medio líquido BG-11 con aproximadamente 10 µg/ml de canamicina, respectivamente. A modo de control se utilizaron *Synechocystis* sp. PCC 6803 ("6803 wt") no transformadas. Los cultivos se taparon con cinta de material filtrante para permitir la respiración. Los viales de centelleo se cultivaron con aproximadamente 5% de CO₂ a aproximadamente 30°C y se agitaron continuamente a aproximadamente 200 rpm bajo aproximadamente 80 µE de luz durante 7 días. Durante el curso del periodo de cultivo, se redujo el volumen de los cultivos a aproximadamente 1 ml mediante evaporación.

35 Al final del periodo de cultivo, los cultivos se peletizaron a aproximadamente 2.000 rpm, se decantó el medio de cultivo y se añadieron nuevamente 0,4 ml de agua al tubo. A continuación, se agitó con vórtex el tubo y la mezcla se añadió a un vial de vidrio de 4 ml utilizando una pipeta de vidrio. A dicho vial se añadieron 0,5 ml de perlas de vidrio lavadas con ácido de 212 a 300 µm, 50 µl de H₂SO₄ al 50% y 100 µl de NaCl 5 M. Se taparon los viales y las células se lisaron utilizando un molinillo de perlas (modelo 2010 de SPEX GenoGrinder). Se añadieron 2 ml adicionales de hexanos y se repitió la molienda de perlas, seguido de la agitación con vórtex de las muestras en un agitador de vórtex multitubo durante 30 min a 1.000 rpm y después durante 30 s a 2.500 rpm. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 4 min a 2.000 rpm. Se transfirieron 0,5 ml de la capa de hexanos (superior) a un vial de CG de 2,0 ml y se añadieron 50 µl de estándar interno (1 mg/ml de 6-cetocolesterol en tolueno) hasta una concentración final de estándar interno de 100 µg/ml. A continuación, los viales se agitaron con vórtex y se analizaron mediante HPLC-ELSD (por sus siglas en inglés, cromatografía líquida de alto rendimiento-detector evaporativo de dispersión de la luz). Se utilizó un HPLC Agilent serie 1200 dotado de una bomba binaria y una columna ES Industries Chromegasphere SI-60 de 150 mm x 4,6 mm, de 10 µm de poro con el sistema de solventes siguiente: eluyente A: hexanos; eluyente B: hexanos/isopropanol/acetato de etilo/ácido fórmico al 10% en isopropanol en una proporción 80:10:10:1. Se utilizó una inyección de 20 µl; se fijó el caudal en 2 ml/min; el compartimiento de la columna se fijó en 40°C y se inició el gradiente de solvente en 98% de eluyente A, 2% de eluyente B y se fue incrementando hasta 2% de eluyente A, 98% de eluyente B durante una tanda de 9 minutos. Se fijó el ELSD a 30°C, 3,5 bar de N₂ y se utilizó una ganancia de 5. Se cuantificaron los analitos mediante una curva de calibración de 8 puntos entre 1,5 y 100 µg/ml.

55 Tal como se muestra en la fig. 17, la expresión de WS1 con Maqu_2220 resultó en la producción de alcohol graso y ésteres de cera ("5175 (WS1)"). en contraste, la expresión de Petunia WS con Maqu_2220 resultó en la producción de alcohol graso pero no de ésteres de cera ("5174 (Petunia WS)"). La cepa huésped no transformada no mostró producción de alcohol graso o de ésteres de cera ("6803 ctrl neg"). Debido a que *Synechocystis* sp. PCC 6803 no produce acil-CoA, dichos datos demuestran que la sintasa de éster de cera WS1 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, pero no sintasa de éster de cera de Petunia, utiliza acil-ACP como sustrato de acil-tioéster en la reacción de condensación con alcohol graso para formar ésteres de cera.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ExxonMobil Research and Engineering Company

<120> ACIL-ACP SINTASAS DE ÉSTER DE CERA

<130> 2012EM040 / 16244-000013/US

5 <160> 48

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1542

<212> ADN

10 <213> Marinobacter aquaeolei

<400> 1

tcaggcagct	tttttgcgct	ggcgcgcggt	tttcagactg	tacacctttc	gttctttcag	60
ggcatagcga	ttgagcccgg	ccaggtgaat	cttgccgagg	tagagctccc	agtcaatcag	120
gcgggcatcc	accgggaaca	gccctttatc	gacctcacc	atccggttcg	ccagcgcctat	180
cagctcatcg	ttccggaaga	tataatccgg	cgcggtgtag	aaaccaaaaa	tggttgccag	240
cgactgggtg	gtatccagat	tcctgagcat	tttcaggtcc	cggaatttc	ccagtaattt	300
gagcacacgg	tccgtcaggg	agagcggtaa	gcgaacacca	ctgatcacca	aatcaaacag	360
cgcccggtta	accgccagaa	acggcttgct	gggctgccgg	tagaacaggt	gatcgtaggc	420
agcgttaattg	gcttttgatt	ccgccatgag	atgatcgatg	aactcaccca	gggagattgg	480
attgccgccc	ccgctgcaac	attgatagat	gcgacgtcga	ccgggttctc	caagagcttc	540
cgccagggaa	aggatgatgg	agttggccac	caggtccact	ggaatcacat	cgatgatacc	600
ggagcgtttg	cccgggaaga	gggtgacttt	ttcccgtgcg	taagccagga	tgatggcatc	660
tgccaccttc	accccctcaa	tccagccggg	cgctggttcc	tccagggcac	tttcgataat	720
cgaaggacgc	agaatggtca	gcgtgcgccc	gtttaacgcc	ttcatcagca	actgttcgcc	780
cagccacttg	gtaaagggtg	aggtatcgct	ccagccatag	cggttggtt	cccgaatccc	840
caggtccacc	agcttcctct	ccagcacttt	gccggaataa	cgggcctgaa	cgtcttcaat	900
tttatcctga	agcaggcgaa	caagctcttc	tatctcatag	aagccgtccg	gggaacgcgg	960
cacggcctcg	cctgccggct	tgatcacoga	ttcggttacc	tgccccgagt	tcatgccatt	1020
gacatagcag	gtggagacct	gcaggaccgc	aagcttcgga	ttcaaatcca	ccatgccggc	1080
aatattccga	aggcacaggg	tgttgatggc	cagcgccttg	tcgagctctt	cacggaatt	1140
cacgcttgca	gcggagttga	tcaccgcata	cagttcggtg	gcgagtttgc	gatagtcttc	1200
ctgccctatc	ccgaaaccgg	cttcggtcac	ctcaccggtc	acgcagtgaa	tgcgctcttc	1260
cagaaaggcg	tcaaatccct	ctgaatcggc	ctcgcgaaga	cggtaaaca	ccgaggaggt	1320
ggcaatttct	tccaggaaac	gggaacgagc	atccggatgc	cgtttattgc	cccggatcag	1380

ES 2 678 647 T3

caggtaaatt gcgccgatat caggcacogc ccgaatcagc ctttcgagga ccaccttgcc 1440
 cagaaagcca gtggtaccgg tgatcagaac ccgcttgcca cggagctgtc cgagcacctt 1500
 tgatgatgaa gtgtcagcgt gatgtacctg ctgtattgcc at 1542

<210> 2
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> Marinobacter aquaeolei

5

<400> 2
 Met Ala Ile Gln Gln Val His His Ala Asp Thr Ser Ser Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Leu Gly Gln Leu Arg Gly Lys Arg Val Leu Ile Thr Gly Thr Thr Gly
 20 25 30
 Phe Leu Gly Lys Val Val Leu Glu Arg Leu Ile Arg Ala Val Pro Asp
 35 40 45
 Ile Gly Ala Ile Tyr Leu Leu Ile Arg Gly Asn Lys Arg His Pro Asp
 50 55 60
 Ala Arg Ser Arg Phe Leu Glu Glu Ile Ala Thr Ser Ser Val Phe Asp
 65 70 75 80
 Arg Leu Arg Glu Ala Asp Ser Glu Gly Phe Asp Ala Phe Leu Glu Glu
 85 90 95
 Arg Ile His Cys Val Thr Gly Glu Val Thr Glu Ala Gly Phe Gly Ile
 100 105 110
 Gly Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Leu Ala Thr Glu Leu Asp Ala Val Ile
 115 120 125
 Asn Ser Ala Ala Ser Val Asn Phe Arg Glu Glu Leu Asp Lys Ala Leu
 130 135 140
 Ala Ile Asn Thr Leu Cys Leu Arg Asn Ile Ala Gly Met Val Asp Leu
 145 150 155 160
 Asn Pro Lys Leu Ala Val Leu Gln Val Ser Thr Cys Tyr Val Asn Gly
 165 170 175
 Met Asn Ser Gly Gln Val Thr Glu Ser Val Ile Lys Pro Ala Gly Glu
 180 185 190

ES 2 678 647 T3

Ala Val Pro Arg Ser Pro Asp Gly Phe Tyr Glu Ile Glu Glu Leu Val
 195 200 205

Arg Leu Leu Gln Asp Lys Ile Glu Asp Val Gln Ala Arg Tyr Ser Gly
 210 215 220

Lys Val Leu Glu Arg Lys Leu Val Asp Leu Gly Ile Arg Glu Ala Asn
 225 230 235 240

Arg Tyr Gly Trp Ser Asp Thr Tyr Thr Phe Thr Lys Trp Leu Gly Glu
 245 250 255

Gln Leu Leu Met Lys Ala Leu Asn Gly Arg Thr Leu Thr Ile Leu Arg
 260 265 270

Pro Ser Ile Ile Glu Ser Ala Leu Glu Glu Pro Ala Pro Gly Trp Ile
 275 280 285

Glu Gly Val Lys Val Ala Asp Ala Ile Ile Leu Ala Tyr Ala Arg Glu
 290 295 300

Lys Val Thr Leu Phe Pro Gly Lys Arg Ser Gly Ile Ile Asp Val Ile
 305 310 315 320

Pro Val Asp Leu Val Ala Asn Ser Ile Ile Leu Ser Leu Ala Glu Ala
 325 330 335

Leu Gly Glu Pro Gly Arg Arg Arg Ile Tyr Gln Cys Cys Ser Gly Gly
 340 345 350

Gly Asn Pro Ile Ser Leu Gly Glu Phe Ile Asp His Leu Met Ala Glu
 355 360 365

Ser Lys Ala Asn Tyr Ala Ala Tyr Asp His Leu Phe Tyr Arg Gln Pro
 370 375 380

Ser Lys Pro Phe Leu Ala Val Asn Arg Ala Leu Phe Asp Leu Val Ile
 385 390 395 400

Ser Gly Val Arg Leu Pro Leu Ser Leu Thr Asp Arg Val Leu Lys Leu
 405 410 415

Leu Gly Asn Ser Arg Asp Leu Lys Met Leu Arg Asn Leu Asp Thr Thr
 420 425 430

Gln Ser Leu Ala Thr Ile Phe Gly Phe Tyr Thr Ala Pro Asp Tyr Ile
 435 440 445

ES 2 678 647 T3

Phe Arg Asn Asp Glu Leu Met Ala Leu Ala Asn Arg Met Gly Glu Val
 450 455 460

Asp Lys Gly Leu Phe Pro Val Asp Ala Arg Leu Ile Asp Trp Glu Leu
 465 470 475 480

Tyr Leu Arg Lys Ile His Leu Ala Gly Leu Asn Arg Tyr Ala Leu Lys
 485 490 495

Glu Arg Lys Val Tyr Ser Leu Lys Thr Ala Arg Gln Arg Lys Lys Ala
 500 505 510

Ala

<210> 3

<211> 1518

<212> ADN

5 <213> *Hahella chejuensis*

<400> 3

ttacgcagcg cggctgcgag gttttgctgc aggcgggttc atcttcacca ctttcggcgc	60
cagcgcgtac ttgttcagac cgcaccgtg aacttcccgc aagtagtgcg cccagtcata	120
catacccgca ttcacgggga attcgctctg gtcatatcc ccaagacggg tggatagctc	180
ctgcagacgg cggttgctga aggtatagct gggagaggta tagaaggaaa acaccttggg	240
cagtttcacg gtagtttcca tggtgctcag cttgcgcccg gaagccttac ggccaaacaa	300
gctctgcaga cgggaactcc atttcagcat gtggaaactg atcgccatca acgcgtgaaa	360
cacggcgccg ggaatcatta caaagggtt cttcggcttg cggtagaaca gtttgctgtg	420
cgtctgataa ttgtgctcgg cctcttgctg cacatgccca atgacttccc gaatcctgat	480
tggattaacc tcgctgctgc aacactggta gatgcgatgg gcgccggaat ccagcagcgc	540
ttccgtggcg ctcaggatga tgctgttggc caccagggtc gccggaatga tatcaatgac	600
cgcattcttc ttgcccggaa acaagacac cttttctctg gcgtaagcga ggatgatcgc	660
atccgccact ttcaccccct caatccagcc cggcgcgggt cccagcagcg tactttcaac	720
aatggaaggt cgcaggatgg tcagggtttt gccatacagc tccttcatca gcaactgctc	780
gcccacccat ttagtgaagg tataggtatc gttccaacca tacttattgg cttctttgat	840
accaggtcgc ataagatcct tttccctgct atgatcatcc gcgcagcgc cggacacttg	900
ctctacatcc tgcagcaaac gcgcaatcag cggctcaact tcatagtagc cgcgttctga	960
acgctcaatg cgttctcccg cgggctgac gatttctct tccatcactc cctgattgaa	1020
gccgttgacg tagcaggtgg atacctgcac gacagggcag tccgccgcgc gccgcgacag	1080

ES 2 678 647 T3

ttcaatgata tttttaaggc acagggtatt gatggtgaga gcctgatcca gcgcttcgcg 1140
 gaaattgacg ctggcgggctg aattgataat aacgctgata tctgcgggcca ggtcggtaaa 1200
 gtccttctcc gacaggccaa acagaggctc cgtcacctct ccggtcacgc agtggatgcg 1260
 ggtttcgcac aactcctcga aacgacttcc ctgcatgcc ttgagagtat cgaaaataga 1320
 tgaggtcgcg atctcattct ggaaccgctt tcgcgctgta gggttctttg aattaccccg 1380
 tatcagcaaa taaatcttcc caattgctcg cacgctgcgc agcagcttct ccagtaccac 1440
 cttgccgacg aatcccgctg tccccgtaat cagtacattc ttattagcaa aagcagttaa 1500
 cgtaagtgat tgcttcat 1518

<210> 4
 <211> 505
 <212> PRT
 <213> Hahella chejuensis

5

<400> 4
 Met Lys Gln Ser Leu Thr Leu Thr Ala Phe Ala Asn Lys Asn Val Leu
 1 5 10 15
 Ile Thr Gly Thr Thr Gly Phe Val Gly Lys Val Val Leu Glu Lys Leu
 20 25 30
 Leu Arg Ser Val Pro Thr Ile Gly Lys Ile Tyr Leu Leu Ile Arg Gly
 35 40 45
 Asn Ser Lys Asn Pro Thr Ala Arg Lys Arg Phe Gln Asn Glu Ile Ala
 50 55 60
 Thr Ser Ser Ile Phe Asp Thr Leu Lys Ala Ser Gln Gly Ser Arg Phe
 65 70 75 80
 Glu Glu Leu Cys Glu Thr Arg Ile His Cys Val Thr Gly Glu Val Thr
 85 90 95
 Glu Pro Leu Phe Gly Leu Ser Glu Lys Asp Phe Thr Asp Leu Ala Ala
 100 105 110
 Asp Ile Asp Val Ile Ile Asn Ser Ala Ala Ser Val Asn Phe Arg Glu
 115 120 125
 Ala Leu Asp Gln Ala Leu Thr Ile Asn Thr Leu Cys Leu Lys Asn Ile
 130 135 140
 Ile Glu Leu Ser Arg Arg Ala Ala Asp Cys Pro Val Val Gln Val Ser
 145 150 155 160

ES 2 678 647 T3

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

ES 2 678 647 T3

Leu Ser Asn Met Glu Thr Thr Met Lys Leu Ser Lys Val Phe Ser Phe
 420 425 430

Tyr Thr Ser Pro Ser Tyr Thr Phe Ser Asn Arg Arg Leu Gln Glu Leu
 435 440 445

Ser Thr Arg Leu Gly Glu Tyr Asp Gln Ser Glu Phe Pro Val Asn Ala
 450 455 460

Gly Met Tyr Asp Trp Ala His Tyr Leu Arg Glu Val His Val Ala Gly
 465 470 475 480

Leu Asn Lys Tyr Ala Leu Arg Pro Lys Val Val Lys Met Asn Pro Pro
 485 490 495

Ala Ala Lys Pro Arg Ser Arg Ala Ala
 500 505

<210> 5

<211> 1539

<212> ADN

5 <213> Marinobacter algicola

<400> 5

atggcaaac agcagcaaca aaacggagcg tcagcgtccg gtgttcttga gcaactacgt 60
 ggtaaacacg tgctgatcac cggcaccacc gggtttcttg gtaaggtggt actggaaaaa 120
 ttgattcgca cggtgccgga tattggcggg atccatcttc ttatccgtgg taacaaaagg 180
 catcctgcag cacgggaacg attcctcaac gagatcgcca gttcttccgt gttcgaacgc 240
 cttcggcacg atgacaacga ggcgtttgaa acctttcttg aggaacgcgt tcaactgcatc 300
 accggcgaag tgacagagtc gcgtttcggg ctacgcccg agcggttccg tgcacttgcc 360
 gggcaggctg atgcgtttat aaattccgca gccagtgtga acttccggga ggaactcgac 420
 aaggcgctga agattaacac cctgtgcctg gagaacggtg ccgctctggc ggagctcaat 480
 agcgcctatg cggttatcca ggtgtccacc tgctacgtca atggcaagaa ttccggccag 540
 atcacggagt ccgtcatcaa gccggcgggc gagtctatc cccgcagcac cgacggctac 600
 tatgaaatcg aagagcttgt gcatttgctg caggacaaaa tttccgacgt gaaagccoga 660
 tactccggca aagtacttga aaaaaagctg gtggacctgg ggattcgaga ggccaacaac 720
 tacggctgga gtgacaccta cacgtttacc aaatggctgg gtgagcaact cctgatgaaa 780
 gccctttccg ggcgttcact tacgattggt cgccttcca tcattgaaag tgcactggaa 840
 gagccttgc caggatggat tgaaggtgtg aagtggtcag acgccattat ccttgctat 900
 gcccgtaga aggtctccct gttcccaggc aagcgtagcg gcattatcga tgtgatcccg 960

ES 2 678 647 T3

gtggacctgg tggccaacag tatcatcttg tccttggcag aagccctttc cgggtcaggg 1020
 cagcgcgcga tctatcaatg ctgcagtggc ggttctaatac cgatttcgct gggcaagttc 1080
 attgactacc tgatggccga agccaagacc aactatgcag cgtatgacca gttgttctac 1140
 cgacggccca cgaaacctgt tgtggcggtc aatcgcaagc tgtttgatgt tgtggttggc 1200
 ggcatgcgcg tgccgttgtc gattgctggc aaggcaatga ggctggctgg ccagaacctg 1260
 gagctcaagg ttctcaaaaa cctcgatacc acgcgttcac tggccaccat ctttggtttc 1320
 tacacggcac cggattacat cttccgtaac gattcgtgta tggccctggc ttcgcgcatg 1380
 ggtgaactgg accgtgtcct gttcccggtg gatgcgcgtc agattgactg gcagctgtac 1440
 ttgtgcaaga tccacctggg aggtctcaac cgctacgctc tgaaggagcg aaaactgtac 1500
 agcctgcggg ccgccgacac ccgcaaaaaa gccgcctga 1539

<210> 6
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Marinobacter algicola

5

<400> 6
 Met Ala Thr Gln Gln Gln Gln Asn Gly Ala Ser Ala Ser Gly Val Leu
 1 5 10 15
 Glu Gln Leu Arg Gly Lys His Val Leu Ile Thr Gly Thr Thr Gly Phe
 20 25 30
 Leu Gly Lys Val Val Leu Glu Lys Leu Ile Arg Thr Val Pro Asp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile His Leu Leu Ile Arg Gly Asn Lys Arg His Pro Ala Ala
 50 55 60
 Arg Glu Arg Phe Leu Asn Glu Ile Ala Ser Ser Ser Val Phe Glu Arg
 65 70 75 80
 Leu Arg His Asp Asp Asn Glu Ala Phe Glu Thr Phe Leu Glu Glu Arg
 85 90 95
 Val His Cys Ile Thr Gly Glu Val Thr Glu Ser Arg Phe Gly Leu Thr
 100 105 110
 Pro Glu Arg Phe Arg Ala Leu Ala Gly Gln Val Asp Ala Phe Ile Asn
 115 120 125
 Ser Ala Ala Ser Val Asn Phe Arg Glu Glu Leu Asp Lys Ala Leu Lys
 130 135 140

ES 2 678 647 T3

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

Ser Ala Met Ala Val Ile Gln Val Ser Thr Cys Tyr Val Asn Gly Lys
165 170 175

Asn Ser Gly Gln Ile Thr Glu Ser Val Ile Lys Pro Ala Gly Glu Ser
180 185 190

Ile Pro Arg Ser Thr Asp Gly Tyr Tyr Glu Ile Glu Glu Leu Val His
195 200 205

Leu Leu Gln Asp Lys Ile Ser Asp Val Lys Ala Arg Tyr Ser Gly Lys
210 215 220

Val Leu Glu Lys Lys Leu Val Asp Leu Gly Ile Arg Glu Ala Asn Asn
225 230 235 240

Tyr Gly Trp Ser Asp Thr Tyr Thr Phe Thr Lys Trp Leu Gly Glu Gln
245 250 255

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

Ser Ile Ile Glu Ser Ala Leu Glu Glu Pro Ser Pro Gly Trp Ile Glu
275 280 285

Gly Val Lys Val Ala Asp Ala Ile Ile Leu Ala Tyr Ala Arg Glu Lys
290 295 300

Val Ser Leu Phe Pro Gly Lys Arg Ser Gly Ile Ile Asp Val Ile Pro
305 310 315 320

Val Asp Leu Val Ala Asn Ser Ile Ile Leu Ser Leu Ala Glu Ala Leu
325 330 335

Ser Gly Ser Gly Gln Arg Arg Ile Tyr Gln Cys Cys Ser Gly Gly Ser
340 345 350

Asn Pro Ile Ser Leu Gly Lys Phe Ile Asp Tyr Leu Met Ala Glu Ala
355 360 365

Lys Thr Asn Tyr Ala Ala Tyr Asp Gln Leu Phe Tyr Arg Arg Pro Thr
370 375 380

Lys Pro Phe Val Ala Val Asn Arg Lys Leu Phe Asp Val Val Val Gly

ES 2 678 647 T3

385	390	395	400
Gly Met Arg Val Pro Leu Ser Ile Ala Gly Lys Ala Met Arg Leu Ala	405	410	415
Gly Gln Asn Arg Glu Leu Lys Val Leu Lys Asn Leu Asp Thr Thr Arg	420	425	430
Ser Leu Ala Thr Ile Phe Gly Phe Tyr Thr Ala Pro Asp Tyr Ile Phe	435	440	445
Arg Asn Asp Ser Leu Met Ala Leu Ala Ser Arg Met Gly Glu Leu Asp	450	455	460
Arg Val Leu Phe Pro Val Asp Ala Arg Gln Ile Asp Trp Gln Leu Tyr	465	470	475
Leu Cys Lys Ile His Leu Gly Gly Leu Asn Arg Tyr Ala Leu Lys Glu	485	490	495
Arg Lys Leu Tyr Ser Leu Arg Ala Ala Asp Thr Arg Lys Lys Ala Ala	500	505	510

<210> 7
 <211> 1536
 <212> ADN

5 <213> Marinobacter adhaerens

<400> 7		
	atggcaacac agcagctgaa tcccgatgca tcatcaaaag tacttgagcg gctccggggc	60
	aagcacgttc tgattaccgg caccacgggc tttctoggca aggtggttct ggaaaagctc	120
	attcgcgccg ttccggacat aggcggcatt catctgctga tccgtgaaa caaacgtcac	180
	cccgatgcgc gggatcgttt ttttgaggag atcgccacgt cgtcagtctt cgatcgtctg	240
	cgccaggacg ataacgaggc ttttgaaacc ttcattgaag atcgtgtgca ttgcgtaacc	300
	ggggaagtga ccgagccttt gtttggctcg tccgctgacc gtttccgcaa gctggctggc	360
	ggcatcgatg tggttgtaa ctccgcagcc agtgtgaact tccgggaaga gcttgataaa	420
	gcgcttgcca tcaatacccg ttgcctcgac aacgtggccg agcttgccg acagaacaag	480
	tcgctggcgg tgctgcaggt ttccacctgc tatgtaaagc gcatgaattc cggacagatc	540
	acggagaccg tgatcaagcc ggcaggtgag gccatacccc ggagcactga aggttactat	600
	gagatcgaag aacttgctcc gctgctggag gacaagatag cggacgtgcg ttcccgttac	660
	tccggcaagg cactggaaaa gaagctggtg gaccttgcca tccgtgaagc caaccattat	720
	ggctggagcg atacctatac ctttaccaaa tggctcggtg agcaactcct gctcaaggcc	780

ES 2 678 647 T3

ctgtccgggc gggcactgac cattgtgocg ccatccatta ttgaaagtgc actcgaggaa 840
 cccgcgccag gctggattga aggtgtgaag gtggcggatg ccattatcct tgcgtatgcc 900
 cgcgagaagg tcacgctctt ccctggcaaa cgcgctggcg tcatcgatgt tattcccgtg 960
 gatctggtgg ccaatgccat catcctggcg gcggtgaag ccgttgctga ttcgccacgt 1020
 caccgattt accagtgtg cagtggcagc tccaaccggg tttctctcgg gcagtttatt 1080
 gaccacctca tggcggaaac caaagccaac ttcgccgaat acgatcagct gttctaccga 1140
 cagccgacca aacccttcat tgcagtcaac cgcggctgt tcgatgccgt cgtaggcggg 1200
 gtgocgattc cactgagcat taccgggaag gttttgocga tgctgggcca aaatcgcgag 1260
 ttgaaagtgc tccggaatct ggacacgaca cgctcgtcgg cgaccatttt cggtttctac 1320
 accgcgccag actatatcct ccggaatgat gatctgctgg ccctggcatc gaggatgggt 1380
 gagctggaca aggtgctggt cccggtagat gccccgaga ttgactggtc ggtctatctg 1440
 cgcaagatcc acctggcagg cctgaaccga tacgccctca aggagcgcaa ggtatacagc 1500
 ctgocgctctg ccaaggcccg aaaaaaggca gcgtga 1536

<210> 8

<211> 511

5

<212> PRT

<213> Marinobacter adhaerens

<400> 8

Met Ala Thr Gln Gln Leu Asn Pro Asp Ala Ser Ser Lys Val Leu Glu
 1 5 10 15

Arg Leu Arg Gly Lys His Val Leu Ile Thr Gly Thr Thr Gly Phe Leu
 20 25 30

Gly Lys Val Val Leu Glu Lys Leu Ile Arg Ala Val Pro Asp Ile Gly
 35 40 45

Gly Ile His Leu Leu Ile Arg Gly Asn Lys Arg His Pro Asp Ala Arg
 50 55 60

Asp Arg Phe Phe Glu Glu Ile Ala Thr Ser Ser Val Phe Asp Arg Leu
 65 70 75 80

Arg Gln Asp Asp Asn Glu Ala Phe Glu Thr Phe Ile Glu Asp Arg Val
 85 90 95

His Cys Val Thr Gly Glu Val Thr Glu Pro Leu Phe Gly Leu Ser Ala
 100 105 110

Asp Arg Phe Arg Lys Leu Ala Gly Gly Ile Asp Val Val Val Asn Ser

ES 2 678 647 T3

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

ES 2 678 647 T3

Ala Asn Phe Ala Glu Tyr Asp Gln Leu Phe Tyr Arg Gln Pro Thr Lys
 370 375 380

Pro Phe Ile Ala Val Asn Arg Arg Leu Phe Asp Ala Val Val Gly Gly
 385 390 395 400

Val Arg Ile Pro Leu Ser Ile Thr Gly Lys Val Leu Arg Met Leu Gly
 405 410 415

Gln Asn Arg Glu Leu Lys Val Leu Arg Asn Leu Asp Thr Thr Arg Ser
 420 425 430

Leu Ala Thr Ile Phe Gly Phe Tyr Thr Ala Pro Asp Tyr Ile Phe Arg
 435 440 445

Asn Asp Asp Leu Leu Ala Leu Ala Ser Arg Met Gly Glu Leu Asp Lys
 450 455 460

Val Leu Phe Pro Val Asp Ala Arg Gln Ile Asp Trp Ser Val Tyr Leu
 465 470 475 480

Arg Lys Ile His Leu Ala Gly Leu Asn Arg Tyr Ala Leu Lys Glu Arg
 485 490 495

Lys Val Tyr Ser Leu Arg Ser Ala Lys Ala Arg Lys Lys Ala Ala
 500 505 510

<210> 9

<211> 1545

<212> ADN

5 <213> Oceanobacter sp. RED65

<400> 9

atgagtcagt attctgcatt ttcagtgctc cagtcctca aaggtaagca catcttttta	60
acgggtgtga caggtttttt aggcaaagct attttagaaa agctcttgta cagtgtaccg	120
cagctagcac aaatccacat tttggtgctc ggtggcaaag tttcagccaa aaagcgtttt	180
caacacgata tcctcggctc cagtattttt gagcgcctga aagagcagca tggcgagcac	240
tttgaagaat gggtgcaatc aaaaatcaat ctggtggaag gtgaattgac acaacccatg	300
tttgatttgc ctagtctgta atttgcgggt ttggccaatc aactggactt aattattaac	360
tccgctgccg gtgtaattt ccgcgaaaac cttgagaaag cgctcaacat caacaccttg	420
tgtttaaaca atatcattgc gttagcgcag tacaatgtgg ccgctcaaac gccggtgatg	480
cagatatcta catggtatgt aaacggtttc aataaaggtc aatcaatga agaagtgggt	540
ggtccagcaa gcggactgat cccacagttg tctcaggatt gttatgacat cgattcgggt	600
tttaaacgag tacatagcca gatagagcag gtcaaaaagc gcaaaacaga catagaacaa	660

ES 2 678 647 T3

caagaacaag cactgattaa attaggcata aagaccagcc agcattttgg ttggaacgat 720
 acctatacat tcacaaagtg gttaggtgag cagctactca ttcaaaaact gggtaagcag 780
 agtttaacta ttttgcgtcc gagtattatc gagagtgtg tacgtgaacc tgcgccgggt 840
 tgggtcgagg gcgtgaaagt agcggatgcg ttgatttacg cttacgccaa gggtcgtggt 900
 tctattttcc caggtcgtga tgaaggcatc cttgacgtca ttctgtgga tttggtggct 960
 aatgcggcag ccttgtcagc ggcgcaatta atggaatcta atcagcagac ggggtatcgc 1020
 atttatcagt gctgtagcgg tagtcgcaat cccataaagt tgaaggagt tattcgccat 1080
 attcaaaacg tggcgcaagc tcgctatcag gagtggccaa aattgttcgc agataagcca 1140
 caagaagcct tcaaaacggt ttccccaaaa cgtttcaaat tgtatatgag tggcttcacg 1200
 gctatcactt gggcaaaaac gattatcggg cgagtgttcg gttccaacgc tgcgtcgcag 1260
 catatgtaa aagcgaaaac cacggcgtca ctggcgaata tttttggtt ttataccgcc 1320
 cctaattatc gttttagtag tcagaaactt gaacagttag tcaagcagtt cgacaccaca 1380
 gaacagcgtt tatacgatat tcgccccgat cactttgatt ggaaatatta tttgcaagag 1440
 gtacacatgg atggactaca caaatacgcc ctacgggaca ggcaggaact gaagcccaag 1500
 catgtgaaaa agcgtgaagc cgaaaccatc aggcaagcgg cgtaa 1545

<210> 10

<211> 514

<212> PRT

<213> Oceanobacter sp. RED65

5

<400> 10

Met Ser Gln Tyr Ser Ala Phe Ser Val Ser Gln Ser Leu Lys Gly Lys
 1 5 10 15

His Ile Phe Leu Thr Gly Val Thr Gly Phe Leu Gly Lys Ala Ile Leu
 20 25 30

Glu Lys Leu Leu Tyr Ser Val Pro Gln Leu Ala Gln Ile His Ile Leu
 35 40 45

Val Arg Gly Gly Lys Val Ser Ala Lys Lys Arg Phe Gln His Asp Ile
 50 55 60

Leu Gly Ser Ser Ile Phe Glu Arg Leu Lys Glu Gln His Gly Glu His
 65 70 75 80

Phe Glu Glu Trp Val Gln Ser Lys Ile Asn Leu Val Glu Gly Glu Leu
 85 90 95

ES 2 678 647 T3

Thr Gln Pro Met Phe Asp Leu Pro Ser Ala Glu Phe Ala Gly Leu Ala
 100 105 110

Asn Gln Leu Asp Leu Ile Ile Asn Ser Ala Ala Ser Val Asn Phe Arg
 115 120 125

Glu Asn Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ile Asn Thr Leu Cys Leu Asn Asn
 130 135 140

Ile Ile Ala Leu Ala Gln Tyr Asn Val Ala Ala Gln Thr Pro Val Met
 145 150 155 160

Gln Ile Ser Thr Cys Tyr Val Asn Gly Phe Asn Lys Gly Gln Ile Asn
 165 170 175

Glu Glu Val Val Gly Pro Ala Ser Gly Leu Ile Pro Gln Leu Ser Gln
 180 185 190

Asp Cys Tyr Asp Ile Asp Ser Val Phe Lys Arg Val His Ser Gln Ile
 195 200 205

Glu Gln Val Lys Lys Arg Lys Thr Asp Ile Glu Gln Gln Glu Gln Ala
 210 215 220

Leu Ile Lys Leu Gly Ile Lys Thr Ser Gln His Phe Gly Trp Asn Asp
 225 230 235 240

Thr Tyr Thr Phe Thr Lys Trp Leu Gly Glu Gln Leu Leu Ile Gln Lys
 245 250 255

Leu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Ile Leu Arg Pro Ser Ile Ile Glu Ser
 260 265 270

Ala Val Arg Glu Pro Ala Pro Gly Trp Val Glu Gly Val Lys Val Ala
 275 280 285

Asp Ala Leu Ile Tyr Ala Tyr Ala Lys Gly Arg Val Ser Ile Phe Pro
 290 295 300

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

Asn Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Gln Leu Met Glu Ser Asn Gln Gln
 325 330 335

Thr Gly Tyr Arg Ile Tyr Gln Cys Cys Ser Gly Ser Arg Asn Pro Ile
 340 345 350

ES 2 678 647 T3

Lys Leu Lys Glu Phe Ile Arg His Ile Gln Asn Val Ala Gln Ala Arg
 355 360 365

Tyr Gln Glu Trp Pro Lys Leu Phe Ala Asp Lys Pro Gln Glu Ala Phe
 370 375 380

Lys Thr Val Ser Pro Lys Arg Phe Lys Leu Tyr Met Ser Gly Phe Thr
 385 390 395 400

Ala Ile Thr Trp Ala Lys Thr Ile Ile Gly Arg Val Phe Gly Ser Asn
 405 410 415

Ala Ala Ser Gln His Met Leu Lys Ala Lys Thr Thr Ala Ser Leu Ala
 420 425 430

Asn Ile Phe Gly Phe Tyr Thr Ala Pro Asn Tyr Arg Phe Ser Ser Gln
 435 440 445

Lys Leu Glu Gln Leu Val Lys Gln Phe Asp Thr Thr Glu Gln Arg Leu
 450 455 460

Tyr Asp Ile Arg Ala Asp His Phe Asp Trp Lys Tyr Tyr Leu Gln Glu
 465 470 475 480

Val His Met Asp Gly Leu His Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Arg Gln Glu
 485 490 495

Leu Lys Pro Lys His Val Lys Lys Arg Lys Arg Glu Thr Ile Arg Gln
 500 505 510

Ala Ala

<210> 11

<211> 1542

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Reductasa Maqu_2220, codones optimizados

<400> 11

atggcgattc aacaagttca tcatgccgac acgtccagta gcaaagtgtt gggccagctg	60
cgggggaagc gggctctgat cacagggacc accggattct taggcaaagt tgtgctagaa	120
cgtttaatcc gggccgtgcc cgatattggg gcgatttacc tattaattcg tggtaataaa	180
cgtcaccccg atgcgcgaag cggattccta gaagaaatcg cgacctcctc cgtattcgat	240
cgcttgccggg aggccgacag tgaaggattt gacgcgttct tggaggagcg gattcactgc	300

ES 2 678 647 T3

gtaactggtg aagtgaccga agcgggattt gggatcggcc aggaagatta ccggaata 360
gcaaccgaat tggatgccgt gattaatagc gcagcctctg ttaatttccg cgaagagttg 420
gataaagcct tggccatcaa caccttatgt ctgcgtaaca ttgcaggcat ggtggaccta 480
aatccgaagt tagcagttct ccaagtctcc acctgttacg ttaacgggat gaattccggg 540
caagtcaagg agtccgtgat caaaccgct ggggaagctg tgcccggtc ccctgatggc 600
ttttatgaga tcgaagaact cgtacgccta ttgcaggaca aaatcgaaga tgtacaagcc 660
cgatactctg ggaaggttct ggaacgcaa ctggtggact tgggtatccg agaagccaac 720
cggatggtt ggagtgatac atatacgtt actaaatggt tggggaaca gttactaatg 780
aaagcttga atggccgcac tttgactatc ttacggcca gtattatoga aagtgtctg 840
gaggagccag ccccggtt gattgaaggt gttaaagctg cggatgctat tattttggct 900
tacgcccggc agaaggtaac cttatttctt ggggaagcga gtggtattat tgacgtcatt 960
ccagtcgatt tggtcgctaa tagcattatt ctatcttag ctgaggcctt aggagaacct 1020
ggtcgtcgtc gtatttacca gtgctgttct ggcggtggt atccatttc cctcggcgag 1080
tttattgatc atttgatggc cgaagtaaa gctaattacg ccgcctacga ccatttgtt 1140
tatcggcaac catccaaacc ctttctgcc gtaaaccggg cgttatttga tctagtatt 1200
agtggcgtgc gcttgcccct aagtctaaca gaccgtgtgc tgaaactgct cggtaattct 1260
cgtgatttaa aaatgctgcy caacttagat accacccaaa gcctcgccac catttttgg 1320
ttttatactg cgctgatta tattttctgc aacgatgaat taatggcct cgccaatcg 1380
atgggagaag tggataagg gttgttccc gttgacgcc gactcattga ttgggaactg 1440
tatctgcgca aaatcctct ggcaggcctg aatcgttatg cactcaagga acgcaaggtt 1500
tattccctca aaaccgctcg acaacgtaag aaagctgctt aa 1542

<210> 12

<211> 1986

5 <212> ADN

<213> Marinobacter aquaeolei

<400> 12

atgaattatt tcctgacagg cggcaccggt tttatcggtc gttttctggt tgagaaactc 60
ttggcgcgcy gcgccaccgt gtatgttctg gttcgcgagc agtcccagga caagctggag 120
cggctccggg agcgtgggg tgcagacgac aagcaagtga aggctgtgat cggcgacctc 180
accagcaaaa accttggtat tgacgcgaaa acgctgaaat cactgaaagg aaatatcgac 240
cacgtattcc atcttgccgc ggtctacgac atgggcgagc acgaagaagc ccaggccgcc 300
accaatatcg aaggcaccag ggcggctgtt caggccgccg aagccatggg cgccaagcat 360
ttccatcatg tgcacatccat cgcggcagcg ggtctgttca agggtatctt ccgggaggat 420

ES 2 678 647 T3

atgttcgaag aagccgagaa gottgatcat ccttacotgc gcaccaagca cgaatccgaa 480
aaagttgtgc gtgaagaatg caaggttccg ttccgcatct accgccctgg tatggtcatt 540
ggccattcgg aaaccggcga aatggacaag gttgacgggc cctattactt cttcaagatg 600
attcagaaga tccgtcatgc gttgccccag tgggtaccga ccatcggtat tgaaggtggc 660
cggctgaaca ttgtgccggt ggatttcgtg gtcgatgcac tggatcacat tgcccatctg 720
gaaggcgaag atggcaactg tttccatctg gtggactccg atccgtataa ggtgggtgag 780
atcctcaata ttttctgcga ggccggccat gcccccgca tgggtatgcg catcgattcc 840
cggatgttcg gttttattcc gccgtttatt cgcagagca tcaagaatct gcctccggtc 900
aagcgcatta ctggtgcgct tctggatgac atgggcattc cgccctcggc gatgtccttc 960
attaattacc cgaccggtt tgatacccg gagctggagc gggttctgaa gggcacagac 1020
attgaggtgc cgcgtctgcc gtcctatgcc ccggttatct gggactactg ggagcgaat 1080
ctggaccggc acctgttcaa ggaccgcacc ctcaagggca cggttgaagg taaggtttgc 1140
gtggtcaccg gcgcgacctc gggattggc ctggcaacgg cagagaagct ggcagaggcc 1200
ggtgccattc tggtcattgg tgcgcgcacc aaggaaactc tggatgaagt ggcggccagt 1260
ctggaggcca agggtggcaa cgtgcatgcg taccagtgcg acttttcgga catggacgac 1320
tgcgaccgct ttgtgaagac ggtgctggat aatcacggcc acgtggatgt actggtgaat 1380
aacgcgggtc gctccatccg ccgctcgtg gcgttgtctt ttgaccggtt ccacgatttt 1440
gagcggacca tgcagctgaa ctactttggc tccgttcggc tgatcatggg ctttgcgcca 1500
gccatgctgg agcgtcgcgg cgggcacgtg gtgaatattt cttccatcgg ggtacttacc 1560
aacgctccgc gtttctcggc ctatgtctcc tcgaaatccg cactggacgc gttcagccgc 1620
tgtgccgctg cagaatggtc ggatcgcaac gtgacctca ccaccatcaa catgccggtg 1680
gtgaaaaagc cgatgatcgc gccaccaag atctacgatt ccgtgccgac gctgacgccg 1740
gatgaagccg cccagatggt ggcggatgcg attgtgtacc ggcccaagcg cattgccacc 1800
cgtcttggcg tgttcgcgca gtttctgcat gcgctggcac cgaagatggg tgagatcatt 1860
atgaacactg gctaccggat gttcccggat tctccagcag ccgctggcag caagtccggc 1920
gaaaagccga aagtctctac cgagcaggtg gcctttgceg cgattatgcg ggggatatac 1980
tggtaa 1986

<210> 13

<211> 661

<212> PRT

<213> Marinobacter aquaeolei

5

ES 2 678 647 T3

<400> 13

Met Asn Tyr Phe Leu Thr Gly Gly Thr Gly Phe Ile Gly Arg Phe Leu
 1 5 10 15

Val Glu Lys Leu Leu Ala Arg Gly Gly Thr Val Tyr Val Leu Val Arg
 20 25 30

Glu Gln Ser Gln Asp Lys Leu Glu Arg Leu Arg Glu Arg Trp Gly Ala
 35 40 45

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

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

His Val Phe His Leu Ala Ala Val Tyr Asp Met Gly Ala Asp Glu Glu
 85 90 95

Ala Gln Ala Ala Thr Asn Ile Glu Gly Thr Arg Ala Ala Val Gln Ala
 100 105 110

Ala Glu Ala Met Gly Ala Lys His Phe His His Val Ser Ser Ile Ala
 115 120 125

Ala Ala Gly Leu Phe Lys Gly Ile Phe Arg Glu Asp Met Phe Glu Glu
 130 135 140

Ala Glu Lys Leu Asp His Pro Tyr Leu Arg Thr Lys His Glu Ser Glu
 145 150 155 160

Lys Val Val Arg Glu Glu Cys Lys Val Pro Phe Arg Ile Tyr Arg Pro
 165 170 175

Gly Met Val Ile Gly His Ser Glu Thr Gly Glu Met Asp Lys Val Asp
 180 185 190

Gly Pro Tyr Tyr Phe Phe Lys Met Ile Gln Lys Ile Arg His Ala Leu
 195 200 205

Pro Gln Trp Val Pro Thr Ile Gly Ile Glu Gly Gly Arg Leu Asn Ile
 210 215 220

Val Pro Val Asp Phe Val Val Asp Ala Leu Asp His Ile Ala His Leu
 225 230 235 240

Glu Gly Glu Asp Gly Asn Cys Phe His Leu Val Asp Ser Asp Pro Tyr
 245 250 255

ES 2 678 647 T3

Lys Val Gly Glu Ile Leu Asn Ile Phe Cys Glu Ala Gly His Ala Pro
 260 265 270
 Arg Met Gly Met Arg Ile Asp Ser Arg Met Phe Gly Phe Ile Pro Pro
 275 280 285
 Phe Ile Arg Gln Ser Ile Lys Asn Leu Pro Pro Val Lys Arg Ile Thr
 290 295 300
 Gly Ala Leu Leu Asp Asp Met Gly Ile Pro Pro Ser Val Met Ser Phe
 305 310 315 320
 Ile Asn Tyr Pro Thr Arg Phe Asp Thr Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu
 325 330 335
 Lys Gly Thr Asp Ile Glu Val Pro Arg Leu Pro Ser Tyr Ala Pro Val
 340 345 350
 Ile Trp Asp Tyr Trp Glu Arg Asn Leu Asp Pro Asp Leu Phe Lys Asp
 355 360 365
 Arg Thr Leu Lys Gly Thr Val Glu Gly Lys Val Cys Val Val Thr Gly
 370 375 380
 Ala Thr Ser Gly Ile Gly Leu Ala Thr Ala Glu Lys Leu Ala Glu Ala
 385 390 395 400
 Gly Ala Ile Leu Val Ile Gly Ala Arg Thr Lys Glu Thr Leu Asp Glu
 405 410 415
 Val Ala Ala Ser Leu Glu Ala Lys Gly Gly Asn Val His Ala Tyr Gln
 420 425 430
 Cys Asp Phe Ser Asp Met Asp Asp Cys Asp Arg Phe Val Lys Thr Val
 435 440 445
 Leu Asp Asn His Gly His Val Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Arg
 450 455 460
 Ser Ile Arg Arg Ser Leu Ala Leu Ser Phe Asp Arg Phe His Asp Phe
 465 470 475 480
 Glu Arg Thr Met Gln Leu Asn Tyr Phe Gly Ser Val Arg Leu Ile Met
 485 490 495
 Gly Phe Ala Pro Ala Met Leu Glu Arg Arg Arg Gly His Val Val Asn
 500 505 510

ES 2 678 647 T3

Ile Ser Ser Ile Gly Val Leu Thr Asn Ala Pro Arg Phe Ser Ala Tyr
 515 520 525

Val Ser Ser Lys Ser Ala Leu Asp Ala Phe Ser Arg Cys Ala Ala Ala
 530 535 540

Glu Trp Ser Asp Arg Asn Val Thr Phe Thr Thr Ile Asn Met Pro Leu
 545 550 555 560

Val Lys Thr Pro Met Ile Ala Pro Thr Lys Ile Tyr Asp Ser Val Pro
 565 570 575

Thr Leu Thr Pro Asp Glu Ala Ala Gln Met Val Ala Asp Ala Ile Val
 580 585 590

Tyr Arg Pro Lys Arg Ile Ala Thr Arg Leu Gly Val Phe Ala Gln Val
 595 600 605

Leu His Ala Leu Ala Pro Lys Met Gly Glu Ile Ile Met Asn Thr Gly
 610 615 620

Tyr Arg Met Phe Pro Asp Ser Pro Ala Ala Ala Gly Ser Lys Ser Gly
 625 630 635 640

Glu Lys Pro Lys Val Ser Thr Glu Gln Val Ala Phe Ala Ala Ile Met
 645 650 655

Arg Gly Ile Tyr Trp
 660

<210> 14

<211> 989

<212> ADN

5 <213> Synechocystis PCC6803

<400> 14

attgctgaag cggaatccct ggtaaagcc gccgccgatg ccaattgcat tctccaagtg	60
gggcacattg aacgcttcaa cccggcattt ttagagctaa ccaaaattct caaaacggaa	120
gagttattgg cgatogaagc ccatcgcatg agtccctatt cccagcgggc caatgatgtc	180
tccgtggtat tggatttgat gatccatgac attgacctgt tgctggaatt ggtgggttcg	240
gaagtggtta aactgtccgc cagtggcagt cgggcttctg ggtcaggata tttggattat	300
gtcaccgcta cgtaggctt ctctccggc attgtggcca cctcaccgc cagtaaggtc	360
acctatgta aaattcgttc catcgccgcc cactgcaaaa attccctcac cgaagcggat	420
tttctcaata acgaaatddd gatccatcgc caaaccaccg ctgattggag cgcggactat	480

ES 2 678 647 T3

ggccaggat tgtatcgcca ggatggtcta atcgaaaagg tttacaccag taatattgaa 540
 cctctccacg ctgaattaga acatthttatt cattgtggtta ggggagggtga tcaaccctca 600
 gtggggggag aacaggccct caaggccctg aagttagcca gtttaattga agaaatggcc 660
 ctggacagtc aggaatggca tgggggggaa gttgtgacag aatatcaaga tgccaccctg 720
 gccctcagtg cgagtgttta aatcaactta attaatgcaa ttattgagag ttcaaactcg 780
 ataactttgt gaaatattac tgttgaatta atctatgact attcaatata cccccctagc 840
 cgatcgctg ttggcctacc tcgccccga tcgcctaaat ctgagcgcca agagtagttc 900
 cctcaacacc agtattctgc tcagcagtg cctattcaat caggaagggg gaattgtaac 960
 agccaactat ggctttgatg gttatatgg 989

<210> 15

<211> 989

5 <212> ADN

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 15

ccggtatgga tggcaccgat goggaatccc aacagattgc ctttgacaac aatgtggcct 60
 ggaataacct gggggatttg tccaccacca cccaacgggc ctacacttcg gctattagca 120
 cagacacagt gcagagtgtt tatggcggtta atctggaaaa aaacgataac attcccattg 180
 tttttgctg gcccatthttt cccaccacc cccaatccac agatthttcag gtaatgctta 240
 acacggggga aattgtcacc ccggtgatcg cctctttgat tcccaacagt gaatacaacg 300
 aacggcaaac ggtagtaatt acgggcaatt ttgtaaatcg ttttaaccca ggcacggagg 360
 gagcgattta tcccgtttcc gtaggcacag tgttgacag tactcctttg gaaatggtgg 420
 gaccacaacg cccggtcagt gcggtgggta ttaccattga tagtctcaac ccctacgtgg 480
 ccggcaatgg tcccaaaatt gtcgccgcta agttagaccg cttcagtgac ctgggggaag 540
 gggctcccct ctggttagcc accaatcaaa ataacagtgg cggggattta tatggagacc 600
 aagcccaatt tcgthttgca atthtacca gcgcccgttt tcccccgat ggcattgcca 660
 gthttactacc cacagaatth gaacggtatt thcaactcca agcggagat attacgggac 720
 ggacagttat cctaacccea actggtgttg attatgaaat tccccgcttt ggtctggtgc 780
 aggtgttggg gctggcggat ttggccggg ttcaggacag ctatgacctg acttacatcg 840
 aagatcatga caactattac gacattatcc tcaaagggga cgaagccgca gttcgccaaa 900
 ttaagaggtg tgctthtccc tccgaagggg attatctggc ggtthataat cccggtggcc 960
 ccggcaatga tccagagaat ggtccccca 989

<210> 16

<211> 1032

10 <212> ADN

<213> Synechocystis PCC6803

ES 2 678 647 T3

<400> 16
tatttgcccg tattctgccc tatccccaag ccctagccca ggcgatcgcc gctgggttta 60
cttccgaccg tatcattgct ttgcgcccc ccgtagccga accattggaa aaagccctgt 120
ggcaacaatg gcaaatca ggggtggtaa ctaaagcctc cggtgcccag gggggagaat 180
tggttaagca aaaagtggcg gaagcgttgg gggtaaatct gatcagaatt gccctcccc 240
agactattcc agggcaaata actgacgatt taagccagat caaccaattt tgccaaagac 300
atltgccaag ctaaaaacga aaatttgta agtattgcaa cggtggtttc ccagggcgag 360
agcgtccccg taagatgaga tttttaaaga cccccattag cgtggggcta tccctttaa 420
aacgtctttt attctggaga atctcaatgc atagcttttt gttggccacc gccgttcccg 480
ccaccctgtc ctggagccct aaagttgctg gggatgatgat tgcttgcaac attttggcga 540
tcgcctttgg taaattgacc atcaaacaac aaaatgtggg ccccccatg ccttcctcta 600
acttctttgg cggctttggt ttaggggctg tgctgggcac cgctagcttt ggccacatcc 660
tcggcgtgag agtaattctg gggctagcca atatgggagt actttaaggc tcgattctga 720
atggactagc ttttatcctt tgggaaaata tcaaaggcga tcgggcaatt gaaagaaaag 780
cctggtcgtc tttttgtag ggattagga aaatgccaaa acgcaccaag gtggttaatta 840
tggtccgat gacggcaaga atcaacgccc aaatttgagc attagccgc cctttgacat 900
ctttaacatc atccttgact gtacctatct ccatcctgac cgcagataac tcggttttca 960
ccgttgccat atcgatctta agagaagta catctttttg gaggtcatcg agtttggctc 1020
taatttcccc ca 1032

<210> 17
<211> 824
<212> ADN
<213> Synechocystis PCC6803

5

<400> 17
cctttaaatc ggtttctata gttacactca ttggcttttg cctgcaaagc aatatttcct 60
gatacccta gggtaaatca tgggaaatgg cgatcgccgg agtttctcct gtttgctgga 120
gggctgtctg caacatcttg gtgctgacca cggaatcggg ggcgaggta aagaggggat 180
tagccagaat acctgccagc gaggtagcaa ccaaagtagc gacaatgccc acctgtaggg 240
gacgcatgcc gggtaaatc catttgatgg ccgggtaatt tttgattact tcggacattt 300
cctggggctc cttcaccacc atcattttca ccaccgggat gtagtagtag atggaaacta 360
cactggtaac cagaccaagt aggactaggc catacaatcc cgattgcaa ccggcccaga 420
agatgtaaat tttgcccga aagcccgcc gaggaggaat gcccccaag gataataaac 480
aatgctcaa gcccaaggtt aacaaggggt ctttggtgta cagaccagcg taactactaa 540
tttggtcact gccagtgcgg aggggtgaaga gaataatgca actaaacgcc ccaggttca 600
taaacagata gatgagcatg tagaaaacca tgctggcgta accatcttca ctgccggcca 660
ctaggccaat catcaciaag cctgcttgac cgatggaaga gtaggccaac atccgtttca 720
tgctggtttg ggctaaagcc accacgttgc ccagcaccat gctcaacacg gccagagcgg 780
tgaaaataac gtgccactca tcggtaatac caccaaaggc agtc 824

10

ES 2 678 647 T3

<210> 18
 <211> 1368
 <212> ADN
 <213> Marinobacter hydrocarbonoclasticus

5 <400> 18
 atgacgcccc tgaatcccac tgaccagctc tttctctggc tggaaaaacg ccagcagccc 60
 atgcatgtgg gcggcctcca gctgttttcc ttccccgaag gcgcgcccga cgactatgtc 120
 gcgcagctgg cagaccagct tcggcagaag acggaggtga ccgccccctt taaccagcgc 180
 ctgagctatc gcctgggcca gccggtatgg gtggaggatg agcacctgga ccttgagcat 240
 catttccgct tcgaggcgct gcccacacc gccggtatcc gggagctgct gtcgttcgta 300
 tcggcggagc attcgcacct gatggaccgg gagcgcacca tgtgggaggt gcacctgac 360
 gaggggcctga aagaccggca gtttgcgctc tacaccaagg ttcaccattc cctggtggac 420
 ggtgtctcgg ccattgcgcat ggccaccgg atgctgagtg aaaaccggga cgaacacggc 480
 atgccgcaa tctgggatct gccttgccctg tcacgggata ggggtgagtc ggacggacac 540
 tccctctggc gcagtgtcac ccatttctg gggctttcgg gccgccagct cggcaccatt 600
 cccactgtgg caaaggagct actgaaaacc atcaatcagg ccggaagga tccggcctac 660
 gactccattt tccatgcccc gogctgcatg ctgaaccaga aatcaccgg ttcccgtcgt 720
 ttcgccgccc agtcctgggt cctgaaaacgg attcgcgccg tgtgagggc ctatggcacc 780
 acggtcaacg atgtcgtaac tgccatgtgc gcagcggctc tgcgtaccta tctgatgaat 840
 caggatgcct tgccggagaa accactggtg gcctttgtgc cgggtgctact acgccgggac 900
 gacagctccg ggggcaacca ggtaggcgtc atcctggcga gccttcacac cgatgtgcag 960
 gaggccggcg aacgactggt aaaaatccac catggcatgg aagaggcaa gcagcgtac 1020
 cgtcatatga gcccgagga aatcgtcaac tacacggccc tgaccctggc gccggccgcc 1080
 ttccacctgc tgaccgggct ggcgcccagg tggcagacct tcaatgtggt gatttccaat 1140
 gtccccgggc catccaggcc cctgtactgg aacggggcga aactggaagg catgtatccg 1200
 gtgtctatcg atatggacag actggccctg aacatgacac tgaccageta taacgaccag 1260
 gtggagtccg gcctgattgg ctgtcgccgg accctgcccga gcctgcaacg gatgctggac 1320
 tacctggaac agggctctggc agagctggag ctcaacgccg gtctgtaa 1368

10 <210> 19
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Marinobacter hydrocarbonoclasticus

ES 2 678 647 T3

<400> 19

Met Thr Pro Leu Asn Pro Thr Asp Gln Leu Phe Leu Trp Leu Glu Lys
1 5 10 15

Arg Gln Gln Pro Met His Val Gly Gly Leu Gln Leu Phe Ser Phe Pro
20 25 30

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

Gln Lys Thr Glu Val Thr Ala Pro Phe Asn Gln Arg Leu Ser Tyr Arg
50 55 60

Leu Gly Gln Pro Val Trp Val Glu Asp Glu His Leu Asp Leu Glu His
65 70 75 80

His Phe Arg Phe Glu Ala Leu Pro Thr Pro Gly Arg Ile Arg Glu Leu
85 90 95

Leu Ser Phe Val Ser Ala Glu His Ser His Leu Met Asp Arg Glu Arg
100 105 110

Pro Met Trp Glu Val His Leu Ile Glu Gly Leu Lys Asp Arg Gln Phe
115 120 125

Ala Leu Tyr Thr Lys Val His His Ser Leu Val Asp Gly Val Ser Ala
130 135 140

Met Arg Met Ala Thr Arg Met Leu Ser Glu Asn Pro Asp Glu His Gly
145 150 155 160

Met Pro Pro Ile Trp Asp Leu Pro Cys Leu Ser Arg Asp Arg Gly Glu
165 170 175

Ser Asp Gly His Ser Leu Trp Arg Ser Val Thr His Leu Leu Gly Leu
180 185 190

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

Lys Thr Ile Asn Gln Ala Arg Lys Asp Pro Ala Tyr Asp Ser Ile Phe

ES 2 678 647 T3

210 215 220

His Ala Pro Arg Cys Met Leu Asn Gln Lys Ile Thr Gly Ser Arg Arg
225 230 235 240

Phe Ala Ala Gln Ser Trp Cys Leu Lys Arg Ile Arg Ala Val Cys Glu
245 250 255

Ala Tyr Gly Thr Thr Val Asn Asp Val Val Thr Ala Met Cys Ala Ala
260 265 270

Ala Leu Arg Thr Tyr Leu Met Asn Gln Asp Ala Leu Pro Glu Lys Pro
275 280 285

Leu Val Ala Phe Val Pro Val Ser Leu Arg Arg Asp Asp Ser Ser Gly
290 295 300

Gly Asn Gln Val Gly Val Ile Leu Ala Ser Leu His Thr Asp Val Gln
305 310 315 320

Asp Ala Gly Glu Arg Leu Leu Lys Ile His His Gly Met Glu Glu Ala
325 330 335

Lys Gln Arg Tyr Arg His Met Ser Pro Glu Glu Ile Val Asn Tyr Thr
340 345 350

Ala Leu Thr Leu Ala Pro Ala Ala Phe His Leu Leu Thr Gly Leu Ala
355 360 365

Pro Lys Trp Gln Thr Phe Asn Val Val Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro
370 375 380

Ser Arg Pro Leu Tyr Trp Asn Gly Ala Lys Leu Glu Gly Met Tyr Pro
385 390 395 400

Val Ser Ile Asp Met Asp Arg Leu Ala Leu Asn Met Thr Leu Thr Ser
405 410 415

Tyr Asn Asp Gln Val Glu Phe Gly Leu Ile Gly Cys Arg Arg Thr Leu
420 425 430

Pro Ser Leu Gln Arg Met Leu Asp Tyr Leu Glu Gln Gly Leu Ala Glu
435 440 445

Leu Glu Leu Asn Ala Gly Leu
450 455

<210> 20
 <211> 1425
 <212> ADN
 <213> Marinobacter hydrocarbonoclasticus

ES 2 678 647 T3

<400> 20
atgaaacgtc tcggaaccct ggatgcctcc tggctggcgg ttgaatctga agacaccccg 60
atgcatgtgg gtacacttca gattttctca ctgcctgaag gcgcaccaga aaccttcttg 120
cgtgacatgg tcaactgaat gaaagaagcc ggcgatgtgg caccgccctg gggatacaaa 180
ctggcctggg ccggtttcct cgggcgtgta atcgccccgg cctggaaagt cgataaggat 240
atcgatctgg attatcacgt ccggcactcg gccctgcccc gccccggcgg tgagcgcgaa 300
ctgggtattc tggtatcccg gctgcaactc aatcccctgg atttttcccg gccgctgtgg 360
gaatgccacg ttattgaagg cctggaaaac aaccggttcg ccctttacac caaaatgcac 420
cactcgatga ttgacggcat cagtggcgta cggctgatgc aaagggact caccaccgat 480
ccggaacgct gcaatatgcc accgccctgg acggtacgcc cgcataacg tcgtggcgca 540
aaaaccgaca aagaggccag tgtgcccgcc gcggtttccc aggccatgga cgccctgaaa 600
ctgcaggcag acatggcacc caggctatgg caggccggca atcgctggg gcattcgggt 660
cgacaccogg aagacggact gaccgcccc ttcaccggcc cggtttccgt gctcaaccac 720
cgggttacgg cgcagcggcg attcgccacc cagcactacc agctggaccg gctaaagaac 780
ctgccccatg ctccggcggg ctccctgaac gacatcgtgc tttacctttg tggcacagca 840
ttgcgcgct ttctggcaga gcagaacaat ctgcccgaca ccccgctgac ggccgggtata 900
ccggtaaata tccgaccggc agacgacgag ggtacgggca cccagatcag tttcatgatt 960
gcctcgtctg ccaccgacga agccgaccgg ttgaaccgcc tgcaacagat caaaacctcg 1020
acccgacggg ccaaggagca cctgcagaaa ctccccaaaa gcgcaactgac ccagtacacc 1080
atgctgctga tgcacccta cattctgcag ttgatgtcag gtctcggagg gaggatgcgg 1140
ccggttttca acgtgacat ttccaacgtg cccggcccgg aagacacgct gtattatgag 1200
ggtgcccggc ttgaggccat gtatccgta tcgctgatcg ctcatggcgg cgctctgaat 1260
atcacctgcc tgagctatgc cggatcgctg aatttcgggt ttaccggctg ccgggatacg 1320
ctgccgagca tgcagaaact ggcggtttat accggtgagg ctctggatga gctggaatcg 1380
ctgattctgc cgccaagaa gaagcgcgcc cgaacccgca agtaa 1425

<210> 21
<211> 473
5 <212> PRT
<213> Marinobacter hydrocarbonoclasticus

<400> 21
Met Lys Arg Leu Gly Thr Leu Asp Ala Ser Trp Leu Ala Val Glu Ser

ES 2 678 647 T3

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 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 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> 22
 <211> 1368
 <212> ADN

5 <213> Marinobacter aquaeolei

<400> 22
 gtgacgcccc tgaatccac tgaccagctc tttctctggc tggaaaaacg ccagcagccc

60

ES 2 678 647 T3

atgcatgtgg gcggcctcca gctgttttcc ttccccgaag gcgcgccgga cgactatgtc 120
 gcgcagctgg cagaccagct tcggcagaag acggaggtga cggccccctt taaccagcgc 180
 ctgagctatc gcctgggcca gccggtatgg gtggaggatg agcacctgga ccttgagcat 240
 catttccgct tcgaggcget gccacacccc gggcgatttc gggagctgct gtcgttcgta 300
 tcggcggagc attcgcacct gatggaccgg gagcgcccca tgtgggaggt gcacctgatc 360
 gagggcctga aagaccggca gtttgcgctc tacaccaagg ttcaccattc cctggtggac 420
 ggtgtctcgg ccattgcgcat gggcaccgg atgctgagtg aaaaccggga cgaacacggc 480
 atgccgcaa tctgggatct gccttgccctg tcacgggata ggggtgagtc ggacggacac 540
 tccctctggc gcagtgtcac ccatttgcctg gggctttcgg gccgccagct cggcaccatt 600
 cccactgtgg caaaggagct actgaaaacc atcaatcagg ccggaagga tccggcctac 660
 gactccattt tccatgcccc gcgctgcatg ctgaaccaga aaatcaccgg ttcccgtcgt 720
 ttcgccgccc agtccctggcg cctgaaacgg attcgcgccc tgtgcgaggc ctatggcacc 780
 acggtcaacg atgtcgtaac tgccatgtgc gcagcggctc tgcgtacctt tctgatgaat 840
 caggatgcct tgccggagaa accactggcg gcctttgtgc cgggtgctact acgccgggac 900
 gacagctccg ggggcaacca ggtaggcgtc atcctggcga gccttcacac cgatgtgcag 960
 gaggccggcg aacgactggt aaaaatccac catggcatgg aagaggccaa gcagcgtctac 1020
 cggcatatga gcccgaggga aatcgtcaac tacacggccc tgaccctggc gccggccgcc 1080
 ttccacctgc tgaccgggct ggcgcccagg tggcagacgt tcaatgtggt gatttccaat 1140
 gtccccgggc catccaggcc cctgtactgg aacggggcga aactggaagg catgtatccg 1200
 gtgtctatcg atatggacag actggccctg aacatgacac tgaccagcta taacgaccag 1260
 gtggagttag gcctgattgg ctgtcgcggg accctgcccga gcctgcaacg gatgctggac 1320
 tacctggaac aggtctctggc agagctggag ctcaacgccg gtctgtaa 1368

<210> 23
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Marinobacter aquaeolei

5

<400> 23
 Met Thr Pro Leu Asn Pro Thr Asp Gln Leu Phe Leu Trp Leu Glu Lys
 1 5 10 15
 Arg Gln Gln Pro Met His Val Gly Gly Leu Gln Leu Phe Ser Phe Pro
 20 25 30
 Glu Gly Ala Pro Asp Asp Tyr Val Ala Gln Leu Ala Asp Gln Leu Arg
 35 40 45

ES 2 678 647 T3

Gln Lys Thr Glu Val Thr Ala Pro Phe Asn Gln Arg Leu Ser Tyr Arg
50 55 60

Leu Gly Gln Pro Val Trp Val Glu Asp Glu His Leu Asp Leu Glu His
65 70 75 80

His Phe Arg Phe Glu Ala Leu Pro Thr Pro Gly Arg Ile Arg Glu Leu
85 90 95

Leu Ser Phe Val Ser Ala Glu His Ser His Leu Met Asp Arg Glu Arg
100 105 110

Pro Met Trp Glu Val His Leu Ile Glu Gly Leu Lys Asp Arg Gln Phe
115 120 125

Ala Leu Tyr Thr Lys Val His His Ser Leu Val Asp Gly Val Ser Ala
130 135 140

Met Arg Met Ala Thr Arg Met Leu Ser Glu Asn Pro Asp Glu His Gly
145 150 155 160

Met Pro Pro Ile Trp Asp Leu Pro Cys Leu Ser Arg Asp Arg Gly Glu
165 170 175

Ser Asp Gly His Ser Leu Trp Arg Ser Val Thr His Leu Leu Gly Leu
180 185 190

Ser Gly Arg Gln Leu Gly Thr Ile Pro Thr Val Ala Lys Glu Leu Leu
195 200 205

Lys Thr Ile Asn Gln Ala Arg Lys Asp Pro Ala Tyr Asp Ser Ile Phe
210 215 220

His Ala Pro Arg Cys Met Leu Asn Gln Lys Ile Thr Gly Ser Arg Arg
225 230 235 240

Phe Ala Ala Gln Ser Trp Cys Leu Lys Arg Ile Arg Ala Val Cys Glu
245 250 255

Ala Tyr Gly Thr Thr Val Asn Asp Val Val Thr Ala Met Cys Ala Ala
260 265 270

Ala Leu Arg Thr Tyr Leu Met Asn Gln Asp Ala Leu Pro Glu Lys Pro
275 280 285

Leu Val Ala Phe Val Pro Val Ser Leu Arg Arg Asp Asp Ser Ser Gly

ES 2 678 647 T3

ggtgtatcgg ccatgccgat ggttaccocg atgctgtgtc aggatacccg agagcgggat 480
 atgccgccga tctgggccat gccaccacgc ccggagcgtg agaaggatga tggcgcccc 540
 tcgctgtggc gaagcattgg ccacctgtg ggtgaatccg gcaaacaact gggcaccgtg 600
 cccaccgtcg cccgggaact gctgcgaacc atcaataacg cccgaaaaga ccccgctac 660
 tcctccatat tccacgcgcc ccgcagcatt cttaaccaga agatcaccgg ctcccgcgc 720
 ttcgccgcac agtccatga cctcagccgt ataaaggcag tgtgtaaaat ctacggaacc 780
 acggtgaatg atgtggtgat ggccatgtgc gccaccgcgc tgcgcageta cctgatgaac 840
 caggacgccc tgcggaaaa gccgctgatc gccatggtgc cgggtgtccct gcgcaaggat 900
 gacagctccg gcggaaacca ggtgggcgtt atcctgcct cgctacacac cgacgtcacc 960
 agcccggtta cccggctgat gcagatccac gaggatgta aggccgcaa agaccgtac 1020
 gccatgatgt ctgcggaaga aattatcaac tacaccgcc tgaccctggc gccggcggcg 1080
 ttccatctgc ttaccggcat ggcaccgaaa tggcagacct tcaacgtggt catttcgaac 1140
 gtccccgggc cccgggagac ctgctactgg aacggcgcca tgatggatgg catgtaccgg 1200
 gtctccatcg ccatggaccg cctgcacctg aacatgacc tgaccageta cggcgaccag 1260
 gtggagtctg gcctcatcgg ctgccgccgc acgctacca gcctgcagcg gatgctcgac 1320
 tacctggaag aggccctggt cgaactggag accgcggccg gcctgtga 1368

<210> 25

<211> 455

5 <212> PRT

<213> Marinobacter adhaerens

<400> 25

Met Lys Pro Leu Ser Pro Thr Asp Gln Leu Phe Leu Trp Leu Glu Lys
 1 5 10 15

Arg Gln Gln Pro Met His Val Gly Gly Leu Gln Leu Phe Ser Phe Pro
 20 25 30

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

Gln His Thr Lys Val Thr Pro Pro Phe Asn Gln Arg Leu Asp Tyr Arg
 50 55 60

Phe Gly Gln Pro Val Trp Val Glu Asp Glu His Leu Asp Leu Glu His
 65 70 75 80

His Phe Arg Phe Glu Ala Leu Pro Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Leu
 85 90 95

ES 2 678 647 T3

Leu Ser Phe Val Ser Ala Glu His Ser His Leu Met Asp Arg Glu Arg
 100 105 110

Pro Leu Trp Glu Phe His Leu Ile Glu Gly Leu Gly Glu Arg Gln Phe
 115 120 125

Ala Val Tyr Ile Lys Val His His Ala Leu Val Asp Gly Val Ser Ala
 130 135 140

Met Arg Met Val Thr Arg Met Leu Cys Gln Asp Thr Gly Glu Arg Asp
 145 150 155 160

Met Pro Pro Ile Trp Ala Met Pro Pro Arg Pro Glu Arg Glu Lys Asp
 165 170 175

Asp Gly Gly Pro Ser Leu Trp Arg Ser Ile Gly His Leu Leu Gly Glu
 180 185 190

Ser Gly Lys Gln Leu Gly Thr Val Pro Thr Val Ala Arg Glu Leu Leu
 195 200 205

Arg Thr Ile Asn Asn Ala Arg Lys Asp Pro Ala Tyr Ser Ser Ile Phe
 210 215 220

His Ala Pro Arg Ser Ile Leu Asn Gln Lys Ile Thr Gly Ser Arg Arg
 225 230 235 240

Phe Ala Ala Gln Ser Tyr Asp Leu Ser Arg Ile Lys Ala Val Cys Lys
 245 250 255

Ile Tyr Gly Thr Thr Val Asn Asp Val Val Met Ala Met Cys Ala Thr
 260 265 270

Ala Leu Arg Ser Tyr Leu Met Asn Gln Asp Ala Leu Pro Glu Lys Pro
 275 280 285

Leu Ile Ala Met Val Pro Val Ser Leu Arg Lys Asp Asp Ser Ser Gly
 290 295 300

Gly Asn Gln Val Gly Val Ile Leu Ala Ser Leu His Thr Asp Val Thr
 305 310 315 320

Ser Pro Val Thr Arg Leu Met Gln Ile His Glu Asp Val Lys Ala Ala
 325 330 335

Lys Asp Arg Tyr Ala His Met Ser Ala Glu Glu Ile Ile Asn Tyr Thr
 340 345 350

ES 2 678 647 T3

Ala Leu Thr Leu Ala Pro Ala Ala Phe His Leu Leu Thr Gly Met Ala
 355 360 365

Pro Lys Trp Gln Thr Phe Asn Val Val Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro
 370 375 380

Arg Glu Thr Cys Tyr Trp Asn Gly Ala Met Met Asp Gly Met Tyr Pro
 385 390 395 400

Val Ser Ile Ala Met Asp Arg Leu Ala Leu Asn Met Thr Leu Thr Ser
 405 410 415

Tyr Gly Asp Gln Val Glu Phe Gly Leu Ile Gly Cys Arg Arg Thr Leu
 420 425 430

Pro Ser Leu Gln Arg Met Leu Asp Tyr Leu Glu Glu Ala Leu Val Glu
 435 440 445

Leu Glu Thr Ala Ala Gly Leu
 450 455

<210> 26
 <211> 1374
 <212> ADN

5 <213> Alcanivorax borkumensis

<400> 26
 atgaaaagcgc ttagcccagt ggatcaactg ttctgtggc tggaaaaacg acagcaaccc 60
 atgcacgtag gcggtttgca gctgttttcc ttcccggaag gtgccggccc caagtatgtg 120
 agtgagctgg cccagcaaat gcgggattac tgccaccag tggcgccatt caaccagcgc 180
 ctgaccgcgc gactcggcca gtattactgg actagagaca aacagttcga tatcgaccac 240
 cacttccgcc acgaagcact ccccaaacc ggtcgcattc gogaactgct ttctttggtc 300
 tccgccgaac attccaacct gctggaccgg gagcgcacca tgtgggaagc ccatttgatc 360
 gaagggatcc gcggtcgcca gttcgtctc tattataaga tccaccattc ggtgatggat 420
 ggcataatccg ccatgcgtat cgcctcaaaa acgctttcca ctgaccccag tgaacgtgaa 480
 atggctccgg cttgggcggt caacacaaa aaacgctccc gctcactgcc cagcaacccg 540
 gttgacatgg cctccagcat ggcgcgcta accgcgagca taagcaaca agctgccaca 600
 gtgcccggtc tcgcgggga ggtttacaaa gtcacccaaa aagccaaaaa agatgaaaac 660
 tatgtgtota tttttcaggc tcccgacacg attctgaata ataccatcac cggttcacgc 720
 cgctttgccg cccagagctt tccattaccg cgctgaaag ttatcgccaa ggcctataac 780
 tgcaccatta acaccgtggt gctctccatg tgtggccacg ctctgcgcga atacttgatt 840

ES 2 678 647 T3

agccaacacg cgctgcccga tgagccactg attgccatgg tgcccatgag cctgcggcag 900
gacgacagca ctggcggcaa ccagatcggg atgatcttgg ctaacctggg caccacatc 960
tgtgatccag ctaatgcct ggcgctcatc cacgattccg tcgaggaagc caaatcccgc 1020
ttctcgcaga tgagcccgga agaaattctc aatttcaccg ccctcaccat ggctcccacc 1080
ggcttgaact tactgaccgg cctagcgcca aaatggcggg cttcaacgt ggtgatttcc 1140
aacatacccg ggccgaaaga gccgctgtac tggaatggg cacagctgca aggagtgtat 1200
ccagtatcca ttgccttggg tcgcatcgcc ctaaatatca ccctcaccag ttatgtagac 1260
cagatggaat ttgggcttat cgctgcccgc cgtactctgc cttccatgca gcgactactg 1320
gattacctgg aacagtccat ccgcgaattg gaaatcggg caggaattaa atag 1374

<210> 27

<211> 457

5 <212> PRT

<213> Alcanivorax borkumensis

<400> 27

Met Lys Ala Leu Ser Pro Val Asp Gln Leu Phe Leu Trp Leu Glu Lys
1 5 10 15

Arg Gln Gln Pro Met His Val Gly Gly Leu Gln Leu Phe Ser Phe Pro
20 25 30

Glu Gly Ala Gly Pro Lys Tyr Val Ser Glu Leu Ala Gln Gln Met Arg
35 40 45

Asp Tyr Cys His Pro Val Ala Pro Phe Asn Gln Arg Leu Thr Arg Arg
50 55 60

Leu Gly Gln Tyr Tyr Trp Thr Arg Asp Lys Gln Phe Asp Ile Asp His
65 70 75 80

His Phe Arg His Glu Ala Leu Pro Lys Pro Gly Arg Ile Arg Glu Leu
85 90 95

Leu Ser Leu Val Ser Ala Glu His Ser Asn Leu Leu Asp Arg Glu Arg
100 105 110

Pro Met Trp Glu Ala His Leu Ile Glu Gly Ile Arg Gly Arg Gln Phe
115 120 125

Ala Leu Tyr Tyr Lys Ile His His Ser Val Met Asp Gly Ile Ser Ala
130 135 140

ES 2 678 647 T3

Met Arg Ile Ala Ser Lys Thr Leu Ser Thr Asp Pro Ser Glu Arg Glu
145 150 155 160

Met Ala Pro Ala Trp Ala Phe Asn Thr Lys Lys Arg Ser Arg Ser Leu
165 170 175

Pro Ser Asn Pro Val Asp Met Ala Ser Ser Met Ala Arg Leu Thr Ala
180 185 190

Ser Ile Ser Lys Gln Ala Ala Thr Val Pro Gly Leu Ala Arg Glu Val
195 200 205

Tyr Lys Val Thr Gln Lys Ala Lys Lys Asp Glu Asn Tyr Val Ser Ile
210 215 220

Phe Gln Ala Pro Asp Thr Ile Leu Asn Asn Thr Ile Thr Gly Ser Arg
225 230 235 240

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

Lys Ala Tyr Asn Cys Thr Ile Asn Thr Val Val Leu Ser Met Cys Gly
260 265 270

His Ala Leu Arg Glu Tyr Leu Ile Ser Gln His Ala Leu Pro Asp Glu
275 280 285

Pro Leu Ile Ala Met Val Pro Met Ser Leu Arg Gln Asp Asp Ser Thr
290 295 300

Gly Gly Asn Gln Ile Gly Met Ile Leu Ala Asn Leu Gly Thr His Ile
305 310 315 320

Cys Asp Pro Ala Asn Arg Leu Arg Val Ile His Asp Ser Val Glu Glu
325 330 335

Ala Lys Ser Arg Phe Ser Gln Met Ser Pro Glu Glu Ile Leu Asn Phe
340 345 350

Thr Ala Leu Thr Met Ala Pro Thr Gly Leu Asn Leu Leu Thr Gly Leu
355 360 365

Ala Pro Lys Trp Arg Ala Phe Asn Val Val Ile Ser Asn Ile Pro Gly
370 375 380

Pro Lys Glu Pro Leu Tyr Trp Asn Gly Ala Gln Leu Gln Gly Val Tyr
385 390 395 400

ES 2 678 647 T3

Pro Val Ser Ile Ala Leu Asp Arg Ile Ala Leu Asn Ile Thr Leu Thr
 405 410 415

Ser Tyr Val Asp Gln Met Glu Phe Gly Leu Ile Ala Cys Arg Arg Thr
 420 425 430

Leu Pro Ser Met Gln Arg Leu Leu Asp Tyr Leu Glu Gln Ser Ile Arg
 435 440 445

Glu Leu Glu Ile Gly Ala Gly Ile Lys
 450 455

<210> 28

<211> 1425

<212> ADN

5 <213> HpNI de gammaproteobacteria

<400> 28

atgaaagctt taagcccact ggatcagatt tttctttggc tcgaacgccg ccagcaaccc 60
 atgcacgctt cggcctgca actctttgaa ttccccgaag gtgctggcga gcactatgta 120
 tcagaacttg cccagtgggt gcgccaattc aaaaagcccg ccgctgcttt taaccagcga 180
 ttgacgcggc gcttoggaca gcctttctgg actgaagaca aacaattcga tcttgaacac 240
 cattttcgcc atgaagccct tcccgcacct gggcgaatcc gcgaactttt aacgctgggt 300
 tcttcggaac acagcaattt aatggatcgc gagcgcgccg tgtgggaata ccacctgatc 360
 gagggctttc aggatcggcg ttttgccgtg tattgcaaaa ttcaccattc catgatggac 420
 gggatctcgg cgatgcgcac aggcacgcgc gcactcacca ccaaccccga cgaatacgac 480
 ctgccaccgg tctgggcccg ccatcatcac aagactctca gcagcgccag tttaccatta 540
 ccaaaccgcg tcgacattgc ttctctggtt gccaaagtca ccgcagggct caacaagcaa 600
 ctgtccacca tccccaccgt tgcaagagaa atttacaaag ccggcgaacg cgccaaaacc 660
 gaccgggatt tcatttccgt tttccaggca ccgcatacca tccttaacga tagcatcacc 720
 ggttcccgcg gttttgctgc gcagtctttt tcagtggcac gcattgcacg aatcgccaaa 780
 gcatttcacg caacgttgaa cgatgtggta ctggcaatct gcggcagcgc actgcgaaat 840
 tacctgatca tgctgcgcaa actaccgat aagcccttaa tcgcaatggt cccagtttca 900
 ctgcgcaagg atgagagcgc agagggcaac caagttgcca tgattctcgc caatctgggc 960
 acctatattg ctgaccccag cgatcgtttg caaatggtga aggcctctgt tcgcaatgcg 1020
 aagaaacgct tcgccggtat gaccccagag gaaatcacca attacaccgc gcttacgctc 1080
 gcgcctaccg gcttgaatct catgacgggc ctacgaccgc actggctcgc ctttaacgta 1140
 gtaatatoca acgtacccgg cccccgcgac aactctact ggaacggtgc gcgtttgctc 1200
 ggcatgtacc cagtatccat cgccctcaac catgtcgcac tgaatatcac cctcaccagc 1260
 tactgcgatc agcttgaatt cggcctaate gcctgcgca gaacatgcc ttccatgcag 1320
 cgaatgctta cctatatcga aaacggcctg aacgaacttg aaatcgctgc cgacctgcat 1380
 agctgcaccg cagaggaatc tgaggagcgt ctaattcata tttga 1425

ES 2 678 647 T3

<210> 29
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> HpNI de gammaproteobacteria

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

ES 2 678 647 T3

Leu Thr Ala Gly Leu Asn Lys Gln Leu Ser Thr Ile Pro Thr Val Ala
 195 200 205

Arg Glu Ile Tyr Lys Ala Gly Glu Arg Ala Lys Thr Asp Pro Asp Phe
 210 215 220

Ile Ser Val Phe Gln Ala Pro His Thr Ile Leu Asn Asp Ser Ile Thr
 225 230 235 240

Gly Ser Arg Arg Phe Ala Ala Gln Ser Phe Ser Val Ala Arg Ile Ala
 245 250 255

Arg Ile Ala Lys Ala Phe His Ala Thr Leu Asn Asp Val Val Leu Ala
 260 265 270

Ile Cys Gly Ser Ala Leu Arg Asn Tyr Leu Ile Met Leu Arg Lys Leu
 275 280 285

Pro Asp Lys Pro Leu Ile Ala Met Val Pro Val Ser Leu Arg Lys Asp
 290 295 300

Glu Ser Ala Glu Gly Asn Gln Val Ala Met Ile Leu Ala Asn Leu Gly
 305 310 315 320

Thr His Ile Ala Asp Pro Ser Asp Arg Leu Gln Met Val Lys Ala Ser
 325 330 335

Val Arg Asn Ala Lys Lys Arg Phe Ala Gly Met Thr Pro Glu Glu Ile
 340 345 350

Thr Asn Tyr Thr Ala Leu Thr Leu Ala Pro Thr Gly Leu Asn Leu Met
 355 360 365

Thr Gly Leu Arg Pro Asp Trp Leu Ala Phe Asn Val Val Ile Ser Asn
 370 375 380

Val Pro Gly Pro Arg Asp Thr Leu Tyr Trp Asn Gly Ala Arg Leu Leu
 385 390 395 400

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

Thr Leu Thr Ser Tyr Cys Asp Gln Leu Glu Phe Gly Leu Ile Ala Cys
 420 425 430

Arg Arg Thr Met Pro Ser Met Gln Arg Met Leu Thr Tyr Ile Glu Asn
 435 440 445

Gly Leu Asn Glu Leu Glu Ile Ala Ala Asp Leu His Ser Cys Thr Ala
 450 455 460

Glu Glu Ser Glu Glu Arg Leu Ile His Ile
 465 470

ES 2 678 647 T3

<210> 30
 <211> 1377
 <212> ADN
 <213> Hahella chejuensis

5 <400> 30
 atgacccac tcagtcagtc cgaccagata ttctctggc tggaaaaacg ccaacagcct 60
 atgcatgtcg gcggccttca tattttcagtc ttccccgacg acgccgacgc caagtacatg 120
 acggaattgg cgcagcaatt acgcgcctac gccacgccac aagcgccgtt caaccgtcgc 180
 ctgcgccagc gctggggacg ttattactgg gacaccgacg ctcaagtcca ccttgagcat 240
 catttccgcc acgaagcgcg gcccaagccc ggccgcatca gagagctgct ggccgcatgtg 300
 tccgcagagc acagcaacct gatggaccgc gagcgtccca tgtgggagtg ccatctcatt 360
 gaggggattc gcggccgccc ctctcgggtg tattacaaag cgcaccattg catgctggac 420
 ggcgtcgcgc ccatgcgcat gtgcgtgaag tcttactcct ttgacccac tgccgacagag 480
 atgccgcaa tctgggcgat ttcaaaagac gtcacgccgg cgcgcgaaac ccaggcgcgc 540
 gccgcaggcg atctggttca cagcctgtcg caactgggtg aaggcgcgcg cagacaactc 600
 gccaccgtcc ccacgctgat cagggaaactt ggtaaaaacc tgctgaaagc gcgggatgac 660
 agcgcgcgcg gcctgatctt cgcgcgcgcg ccgagcattc tcaatcaacg cattaccggc 720
 tcgcgtcgtt tcgccgcccc gtcctacgca ctggagcgtt tcaaagccat cggcaaagcg 780
 ttccaggcca cggtaacgca tgtggtgctg gcggtatgcg gcagcgcctt gcgcaattat 840
 ttgctcagcc gtcaggcgtt gcccgatcag cctttgatcg ccatggcgcg catgtccatc 900
 cgccaggatg acagcgacag cggtaatcaa atcgccatga ttctggctaa tctcggcact 960
 cacatcgccg acccgggtcg acgtctggaa ttgacgcagg cgtccgcgcg ggagtccaaa 1020
 gagcgttttc gccagatgac gccggaggaa gcggtcaatt acaccgcgcg cactctggct 1080
 ccctccggct tgaatctgct gaccggactg gccccaaat ggcaggcgtt caatgtggtg 1140
 atttcaaacg tgcccggccc gaacaaaccg ctgtactgga acggagcgcg tctggagggc 1200
 atgtatccgg tgcgattcc ggtggattac gccgcgttga acattacgct ggtaagctat 1260
 cgggatcagc tggagtccg ctccaccgcc tgccgcagaa ccctgccctc catgcagcgt 1320
 ttgctggact atatcgagca gggcatcgcc gagctggaga aagcagcggg agtctga 1377

<210> 31
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> Hahella chejuensis

10

ES 2 678 647 T3

<400> 31

Met Thr Pro Leu Ser Pro Val Asp Gln Ile Phe Leu Trp Leu Glu Lys
 1 5 10 15

Arg Gln Gln Pro Met His Val Gly Gly Leu His Ile Phe Ser Phe Pro
 20 25 30

Asp Asp Ala Asp Ala Lys Tyr Met Thr Glu Leu Ala Gln Gln Leu Arg
 35 40 45

Ala Tyr Ala Thr Pro Gln Ala Pro Phe Asn Arg Arg Leu Arg Gln Arg
 50 55 60

Trp Gly Arg Tyr Tyr Trp Asp Thr Asp Ala Gln Phe Asp Leu Glu His
 65 70 75 80

His Phe Arg His Glu Ala Leu Pro Lys Pro Gly Arg Ile Arg Glu Leu
 85 90 95

Leu Ala His Val Ser Ala Glu His Ser Asn Leu Met Asp Arg Glu Arg
 100 105 110

Pro Met Trp Glu Cys His Leu Ile Glu Gly Ile Arg Gly Arg Arg Phe
 115 120 125

Ala Val Tyr Tyr Lys Ala His His Cys Met Leu Asp Gly Val Ala Ala
 130 135 140

Met Arg Met Cys Val Lys Ser Tyr Ser Phe Asp Pro Thr Ala Thr Glu
 145 150 155 160

Met Pro Pro Ile Trp Ala Ile Ser Lys Asp Val Thr Pro Ala Arg Glu
 165 170 175

Thr Gln Ala Pro Ala Ala Gly Asp Leu Val His Ser Leu Ser Gln Leu
 180 185 190

Val Glu Gly Ala Gly Arg Gln Leu Ala Thr Val Pro Thr Leu Ile Arg
 195 200 205

Glu Leu Gly Lys Asn Leu Leu Lys Ala Arg Asp Asp Ser Asp Ala Gly
 210 215 220

ES 2 678 647 T3

Leu Ile Phe Arg Ala Pro Pro Ser Ile Leu Asn Gln Arg Ile Thr Gly
 225 230 235 240

Ser Arg Arg Phe Ala Ala Gln Ser Tyr Ala Leu Glu Arg Phe Lys Ala
 245 250 255

Ile Gly Lys Ala Phe Gln Ala Thr Val Asn Asp Val Val Leu Ala Val
 260 265 270

Cys Gly Ser Ala Leu Arg Asn Tyr Leu Leu Ser Arg Gln Ala Leu Pro
 275 280 285

Asp Gln Pro Leu Ile Ala Met Ala Pro Met Ser Ile Arg Gln Asp Asp
 290 295 300

Ser Asp Ser Gly Asn Gln Ile Ala Met Ile Leu Ala Asn Leu Gly Thr
 305 310 315 320

His Ile Ala Asp Pro Val Arg Arg Leu Glu Leu Thr Gln Ala Ser Ala
 325 330 335

Arg Glu Ser Lys Glu Arg Phe Arg Gln Met Thr Pro Glu Glu Ala Val
 340 345 350

Asn Tyr Thr Ala Leu Thr Leu Ala Pro Ser Gly Leu Asn Leu Leu Thr
 355 360 365

Gly Leu Ala Pro Lys Trp Gln Ala Phe Asn Val Val Ile Ser Asn Val
 370 375 380

Pro Gly Pro Asn Lys Pro Leu Tyr Trp Asn Gly Ala Arg Leu Glu Gly
 385 390 395 400

Met Tyr Pro Val Ser Ile Pro Val Asp Tyr Ala Ala Leu Asn Ile Thr
 405 410 415

Leu Val Ser Tyr Arg Asp Gln Leu Glu Phe Gly Phe Thr Ala Cys Arg
 420 425 430

Arg Thr Leu Pro Ser Met Gln Arg Leu Leu Asp Tyr Ile Glu Gln Gly
 435 440 445

Ile Ala Glu Leu Glu Lys Ala Ala Gly Val
 450 455

<210> 32
 <211> 1314

ES 2 678 647 T3

<212> ADN

<213> *Alcanivorax* sp. DG881

<400> 32

```

atgcacgtgg gcggtttgca gctgttttcc tttccagagg atgccggccc gaagtatgtc      60
agcgaactgg cccggcaaat gcgggactac tgccaccggt ttgcccctt caaccagcgt      120
ctgaccctgc ggctcggcca gtattactgg accgaagaca agcagttcga tatcgaccac      180
cactttcggc acgaagcgct gcccaagccc ggccgcatcc gtgagctgct ctccctggtt      240
tccgccgagc actccaacct gctggaccgg gaacgcccc tgtgggaagc ccatttgatt      300
gaaggcatcc gcggtcgtca gtttgcgctt tactacaaga ttcaccattc ggtgatggac      360
ggcatctccg ccattgcgcat tgccaccaag accctctcca cggaccccag cgagcgtgaa      420
atggcgccag gctgggcctt caataccgca aagcgtaccg gctcgtacc cagcaaccgg      480
gtggacgtgg cctccagcat ggccgctctg accgcccggc tcagcaagca ggccgccacg      540
gtgcccgggc tggcgcgga gatctacaag gtcaccaga aagcgaaaag tgatgaaac      600
tatgtgtcca tcttcaggc cccggacacc atccttaaca acaccatcac cggttcacgc      660
cgttttgccg cccaaagttt ctgctgccc cgcctgaaag gcattgcaa ggcctatggc      720
tgcaccatca ataccgtggt gctatccatg tgtggccacg ccctgcgga gtacctgatc      780
agccagcatg cattgcccga tgagcccctg attgccatgg tgcccatgag cctgcgtcag      840
gacgacagcg ccggcggcaa ccagatcggc atgattctgg ccaacctggg caccacatc      900
tgcgaccggg ccaaccgctt gcgggtagtg aatgactcgg ttcaggaagc caaatcccgg      960
ttctcgaaa tgagccccga ggaaatctc aacttcaccg cgctgaccat ggcaccacc      1020
ggcctcaacc tgctaccgg cctggcccc aatggcggc cattcaacgt ggtgatttcc      1080
aacgttcccg gcccgcaaga gccgctgtac tggaacggcg ctaaactgca aggcattgtac      1140
ccggtctcca ttgccctgga tcgcattgcc ctgaacatca ccctcaccag ttacgtggac      1200
cagctggaat tcggcctgat cgcctgccgc cgcaccctgc cctccatgca gcggctgctg      1260
gattacctgg aacaatcggg acgcgaactg gaaatcggcg cgggcattaa atga      1314

```

<210> 33

<211> 437

<212> PRT

<213> *Alcanivorax* sp. DG881

<400> 33

```

Met His Val Gly Gly Leu Gln Leu Phe Ser Phe Pro Glu Asp Ala Gly
1           5           10           15

```

```

Pro Lys Tyr Val Ser Glu Leu Ala Arg Gln Met Arg Asp Tyr Cys His
20           25           30

```

5

ES 2 678 647 T3

Pro Val Ala Pro Phe Asn Gln Arg Leu Thr Arg Arg Leu Gly Gln Tyr
 35 40 45

Tyr Trp Thr Glu Asp Lys Gln Phe Asp Ile Asp His His Phe Arg His
 50 55 60

Glu Ala Leu Pro Lys Pro Gly Arg Ile Arg Glu Leu Leu Ser Leu Val
 65 70 75 80

Ser Ala Glu His Ser Asn Leu Leu Asp Arg Glu Arg Pro Met Trp Glu
 85 90 95

Ala His Leu Ile Glu Gly Ile Arg Gly Arg Gln Phe Ala Leu Tyr Tyr
 100 105 110

Lys Ile His His Ser Val Met Asp Gly Ile Ser Ala Met Arg Ile Ala
 115 120 125

Thr Lys Thr Leu Ser Thr Asp Pro Ser Glu Arg Glu Met Ala Pro Gly
 130 135 140

Trp Ala Phe Asn Thr Arg Lys Arg Thr Arg Ser Leu Pro Ser Asn Pro
 145 150 155 160

Val Asp Val Ala Ser Ser Met Ala Arg Leu Thr Ala Gly Ile Ser Lys
 165 170 175

Gln Ala Ala Thr Val Pro Gly Leu Ala Arg Glu Ile Tyr Lys Val Thr
 180 185 190

Gln Lys Ala Lys Ser Asp Glu Asn Tyr Val Ser Ile Phe Gln Ala Pro
 195 200 205

Asp Thr Ile Leu Asn Asn Thr Ile Thr Gly Ser Arg Arg Phe Ala Ala
 210 215 220

Gln Ser Phe Ser Leu Pro Arg Leu Lys Gly Ile Ala Lys Ala Tyr Gly
 225 230 235 240

Cys Thr Ile Asn Thr Val Val Leu Ser Met Cys Gly His Ala Leu Arg
 245 250 255

Glu Tyr Leu Ile Ser Gln His Ala Leu Pro Asp Glu Pro Leu Ile Ala
 260 265 270

Met Val Pro Met Ser Leu Arg Gln Asp Asp Ser Ala Gly Gly Asn Gln
 275 280 285

ES 2 678 647 T3

Ile Gly Met Ile Leu Ala Asn Leu Gly Thr His Ile Cys Asp Pro Ala
 290 295 300

Asn Arg Leu Arg Val Val Asn Asp Ser Val Gln Glu Ala Lys Ser Arg
 305 310 315 320

Phe Ser Gln Met Ser Pro Glu Glu Ile Leu Asn Phe Thr Ala Leu Thr
 325 330 335

Met Ala Pro Thr Gly Leu Asn Leu Leu Thr Gly Leu Ala Pro Lys Trp
 340 345 350

Arg Ala Phe Asn Val Val Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Gln Glu Pro
 355 360 365

Leu Tyr Trp Asn Gly Ala Lys Leu Gln Gly Met Tyr Pro Val Ser Ile
 370 375 380

Ala Leu Asp Arg Ile Ala Leu Asn Ile Thr Leu Thr Ser Tyr Val Asp
 385 390 395 400

Gln Leu Glu Phe Gly Leu Ile Ala Cys Arg Arg Thr Leu Pro Ser Met
 405 410 415

Gln Arg Leu Leu Asp Tyr Leu Glu Gln Ser Val Arg Glu Leu Glu Ile
 420 425 430

Gly Ala Gly Ile Lys
 435

<210> 34

<211> 1413

<212> ADN

5 <213> Limnobacter sp. MED105

<400> 34

atgaaggcct tgacccccaa cgaccaattg ttcttgtggc tggagcgccg caaccaaccc	60
atgcatgtgg gcgggcttgt gttgctgaaa ccgccaagg gccaaagcac tattgattat	120
gtgcacaagg ttgtggcgga catgcgccacc tacaccagc cagtggcgcc tttcagcttg	180
cgtttgaagt cgcgcctggg catgtggttt tgggtggaag acgacgagtt tgacctgag	240
gcgcatttca ttcatttgtc gctgccaag ccaggccgca ttcgcaatt gctggaactg	300
acttccaaac tgcattgctc gccgctggac cgcgcaaagc ccctgtggga agcctatgtc	360
atcgatggtc tggaaagcgg ccgtgtggct ttgtacacca aggtgcacca tgcgctgggt	420
gacggtgtgg cctgcatgaa aatggtgcag cgttccatgg ccgacaacc ggagatcatg	480

ES 2 678 647 T3

gacattccac cgttgtgggc caaccogaat ttgcgggggt cggttcagcg ttcagaggcg 540
 tcggaagggt tggtcacat gctgggccag gtgctggaca ccgccaaaac ccaactgttc 600
 agcttgccca agtggtgaa ggaagtgggg cgatccctgt ggcaaaccag cgtggccgat 660
 cctgattttg tatcgggtgat acaggccccg cgcagtgtgt tgaaccgccg tattactgcc 720
 tcgcgccgag tggccgccca atcttgggtcc atggagcgca tcaaggcttg cgcaaccggc 780
 ctgaacatga ctttgaacga tgtgggtgctg gccatgtgtg gttcggcctt gcgttcctac 840
 ttgagcgcgc tgaatgcgct gcccgcgcgc ccgctgggtg ccatggtgcc ggtgtcgctt 900
 cgcaaagacg acacggcaac cggtaacat gtggccctgt tgttggccaa tttggccaca 960
 gacaccgaag accctgttga gcggattgaa accattgctc gttcagttaa ccattccaaa 1020
 gaacggtttg ccagcatgaa tcaaaactgaa atcatgaact acgtggccac catgatgggc 1080
 attagcggat tcaacatggt gaccggcctg gcgccgaagt tgcaggcctt caacattgtg 1140
 atttogaatg tgccgggccc caagcacacc ctgtatttca atggcgcaga ggtagatggt 1200
 gtatatcccc tttcactgct gctggatggg caggccttga acattacctt gaacagctat 1260
 gctggcaagc tggagtttgg tttggtcgcg tgccgcagaa ccatgccttc catgcagcgt 1320
 ctgttcagct tcttgaaga cggcctggtt gagctggaag aagcggcggc caaggaagcc 1380
 aaagccaatc tgaaaaagcg caacgcggct tga 1413

<210> 35

<211> 470

5 <212> PRT

<213> Limnobacter sp. MED105

<400> 35

Met Lys Ala Leu Thr Pro Asn Asp Gln Leu Phe Leu Trp Leu Glu Arg
 1 5 10 15

Arg Asn Gln Pro Met His Val Gly Gly Leu Val Leu Leu Lys Pro Pro
 20 25 30

Lys Gly Gln Ser Thr Ile Asp Tyr Val His Lys Val Val Ala Asp Met
 35 40 45

Arg Thr Tyr Thr Gln Pro Val Ala Pro Phe Ser Leu Arg Leu Lys Ser
 50 55 60

Arg Leu Gly Met Trp Phe Trp Val Glu Asp Asp Glu Phe Asp Leu Glu
 65 70 75 80

Ala His Phe Ile His Leu Ser Leu Pro Lys Pro Gly Arg Ile Arg Glu
 85 90 95

ES 2 678 647 T3

Leu Leu Glu Leu Thr Ser Lys Leu His Ala Ser Pro Leu Asp Arg Ala
 100 105 110

Lys Pro Leu Trp Glu Ala Tyr Val Ile Asp Gly Leu Glu Asp Gly Arg
 115 120 125

Val Ala Leu Tyr Thr Lys Val His His Ala Leu Val Asp Gly Val Ala
 130 135 140

Cys Met Lys Met Leu Gln Arg Ser Met Ala Asp Asn Pro Glu Ile Met
 145 150 155 160

Asp Ile Pro Pro Leu Trp Ala Asn Pro Asn Leu Arg Gly Ser Val Gln
 165 170 175

Arg Ser Glu Ala Ser Glu Gly Leu Val Thr Met Leu Gly Gln Val Leu
 180 185 190

Asp Thr Ala Lys Thr Gln Leu Phe Ser Leu Pro Lys Val Val Lys Glu
 195 200 205

Val Gly Arg Ser Leu Trp Gln Thr Ser Val Ala Asp Pro Asp Phe Val
 210 215 220

Ser Val Ile Gln Ala Pro Arg Ser Val Leu Asn Arg Arg Ile Thr Ala
 225 230 235 240

Ser Arg Arg Val Ala Ala Gln Ser Trp Ser Met Glu Arg Ile Lys Ala
 245 250 255

Cys Ala Thr Gly Leu Asn Met Thr Leu Asn Asp Val Val Leu Ala Met
 260 265 270

Cys Gly Ser Ala Leu Arg Ser Tyr Leu Ser Glu Leu Asn Ala Leu Pro
 275 280 285

Ala Arg Pro Leu Val Ala Met Val Pro Val Ser Leu Arg Lys Asp Asp
 290 295 300

Thr Ala Thr Gly Asn His Val Ala Leu Leu Leu Ala Asn Leu Ala Thr
 305 310 315 320

Asp Thr Glu Asp Pro Val Glu Arg Ile Glu Thr Ile Ala Arg Ser Val
 325 330 335

Asn His Ser Lys Glu Arg Phe Ala Ser Met Asn Gln Thr Glu Ile Met
 340 345 350

ES 2 678 647 T3

Asn Tyr Val Ala Thr Met Met Gly Ile Ser Gly Phe Asn Met Leu Thr
 355 360 365

Gly Leu Ala Pro Lys Leu Gln Ala Phe Asn Ile Val Ile Ser Asn Val
 370 375 380

Pro Gly Pro Lys His Thr Leu Tyr Phe Asn Gly Ala Glu Val Asp Gly
 385 390 395 400

Val Tyr Pro Val Ser Leu Leu Leu Asp Gly Gln Ala Leu Asn Ile Thr
 405 410 415

Leu Asn Ser Tyr Ala Gly Lys Leu Glu Phe Gly Leu Val Ala Cys Arg
 420 425 430

Arg Thr Met Pro Ser Met Gln Arg Leu Leu Gln Phe Leu Glu Asp Gly
 435 440 445

Leu Val Glu Leu Glu Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Lys Ala Asn Leu
 450 455 460

Lys Lys Arg Asn Ala Ala
 465 470

<210> 36
 <211> 1422
 <212> ADN

5 <213> Marinobacter aquaeolei

<400> 36
 atgaaacgctc tcggaaccct ggatgcctcc tggctggcgg ttgaatctga agacaccccg 60
 atgcatgtgg gtacgcttca gattttctca ctgcctgaag gcgcaccaga aaccttcctg 120
 cgtgacatgg tcaactogaat gaaagaagcc ggcgatgtgg caccaccctg gggatacaaa 180
 ctggcctggt ccggtttcct cgggcgtgtg atcgccccgg cctggaaagt cgataaggat 240
 atcgatctgg attatcacgt ccggcactca gccctgcccc gccccggcgg tgagcgcgaa 300
 ctgggcattc tggtatcccg gctgcaactct aacccccctgg atttttcccg ccctctttgg 360
 gaatgccacg ttattgaagg cctggagaat aaccgttttg ccctttacac caaatgcac 420
 cactcgatga ttgacggcat cagcggcgtg cgactgatgc agaggggtgct caccaccgat 480
 cccgaacgct gcaatatgcc accgccctgg acggtacgcc cgcaccaacg ccgtggcgca 540
 aaaaccgaca aagaggccag tgtccccgcc gcggtttccc aggccatgga cgccctgaaa 600
 ctgcaggcag acatggcacc caggctgtgg caggccggca atcgccctggt gcattcggtt 660
 cgacacccgg aagacggact gaccgcccc ttcaccggcc cggtttccgt gctcaaccac 720

ES 2 678 647 T3

cgggttacgg cgcagcggcg attcgccacc cagcactatc aactggatcg gctgaagaac 780
 ctggctcatg ctccggcgcg ctccctgaac gatatactgc tttacctgtg tggcacggcg 840
 ctgcgacgct ttctggcgga gcagaacaat ctgcccagaca cccactgac ggccggtata 900
 ccggtgaata tccggccggc agacgacgag ggtacgggca cccagatcag tttcatgatt 960
 gcctcgctgg ccaccgacga agctgatccg ttgaaccgcc tgcaacagat caaacctcg 1020
 acccgacggg ccaaggaaca cctgcagaaa ctcccaaaa gcgcaactgac ccagtacacc 1080
 atgctgctga tgtcaccta cattctgcag ttgatgtcgg gtctcggggg gcggatgcga 1140
 ccagtcttca acgtgactat ttccaactg cccggccggg aagacacgct gtattatgaa 1200
 ggtgcccggc ttgaggccat gtatccgta tcgctgatcg ctacggcg cgccctgaat 1260
 atcacctgcc tgagctacgc cggatcgctg aatttcggtt ttaccggctg tcgggatacg 1320
 ctgccaagca tgcagaaact ggcggtttat accggtgagg ctctggatga gctggaatcg 1380
 ctgatactgc cgccgaagaa gcgccccga acccgcaagt aa 1422

<210> 37
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> Marinobacter aquaeolei

5

<400> 37
 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 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

ES 2 678 647 T3

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 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
 225 230 235 240

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 Val Phe Asn

ES 2 678 647 T3

ccggttaaca tccggccgtc cgatgacgaa gggacaggca cccagatcag tttcatgatc 960
 tcttcgcttg cgaccgacga agccgatccg ctgaccgccc tgcaaaacat caaggcgtca 1020
 acgcgaaggg ccaaagagca tttgcagaag ctgcccaaaa gcgcgctcac ccagtacacc 1080
 atgctcctga tgtcgcctta tattctgcag ctgatgtccg gccttggcgg tcgcatgagg 1140
 ccggtattta acgtcacgat ttccaatgtg ccggggcccc agagaacgct ctactacgag 1200
 ggcgcgaaac tggaagccat gtaccctgtc tcgctgatta ctcacgggtg cgctttgaac 1260
 atcacctgcc tgagctatga cggttcactg aacttcggct atacgggctg cagggatacc 1320
 ctgccgagca tgcaagagact tgccggttac acgggtgagg cactggacga actggaaagc 1380
 ctgattcttc cgccaaaggc caaacgaaa gctgcggcca agcccagtgc gccgcgcaaa 1440
 cagccgacga aaaagagtaa agcggactga 1470

<210> 39
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> Marinobacter adhaerens

5

<400> 39
 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

ES 2 678 647 T3

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

ES 2 678 647 T3

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> 40

<211> 1458

<212> ADN

5 <213> Marinobacter algicola

<400> 40

atgaaacgcc tgggcacact ggacgcttcc tggttggcgg tggaatcgga agacaccccg	60
atgcacgtcg gcaacctgca gattttttca ctaccggaag atgctccgga gacgtttcta	120
agagacatgc tcgcccgcat gaaagccgat gccgatgtag cgcgcacctg gtgctacaag	180
ctcgcctttt cggggttcct gggccgcctg gtcgccccgt cctggaaggt cgacaagaag	240
ctggatctcg actaccacgt tcgacactcg gcgttgccgc gcccggcag tgaacgggaa	300
cttgcatcc tggtatccag gctgcattcc aaccgctgg atttttccc cccgctttgg	360
gaatgccaca ttatcgaggg cctggagaac aaccgtttg ccctctacac caagatgcat	420
cattccatga ttgatggcat aagcgggtgt cggctgatgc agcgggtgct cagcgaggac	480
cccggtgaga ttaatatgct gccgccatgg tcggtacgcc cggagcggac acggggcagc	540
aagacagatt ccgaagccag catttcagcc gccctgtccc aggccatgga agccctgagg	600
attcaggccg acatggcgcc gaggctctgg aatgcgatga accgcctgat ccagtccgca	660
cggcaccggg aagaggggct gaccgcgccc tttgccggcc cggtttccgc cctcaatcac	720
cgggtcaccg gtcagcggcg gtttgccacc cagcactacc agctcgaacg gatcaaacag	780
gtcgcaccag cgtccaacgg ctccctgaac gacattgtgc tctacctctg tggcactgcc	840
ctgcgccgct ttcttggtga acaggatggt ttgccggata cgcactcac cgccggaatt	900
ccggtgaata tccgccctc cgatgaccag ggcacgggca cccagatcag cttcatgatt	960

ES 2 678 647 T3

gcctcactgg cgaccgacga agccgatccc ctcaagggc tgaagagcat caaacactct 1020
 acccgcaggg ccaaacaaca ccttcagaaa ctgccgcgta aagccctgac ccaatacacc 1080
 atgctgctga tgtcgcccta catcctgcag ttgatgtcag gcctggggcg gcgaatgcgc 1140
 ccggtgttca acgtgacat ctccaacgtg ccagggccag gggaaaccct ttactatgaa 1200
 ggagcacgac tggaggcgat gtaccgcggt tcgcttattg cccacggcg tgcgctcaac 1260
 attacttgcc tgagctacgc cggctcgctc aacttcggtt tcacgggctg ccgcatagc 1320
 ttgccagta tgcagaagct ggcggtctac accggtgagg ctttggatga actggaaagc 1380
 ctggtttcgc caccaccaaa tcagaccaa accaacgctc gaaaggcgcc tcgcaaaaag 1440
 actgcggaaa agagctaa 1458

<210> 41

<211> 485

5 <212> PRT

<213> Marinobacter algicola

<400> 41

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

ES 2 678 647 T3

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 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 Ser Asp Asp Gln 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 Lys Arg Leu Lys Ser
 325 330 335
 Ile Lys His Ser Thr Arg Arg Ala Lys Gln His Leu Gln Lys Leu Pro
 340 345 350
 Arg Lys 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 Gly Glu Thr Leu Tyr Tyr Glu
 385 390 395 400

ES 2 678 647 T3

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 Val Ser Pro
 450 455 460

Pro Pro Asn Gln Thr Lys Thr Asn Ala Arg Lys Ala Pro Arg Lys Lys
 465 470 475 480

Thr Ala Glu Lys Ser
 485

<210> 42

<211> 1470

<212> ADN

5 <213> Marinobacter sp. ELB17

<400> 42

atgaaacgcc tggcaacatt ggacgcgtct tggctagcgg tcgagtctga cgatacacc	60
atgcacgtgg gcaacttgca gattttcagc ctgcccagaca acgcccatac tacattcgcg	120
ggcgacttgg tcaaaagcat gaagcaagcc ggtaatgttg agcttccctg gggctgcaag	180
ctggtatggc caggctttct gggccgcggt ctggcgccca cctggaagca cgacaagcat	240
attgatctgg attatcacgt gcgccactcg gccctaccaa aacccggtgg tgaacgcgaa	300
ctgggggaac tggtatcgcg cctgcactcc aaccgctgg atctgtcgcg gccgctgtgg	360
gagtgccaca tgatogaagg gctggaacac aaccgtttg ccctgtacac gaagatgcat	420
cactgcatga ttgatggcat cagtgggtga cgctgatgc aaaggggtgct gagcaaatcc	480
cccgacgagc gcgacatgct gccaccctgg tcagtacgcc cggaaagcac gcgcgcaaaa	540
aagaccgaca gcgaggccag cgtgccgggt gctatatccc aagctatgga agctctcaaa	600
ctgcagttgg gcttggcacc acggctgtgg caagccagca atcgctgat tcactcggtg	660
cgccatccgg aagacggtct gaccgcgcc ttcaccggcc cggtttcaa gatcaatcat	720
cgggttactg gccagcgccg cttcgccacc cagcagtatc agttagaaga tatgaaagcc	780
atggcccgcg cctcgggcag ctcgatgaac gacattgtgc tgtatttgtg cggactgcg	840
ttgcggcggt ttctgctgga acaggacgat ttgcctgaaa taccattaac agcaggcata	900
ccggtcaaca ttcgcccggc ggatgacgaa ggcacaggaa cccagatcag cttcatgatt	960

ES 2 678 647 T3

gccgccctgg ccaccaacca acctgatccg ctaacgcgcc tgaaatgcat caaggaatct 1020
 tcgtgcaaag ccaaagagca cttgcaaaaa ttgcccaaga aagcgttgac ccaatacacc 1080
 atgatgctga tgtcgcccta catattgcag ctgatgtctg gcttggggcg gcgcatgcca 1140
 ccggtattta acgtaacct ctccaacgtt ccggggccca ccgaagatct ttattacgaa 1200
 ggcgccaac tcgaagccat gtatccggtg tcgctgatca cccacggcgg agcgttgaac 1260
 attacttgcc tgagctatgc cggatcattg aactttggtt tcaactggtg ccgcgacacc 1320
 ttaccagca tgcagaagct ggccgtgtat accggggaag cattggaaga actcagaacc 1380
 ctgctgttac cgccaagaa aaaaccagc ccacgcaaac ctagaacggc cgcgaaaaag 1440
 aagcccggg tgaacagcaa cgctagctga 1470

<210> 43

<211> 489

5 <212> PRT

<213> Marinobacter sp. ELB17

<400> 43

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

ES 2 678 647 T3

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> 44
- <211> 1566
- <212> ADN
- <213> Petunia x hybrida

5

<400> 44
 atgaaatctc tggcgaccga actgcgtaac cgctcttctg agcogtgtct caagccgatc 60
 gaaaccaagc gcaaaacat cgaggagtac gaaacggttg cggtcgaaga agaacctctg 120
 tctccgactg cgcgtctggt ccacgacgcg aatttcaacg ttcacgtggt cgtaattatc 180
 gccctggaca ctgcatttc cccgcagccg attaaggaca agctgggtcca caccctcctc 240
 aagcaccgcg gtttcacttc tctcatgggtg gtcgatgaag aaaacctcgc cgacatgaaa 300
 tgggtccaga cgaagatcga cctcgaccag cacatcattg ttccggaggt tgacgagacc 360
 cagctcgaga gcccggacaa gttttagtag gactacatct acaacctcac caagaccagc 420
 ctggaccgta ctaaaccgct gtgggacctc cacctggtaa acgttaaaac ccgtgacgcg 480
 gaagcagtcg ctctgctcgg tgtccatcac tctctgggtg acggtacctc tctgatctct 540
 ctgctgctcg cctgcacgcg tcagaccgcg gacgagctga aactgcccac catcccgacc 600
 aaaaaacgcc gtccgacccc gtccggttac agcaccaaag aggaaagctt caagctgtgg 660
 cttacctgg ccgtgatctg gctgttcatt cgcatgatcg gtaacacgct ggtggacgtg 720
 ctgatgttca tcatcactgt gatcttcctc aaagacacga agaccccgat caacaccgta 780
 ccggactctg agtctcgcgt tcgtcgtatc gttcaccgta ttatcgacct ggacgacctg 840
 aagctcgtga agaacgccat gaacatgacg atcaacgacg tggcgctcgg tattaccag 900
 gcaggtctgt ctaaatacct gaaccgtcgc tacgcggtag acgaggagga caaaggtgac 960
 accgaacgta acaacaatct gccgaagaac atccgtctcc gtagctgcct cgttatcaac 1020

ES 2 678 647 T3

ctgcgtccgt ctgcgggtat tgaagacctc gcggacatga tggagaaagg tccgaaagag 1080
 aaacgtggct ggggcaactg gttcggctac gttctcctgc cgttcaaaat cgcgctgcgt 1140
 gatgaccctc tcgactacgt aaaagaggcc aaggccaccg ttgaccgtaa gaaacgctct 1200
 tttgaggcgc tgtacacgct cattatggcc gaggtgctca tcaagatttt cggcatcaag 1260
 gttgcgacgg cggtgaccgt tcgctattc tctaaccgca cggtttgctt ttctaacggt 1320
 gttggtccgc aggaggagat cggtttctgt ggtcaccgca ttagctatct ggcgcctct 1380
 atctatggcc agccatctgc gctcatgatc aacttcaga gctacatcga caaaatgatc 1440
 atcgtggttg ccgtggatga gggcgccatt ccggaccgca aacagctgct ggatgaattc 1500
 gaaaattccc tgcacctgat caaggaggcc gtgctggaac gcggtctggt taagaatctg 1560
 aagtaa 1566

<210> 45
 <211> 521
 <212> PRT
 <213> Petunia x hybrida

5

<400> 45
 Met Lys Ser Leu Ala Thr Glu Leu Arg Asn Arg Ser Ser Glu Pro Cys
 1 5 10 15

 Leu Lys Pro Ile Glu Thr Lys Arg Lys Thr Ile Glu Glu Tyr Glu Thr
 20 25 30

 Val Ala Val Glu Glu Glu Pro Leu Ser Pro Thr Ala Arg Leu Phe His
 35 40 45

 Asp Ala Asn Phe Asn Val His Val Val Val Ile Ile Ala Leu Asp Thr
 50 55 60

 Arg Ile Ser Pro Gln Pro Ile Lys Asp Lys Leu Val His Thr Leu Leu
 65 70 75 80

 Lys His Pro Arg Phe Thr Ser Leu Met Val Val Asp Glu Glu Asn Leu
 85 90 95

 Ala Asp Met Lys Trp Val Gln Thr Lys Ile Asp Leu Asp Gln His Ile
 100 105 110

 Ile Val Pro Glu Val Asp Glu Thr Gln Leu Glu Ser Pro Asp Lys Phe
 115 120 125

 Val Glu Asp Tyr Ile Tyr Asn Leu Thr Lys Thr Ser Leu Asp Arg Thr
 130 135 140

ES 2 678 647 T3

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

ES 2 678 647 T3

gcatgaactc ggggcaggta accgaatcgg tgatcaagcc ggcaggcgag gccgtgccgc 600
 gttccccgga cggcttctat gagatagaag agcttgttcg cctgcttcag gataaaattg 660
 aagacgttca ggccccgttat tccggcaaaag tgctggagag gaagctggtg gacctgggga 720
 ttcgggaagc caaccgctat ggctggagcg atacctacac ctttaccraag tggtgggcg 780
 aacagttgct gatgaaggcg ttaaaccggc gcacgctgac cattctgctg ccttcgatta 840
 tcgaaagtgc cctggaggaa ccagcgcccc gctggattga gggggtgaag gtggcagatg 900
 ccatcatcct ggcttacgca cgggaaaaag tcaccctctt cccgggcaaa cgtccggta 960
 tcategatgt gattccagtg gacctggtgg ccaactccat catcctttcc ctggcgggaag 1020
 ctcttgagga acccggtcga cgtcgcctat atcaatggtg cagcgggggc ggcaatccaa 1080
 tctccctggg tgagttcatc gatcatctca tggcggaaac aaaagccaat tacgctgcct 1140
 acgatcacct gttctaccgg cagcccagca agccgtttct ggcggttaac cgggcgctgt 1200
 ttgatttggg gatcagtggt gttcgttac cgtctccct gacggaccgt gtgctcaaat 1260
 tactgggaaa ttccccggac ctgaaaaatgc tcaggaatct ggataccacc cagtgcctgg 1320
 caaccattht tggtttctac accgcgccgg attatatctt ccggaacgat gagctgatgg 1380
 cgtcggcgaa ccggatgggt gaggtcgata aagggctgtt cccgggtgat gcccgctga 1440
 ttgactggga gctctacctg cgcaagattc acctggccgg gctcaatcgc tatgccctga 1500
 aagaacgaaa ggtgtacagt ctgaaaaccg cgcgccagcg caaaaaagct gcctaaaaac 1560
 ggcgcgccag gaggaataaa ccatgaaatc tctggcgacc gaactgcgta accgctcttc 1620
 tgagccgtgt ctcaagccga tcgaaaacca gcgcaaaaacc atcgaggagt acgaaacggt 1680
 tgcggtcgaa gaagaacctc tgtctccgac tgcgcgtctg ttccacgacg cgaatttcaa 1740
 cgttcacgtg gtcgtaatta tcgccctgga cactcgcatt tccccgcagc cgattaagga 1800
 caagctggtc cacaccctcc tcaagcacc cgcgtttcact tctctcatgg tggatgatga 1860
 agaaaacctc gccgacatga aatgggtcca gacgaagatc gacctcgacc agcacatcat 1920
 tgttcgggag gttgacgaga cccagctcga gagcccggac aagttttag aggactacat 1980
 ctacaacctc accaagacca gcctggaccg tactaaaacc ctgtgggacc tccacctggt 2040
 aaacgttaaa acccgtgacg cggaagcagt cgtctgctc cgtgtccatc actctctggg 2100
 tgacggtacc tctctgatct ctctgctgct gcctgcacg cgtcagaccg cggacgagct 2160
 gaaactgccg accatcccga ccaaaaaacg ccgtccgacc ccgtccggtt acagcaccaa 2220
 agaggaaagc ttcaagctgt ggcattacct ggcctgacg tggtgttca ttcgatgat 2280
 cggtaacacg ctggtggacg tgctgatggt catcatcact gtgatcttcc tcaaagacac 2340
 gaagacccc atcaacaccg taccggactc tgagtctcgc gttcgtcgta tcgttaccg 2400
 tattatcgac ctggacgacc tgaagctcgt gaagaacgcc atgaacatga cgatcaacga 2460

ES 2 678 647 T3

cgtggcgctc ggtattaccc aggcaggtct gtctaaatac ctgaaccgtc gctacgcggt 2520
 agacgaggag gacaaagggtg acaccgaacg taacaacaat ctgccgaaga acatccgtct 2580
 ccgtagctgc ctcgttatca acctgcgtcc gtctgcgggt attgaagacc tcgcgacat 2640
 gatggagaaa ggtccgaaag agaaacgtgg ctggggcaac tgggtcggct acgttctcct 2700
 gccgttcaaa atcgcgctgc gtgatgacc tctcgactac gtaaaagagg ccaaggccac 2760
 cgttgaccgt aagaaacgct cttttgaggc gctgtacacg ctccattatgg ccgaggtgct 2820
 catcaagatt ttcggcatca aggttgcgac ggcggtgacc gttcgcgtat tctctaacgc 2880
 gaccgtttgc ttttctaacg ttggttggtcc gcaggaggag atcggtttct gtggtcacc 2940
 gattagctat ctggcgccgt ctatctatgg ccagccatct gcgctcatga tcaactcca 3000
 gagctacatc gacaaaatga tcatcgtggt tgccgtggat gagggcgcca ttccggaccc 3060
 gcaacagctg ctggatgact tcgaaaattc cctgcaoctg atcaaggagg ccgtgctgga 3120
 acgcggtctg gttaagaatc tgaagtaa 3148

<210> 47

<211> 2950

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> operón pSGE05175: Rbs; reductasa (Maqu2220wt); sintasa de éster de cera (8798wtWS1)

<400> 47

aggaggaata aaccatggca atacagcagg tacatcacgc tgacacttca tcatcaaagg 60
 tgctcggaca gctccgtggc aagcgggttc tgatcacggg taccactggc tttctgggca 120
 aggtggtcct cgaaggctg attcggggcg tgectgatat cggcgcaatt tacctgctga 180
 tccggggcaa taaacggcat ccggatgctc gttcccgttt cctggaagaa attgccacct 240
 cctcgggtgtt tgaccgtcct cgcgaggccg attcagaggg atttgacgcc tttctggaag 300
 agcgcattca ctgcgtgacc ggtgaggtga ccgaagcggg tttcgggata gggcaggaag 360
 actatcgcaa actcgccacc gaactggatg cggatgata ctccgctgca agcgtgaatt 420
 tccgtgaaga gctcgacaag gcgctggcca tcaaacacct gtgccttcgg aatattgccg 480
 gcatggtgga tttgaatccg aagcttgccg tcctgcaggt ctccacctgc tatgtcaatg 540
 gcatgaactc gggcaggtg accgaatcgg tgatcaagcc ggcagggcag gccgtgccgc 600
 gttccccgga cggcttctat gagatagaag agcttggtcg cctgcttcag gataaaattg 660
 aagacgttca ggcccgttat tccggcaaag tgctggagag gaagctggtg gacctgggga 720
 ttcgggaagc caaccgctat ggctggagcg atacctacac cttaccaag tggctggcg 780
 aacagttgct gatgaaggcg ttaaacgggc gcacgctgac cattctgctg ccttcgatta 840

10

ES 2 678 647 T3

tcgaaagtgc cctggaggaa ccagcgcgcc gctggattga gggggtgaag gtggcagatg 900
 ccatcatcct ggcttacgca cgggaaaaag tcaccctctt cccgggcaaa cgctccggta 960
 tcacgatgt gattccagt gacctgggtg ccaactccat catcctttcc ctggcggaag 1020
 ctcttgaga acccggtcga cgtcgcctct atcaatgttg cagcgggggc ggcaatccaa 1080
 tctccctggg tgagttcatc gatcatctca tggcggaatc aaaagccaat tacgctgcct 1140
 acgatcacct gttctaccgg cagcccagca agccgtttct ggcggttaac cgggcgctgt 1200
 ttgatttggg gatcagtggt gttcgttac cgctctccct gacggaccgt gtgctcaaat 1260
 tactgggaaa ttcccgggac ctgaaaatgc tcaggaatct ggataaccacc cagtgcctgg 1320
 caaccatttt tggtttctac accgcgcggg attatatctt ccggaacgat gagctgatgg 1380
 cgctggcgaa ccggatgggt gaggtcgata aagggctgtt cccggtggat gccgcctga 1440
 ttgactggga gctctacctg cgcaagattc acctggccgg gctcaatcgc tatgccctga 1500
 aagaacgaaa ggtgtacagt ctgaaaaccg cgcgccagcg caaaaaagct gcctaaaaac 1560
 ggcgcgccag gaggaataaa ccatgacgcc cctgaatccc actgaccagc tctttctctg 1620
 gctggaaaaa cgccagcagc ccatgcatgt gggcggcctc cagctgtttt ccttcccga 1680
 aggcgcgccg gacgactatg tcgcgcagct ggcagaccag cttcggcaga agacggaggt 1740
 gaccgcccc tttaaccagc gcctgagcta tcgcctgggc cagccggtat gggtgagga 1800
 tgagcacctg gaccttgagc atcatttccg cttcggaggc ctgcccacac cggggcgtat 1860
 tcgggagctg ctgtcgttcg tatcggcgga gcattcgcac ctgatggacc gggagcggcc 1920
 catgtgggag gtgcacctga tcgagggcct gaaagaccgg cagtttgcc tctacaccaa 1980
 ggttcacat tccctggtgg acggtgtctc ggccatgcgc atggccacc ggatgctgag 2040
 tgaaaaaccg gacgaacagc gcatgccgcc aatctgggat ctgccttgc tgtcacggga 2100
 taggggtgag tcggacggac actccctctg gcgcagtgtc acccatttgc tggggctttc 2160
 gggccgccag ctggcacca ttcccactgt ggcaaaggag ctactgaaa ccatcaatca 2220
 ggcccggaa gacccggcct acgactccat tttccatgcc ccgcgctgca tgctgaacca 2280
 gaaaatcacc ggttcccgtc gtttcgccgc ccagtcctgg tgctgaaac ggattcgcgc 2340
 cgtgtgcgag gcctatggca ccacggtcaa cgatgtcgt actgccatgt gcgcagcggc 2400
 tctgcgtacc tatctgatga atcaggatgc cttgccggag aaaccactgg tggcctttgt 2460
 gccggtgtca ctacgcccgg acgacagctc cgggggcaac caggtaggcg tcatcctggc 2520
 gagccttcac accgatgtgc aggaggccgg cgaacgactg ttaaaaatcc accatggcat 2580
 ggaagaggcc aagcagcgt accgtcatat gagcccggag gaaatcgtca actacacggc 2640
 cctgaccctg gcgcggccg ccttccacct gctgaccggg ctggcgcca agtggcagac 2700
 cttcaatgtg gtgatttcca atgtccccgg gccatccagg cccctgtact ggaacggggc 2760
 gaaactggaa ggcattgtat cgggtgtctat cgatatggac agactggccc tgaacatgac 2820
 actgaccagc tataacgacc aggtggagtt cggcctgatt ggctgtgcc ggaccctgcc 2880
 cagcctgcaa cggatgctgg actacctgga acagggctctg gcagagctgg agctcaacgc 2940
 cggctgtgaa 2950

<210> 48
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> rbs de promotor trcE

<400> 48
aggaggaata aacc 14

REIVINDICACIONES

1. Célula huésped fotosintética recombinante manipulada genéticamente para la producción de ésteres de ácido graso a partir de acil-ACP, en la que la célula huésped recombinante comprende:
 5 una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera y una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, en la que la célula huésped fotosintética recombinante no expresa uno o más de:
- 10 a) una acil-ACP tioesterasa exógena,
 b) una acil-CoA tioesterasa exógena y
 c) una acil-CoA sintetasa exógena.
2. Célula huésped fotosintética recombinante según la reivindicación 1, en la que la sintasa de éster de cera comprende un polipéptido que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto al polipéptido de SEC ID nº 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43 o a un fragmento funcional del polipéptido de SEC ID nº 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43.
- 20 3. Célula huésped fotosintética recombinante manipulada genéticamente para la producción de ésteres de cera, en la que la célula huésped fotosintética recombinante comprende:
 una secuencia
 25 de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP sintasa de éster de cera, en la que la acil-ACP sintasa de éster de cera que presenta una secuencia de identidad de por lo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto al polipéptido de SEC ID nº 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43, o a un fragmento funcional del polipéptido codificado por cualquiera de las SEC ID nº 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43, y una secuencia de ácidos nucleicos no nativa que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, en la que la acil-ACP reductasa formadora de alcohol comprende un polipéptido que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto al polipéptido de SEC ID nº 2, 4, 6, 8 o 10, o a un fragmento funcional del polipéptido codificado por cualquiera de las SEC ID nº 2, 4, 6, 8 o 10, en el que la célula huésped fotosintética recombinante no incluye una molécula de ácidos nucleicos exógena codificante de cualquiera de:
 35 a) una acil-ACP tioesterasa exógena,
 b) una acil-CoA tioesterasa exógena y
 40 c) una acil-CoA sintetasa exógena.
4. Célula huésped fotosintética recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que se satisface cualquiera de las condiciones siguientes:
 45 (a) la célula huésped no presenta una secuencia de ácidos nucleicos exógena codificante de una acil-ACP tioesterasa; la célula huésped no presenta una secuencia de ácidos nucleicos exógena codificante de una acil-CoA tioesterasa y la célula huésped no presenta una secuencia de ácidos nucleicos exógena codificante de una acil-CoA sintetasa,
 50 (b) la célula huésped presenta una expresión atenuada o presenta una mutación que confiere actividad reducida al enzima codificado en una o más de entre una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-ACP tioesterasa, una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-CoA tioesterasa y una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-CoA sintetasa,
 55 (c) la célula huésped no expresa uno o más de entre una acil-ACP tioesterasa, un acil-CoA tioesterasa y una acil-CoA sintetasa,
 (d) la célula huésped no expresa ninguna de una acil-ACP tioesterasa, una acil-CoA tioesterasa y una acil-CoA sintetasa,
 (e) la célula huésped no comprende una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-ACP tioesterasa, una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-CoA tioesterasa o una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-CoA sintetasa, y
 60 (f) la célula huésped no comprende una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-ACP tioesterasa, una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-CoA tioesterasa y una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de una acil-CoA sintetasa,

5. Célula huésped fotosintética recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que se satisface cualquiera de las condiciones siguientes:

(a) la sintasa de éster de cera y/o la acil-ACP reductasa formadora de alcohol son heterólogos respecto a la célula huésped fotosintética recombinante,
 (b) la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la sintasa de éster de cera y/o la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol se optimizan para sus codones para la expresión en la célula huésped,
 (c) la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la sintasa de éster de cera y/o la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol se integran en el genoma de la célula huésped fotosintética recombinante, y
 (d) la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la sintasa de éster de cera y/o la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol se encuentran presentes en uno o más vectores en la célula huésped fotosintética recombinante.

6. Célula huésped fotosintética recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que se satisface cualquiera de las condiciones siguientes:

(a) la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la sintasa de éster de cera y/o la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la acil-ACP reductasa formadora de alcohol se encuentran operablemente ligadas a un promotor y/o intensificador,
 (b) la sintasa de éster de cera y/o la acil-ACP reductasa formadora de alcohol proceden de una especie microbiana o procariótica,
 (c) tanto la secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una sintasa de éster de cera como la secuencia de ácidos nucleicos no nativa codificante de una acil-ACP reductasa formadora de alcohol se encuentran presentes en la célula huésped y ambas se derivan del mismo género,
 (d) la célula huésped fotosintética recombinante comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP reductasa exógena formadora de aldehído graso y/o una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una acil-ACP reductasa endógena formadora de aldehído graso,
 (e) la producción de acil-ACP se encuentra regulada positivamente en la célula huésped fotosintética recombinante,
 (f) la célula huésped fotosintética recombinante expresa o produce por lo menos un polipéptido exógeno, o sobreexpresa o sobreproduce por lo menos un polipéptido endógeno, seleccionado de entre una β -cetoacil sintetasa, una acetil-CoA carboxilasa, una malonil-CoA:ACP transacilasa, una acil-ACP sintetasa, ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa, una ficobiliproteína, proteína portadora de acilos y un transportador transmembranal y
 (g) la célula huésped fotosintética recombinante presenta expresión atenuada de una acil-ACP sintasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, acetaldehído-CoA deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa o acetato quinasa.

7. Célula huésped fotosintética recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula huésped fotosintética recombinante es una cianobacteria del género *Agmenellum*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Anacystis*, *Aphanizomenon*, *Arthrospira*, *Asterocapsa*, *Borzia*, *Calothrix*, *Chamaesiphon*, *Chlorogloeopsis*, *Chroococcidiopsis*, *Chroococcus*, *Crinalium*, *Cyanobium*, *Cyanocystis*, *Cyanospira*, *Cyanothece*, *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermum*, *Dactylococcopsis*, *Dermocarpella*, *Fischerella*, *Fremyella*, *Geitleria*, *Geitlerinema*, *Gloeobacter*, *Gloeocapsa*, *Gloeotheca*, *Halospirulina*, *Iyengariella*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Microcystis*, *Myxosarcina*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Nostochopsis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Pleurocapsa*, *Prochlorococcus*, *Prochloron*, *Prochlorothrix*, *Pseudanabaena*, *Rivularia*, *Schizothrix*, *Scytonema*, *Spirulina*, *Stanieria*, *Starria*, *Stigonema*, *Symploca*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Thermosynechococcus*, *Tolypothrix*, *Trichodesmium*, *Tychonema* o *Xenococcus*, o una microalga eucariótica del género *Achnanthes*, *Amphiprora*, *Amphora*, *Ankistrodesmus*, *Asteromonas*, *Boekelovia*, *Borodinella*, *Botryococcus*, *Bracteococcus*, *Chaetoceros*, *Carteria*, *Chlamydomonas*, *Chlorococcum*, *Chlorogonium*, *Chlorella*, *Chroomonas*, *Chryso-sphaera*, *Cricosphaera*, *Crypthecodinium*, *Cryptomonas*, *Cyclotella*, *Dunaliella*, *Ellipsoidon*, *Emiliania*, *Eremosphaera*, *Ernodesmium*, *Euglena*, *Franceia*, *Fragilaria*, *Gloeothamnion*, *Haemato coccus*, *Halocafeteria*, *Hymenomonas*, *Isochrysis*, *Lepocinclis*, *Micractinium*, *Monoraphidium*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Navicula*, *Neochloris*, *Nephwchloris*, *Nephwselmis*, *Nitzschia*, *Ochromonas*, *Oedogonium*, *Oocystis*, *Ostreococcus*, *Pavlova*, *Parachlorella*, *Pascheria*, *Phaeodactylum*, *Phagus*, *Picochlorum*, *Platymonas*, *Pleurochrysis*, *Pleurococcus*, *Prototheca*, *Pseudochlorella*, *Pseudoneochloris*, *Pyramimonas*, *Pyrobotrys*, *Scenedesmus*, *Skeletonema*, *Spyrogyra*, *Stichococcus*, *Tetraselmis*, *Thalassiosira*, *Viridiella* o *Volvox*.

8. Método para producir un éster de ácido graso, que comprende las etapas de cultivar una célula huésped fotosintética recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en un medio de cultivo adecuado y permitir la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una sintasa de éster de

cera y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una acil-ACP reductasa formadora de alcohol, en la que la expresión resulta en la producción del éster graso.

- 5 9. Método según la reivindicación 8, en el que se satisface cualquiera de las condiciones siguientes:
- (a) el medio adecuado comprende por lo menos un alcohol de cadena corta o por lo menos un alcohol graso,
 - (b) el medio adecuado no comprende un alcohol de cadena corta o un alcohol graso, y
 - (c) por lo menos una parte del éster de ácido graso o éster de cera producido es secretado por la célula huésped.
- 10 10. Método según la reivindicación 8 o 9, que comprende además la etapa de aislar el éster de ácido graso o éster de cera producido.
- 15 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8, 9 o 10, en el que el éster de cera comprende tanto una cadena A derivada de un alcohol graso como una cadena B derivada de acil-ACP que presentan longitudes de cadena de C₈-C₂₄, preferentemente C₁₂-C₁₆.

20

MAIQQVHHADTSSSKVLGQLRGKRVLITGTTGFLGKVVLERLIRAVPDIGAIYLLIRGNKRHP
DARSRFLEEIATSSVFDRLREADSEGFDALFEERIHCVTGEVTEAGFGIGQEDYRKLATEL
DAVINSAAASVNFREELDKALINTLCLRNIAGMVDLNPKLAVLQVSTCYVNGMNSGQVTES
VIKPAGEAVPRSPDGFYEIEELVRLQDKIEDVQARYSGKVLERKLVDLGIREANRYGWSD
TYTFTKWLGEQLLMKALNGRTLILRPSIIESALEEPAPGWIEGVKVADAILAYAREKVTLFP
GKRSGIIDVIPVDLVANSIILSLAEALGEPGRRRIYQCCSGGPNISLGEFIDHLMAESKANY
AAYDHLFYRQPSKPFLAVNRALFDLVISGVRLPLSLTDRVLKLLGNSRDLKMLRNLDTTQS
LATIFGFYTAPDYIFRNDELMALANRMGEVDKGLFPVDARLIDWELYLRKIHLAGLNRYALK
ERKVYSLKTARQRKAA (SEC ID nº 2)

Figura 1

MKQSLTLTAFANKNVLITGTTGFVGVLEKLLRSVPTIGKIYLLIRGNSKNPTARKRFQNEI
ATSSIFDTLKASQGSRFEELCETRIHCVTGEVTEPLFGLSEKDFTDLAADIDVIINSAASVNF
REALDQALTINTLCLKNIIELSRRAADCPVVQVSTCYVNGFNQGVMEEEIVSPAGERIERSE
RGYYEVEPLIARLLQDVEQVSAADDSREKDLIDLGIKEANKYGWNDTYTFTKWMGEQ
LLMKELYGKTLTILRPSIVESTLLGPAPGWIEGVKADAILAYAREKVSLEFPGKKNVIDIIPA
DLVANSIILSATEALLDSGAHRIYQCCSSEVNPRIREVIGHVQQEAEHNYQTHDKLFYRKP
KKPFVMIPGAVFHALMAISFHMLKWSSRLQSLFGRKASGRKLSNMETTMKLSKVFSFYTS
PSYTFSNRRLQELSTRLGEYDQSEFPVNAGMYDWAHYLREVHVAGLNKYALRPKVVKMN
PPAAKPRSRAA (SEC ID nº 4)

Figura 2

MATQQQQNGASASGVLEQLRGKHVLITGTTGFLGKVVLEKLIRTVPDIGGIHLLIRGNKRHP
AARERFLNEIASSSVFERLRHDDNEAFETFLEERVHCITGEVTESRFGLTPERFRALAGQV
DAFINSAASVNFREELDKALKINTLCLENVAALAEELNSAMAVIQVSTCYVNGKNSGQITESVI
KPAGESIPRSTDGYEIEELVHLLQDKISDVKARYSGKVLEKKLVDLGIREANNYGWSDTY
TFTKWLGEQLLMKALSGRSLTIVRPSIIESALEEPPSPGWIEGVKVADAILLAYAREKVSLFPG
KRSGIIDVIPVDLVANSIILSLAEALSGSGQRRRIYQCCSGGSNPISLGKFIDYLMAEAKTNYAA
YDQLFYRRPTKPFVAVNRKLFVGVVGGMRVPLSIAGKAMRLAGQNRELKVLKLNLDTTRSL
ATIFGFYTAPDYIFRNDSLMALASRMGELDRVLPVDARQIDWQLYLCKIHLGGLNRYALK
ERKLYSLRAADTRKKA (SEC ID n° 6)

Figura 3

MATQQLNPDASSKVLRLRGKHVLITGTTGFLGKVVLEKLIRAVPDIGGIHLLIRGNKRHPD
ARDRFFEEIATSSVFDRLRQDDNEAFETFIEDRVHCVTGEVTEPLFGLSADRFRKLAGGID
VVVNSAASVNFREELDKALAINTRCLDNVAELARQNKSLAVLQVSTCYVNGMNSGQITETV
IKPAGEAIPRSTEGYYEIEELVRLLEDKIADVRSRYSGKALEKKLVDLGIREANHYGWSDTY
TFTKWLGEQLLLKALSGRALTIVRPSIIESALEEPAPGWIEGVKVADAILAYAREKVTLFPGK
RAGVIDVIPVDLVANAILAAAEAVADSPRHRIYQCCSGSSNPVSLGQFIDHLMAESKANFA
EYDQLFYRQPTKPFIAVNRRLFDVVGVRIPLSITGKVLRLMLGQNRELKVLRLNLDTTRSL
ATIFGFYTAPDYIFRNDDLLALASRMGELDKVLFVVDARQIDWSVYLRKIHLAGLNRYALKE
RKVYSLRSAKARKKAA (SEC ID nº 8)

Figura 4

MSQYSAFSVSQSLKKGKHIFLTGVTGFLGKAILEKLLYSVPQLAQIHILVRGGKVS AKKRFQH
DILGSSIFERLKEQHGEHFEEWVQSKINLVEGELTQPMFDLPSAEFAGLANQLDLIINSAAS
VNFRENLEKALNINTLCLNIIIALAQYNVAAQTPVMQISTCYVNGFNKGQINEEVVGPASGL
IPQLSQDCYDIDSVFKRVHSQIEQVKKRKT DIEQQEQALIKLGIKTSQHFGWNDTYTFTKWL
GEQLLIQKLGKQSLTILRPSIIESAVREPAPGWVEGVKADALIYAYAKGRVSIFPGRDEGIL
DVIPVDLVANAAALSAAQLMESNQQTGYRIYQCCSGSRNPIKLKEFIRHIQNVAQARYQEW
PKLFADKPQEAFKTVSPKRFKLYMSGFTAITWAKTIIGRVFGSNAASQHMLKAKTTASLANI
FGFYTAPNYRFSSQKLEQLVKQFDTTEQRLYDIRADHFDWKYYLQEVHMDGLHKYALAD
RQELKPKHVKKRKRRETIRQAA (SEC ID nº 10)

Figura 5

MTPLNPTDQLFLWLEKRQQPMHVGGLQLFSFPEGAPDDYVAQLADQLRQKTEVTAPFNQ
RLSYRLGQPWVVEDEHLDLEHHFRFEALPTPGRIRELLSFVSAEHSMLDRERPMWEVH
LIEGLKDRQFALYTKVHSLVDGVSAMRMATRMLSENPDDEHGMPPDWLPCLSRDRGES
DGHSLWRSVTHLLGLSDRQLGTIPTVAKELLKTINQARKDPAYDSIFHAPRCMLNQQITGS
RRFAAQSWCLKRIRAVCEAYGTTVNDVVTAMCAAALRTYLMNQDALPEKPLVAFVPVSLR
RDDSSGGNQVGVILASLHTDVQDAGERLLKIHGMEEAKQRYRHMSPEEIVNYTALTLP
AAFHLLTGLAPKWQTFNVVISNVPGPSRPLYWNGAKLEGMPVPSIDMDRLALNMTLTSYN
DQVEFGLIGCRRTLPSLQRMLDYLEQGLAELELNAGL
(SEC ID n° 19)

Figura 6

MKRLGTLASWLAVESEDTPMHVGTQIFSLPEGAPETFLRDMVTRMKEAGDVAPPWGY
KLAWSGFLGRVIAPAWKVDKIDLDYHVRHSALPRPGERELGILVSRHNSPLDFSRPL
WECHVIEGLENNRFALYTKMHSMIDGISGVRLMQRVLTTDPERCNMPPPWTVRPHQRR
GAKTDKEASVPAAVSQAMDALKLQADMAPRLWQAGNRLVHSVRHPEDGLTAPFTGPVS
VLNHRVTAQRRFATQHYQLDRLKNLAHASGGSLNDIVLYLCGTALRRFLAEQNNLPDTPLT
AGIPVNIRPADDEGTGTQISFMIASLATDEADPLNRLQQIKTSTRRAKEHLQKLPKSALTQY
TMLLMSPYILQLMSGGLGGRMRPVFNVTISNVPGPEGTLYYEGARLEAMYPSLIAHGGAL
NITCLSYAGSLNFGFTGCRDTLPSMQKLAVYTGEALDELESLILPPKRRARTRK (SEC ID
n° 21)

Figura 7

MKRLATLDASWLAVESDDTPMHVGNLQIFSLPDNAPSTFAGDLVKSMKQAGNVELPWGC
KLVWPGFLGRVLAPTWKHDKHIDL DYHVRHSALPKPGERELGELVSRLHSNPLDLSRPL
WECHMIEGLEHNRFALYTKMHHC MIDGISGVRLMQRVLSKSPDERDMLPPWSVRPESTR
GKKT DSEASVPGAISQAMEALKLQLGLAPRLWQASNRLIHSVRHPEDGLTAPFTGPVSKIN
HRVTGQRRFATQQYQLED MKAMARASGSSMNDIVLYL CGTALRRFLLEQDDLPEISL TAG
IPVNIRPADDEGTGTQISFMIAALATNQPDP LTRLKCIKES SCKAKEHLQKLPKKALTQYTM
MLMSPYILQLMSG LGGRMRPVFNVTISNVP GPTEDLYYEGAKLEAMY PVSLITHGGALNIT
CLSYAGSLNFGFTGCRDTLPSMQKLAVYTGEALEELRTLLLPPKKKPSPRKPRTAAKKKPA
VNSNAS (SEC ID nº 43)

Figura 8

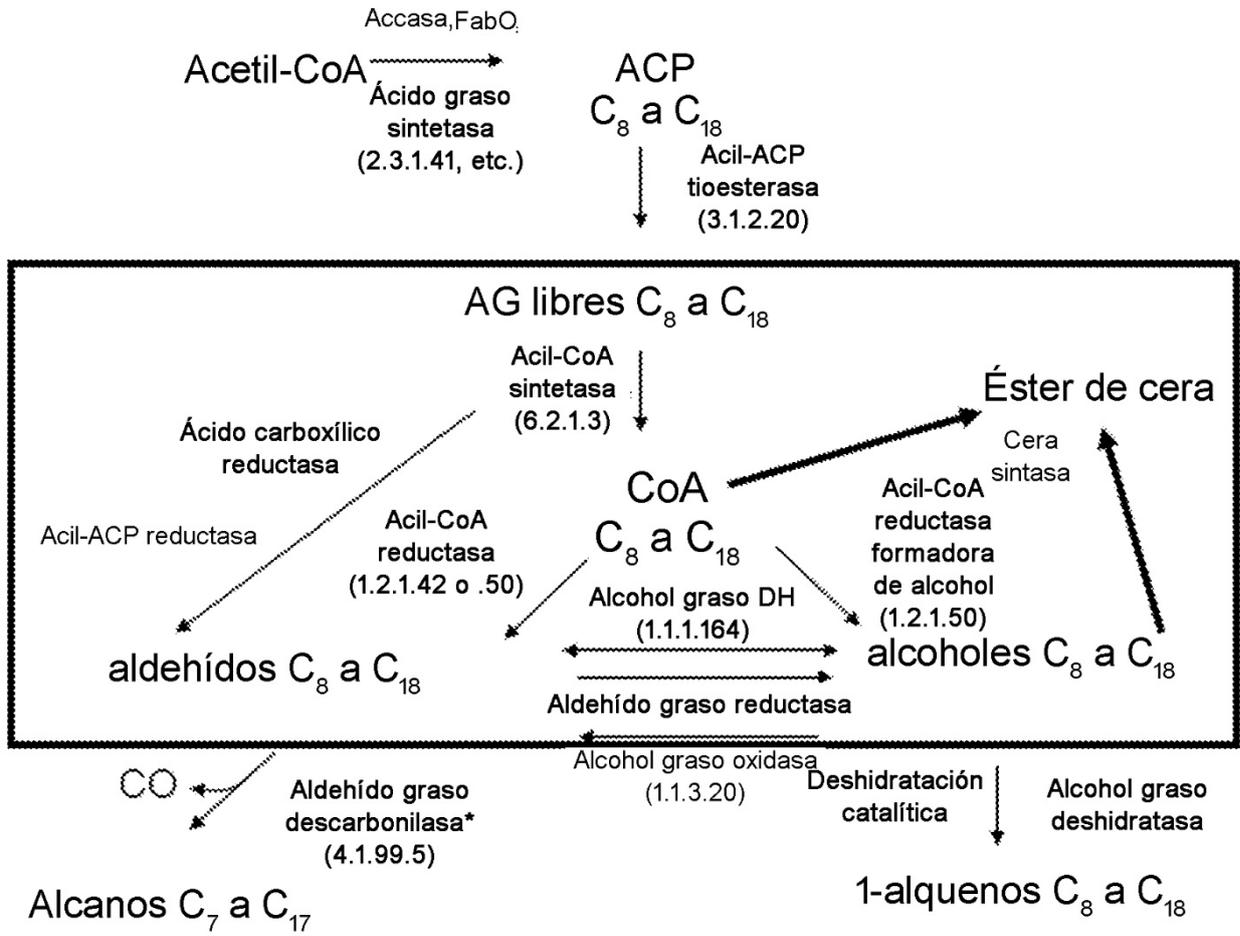


Figura 9

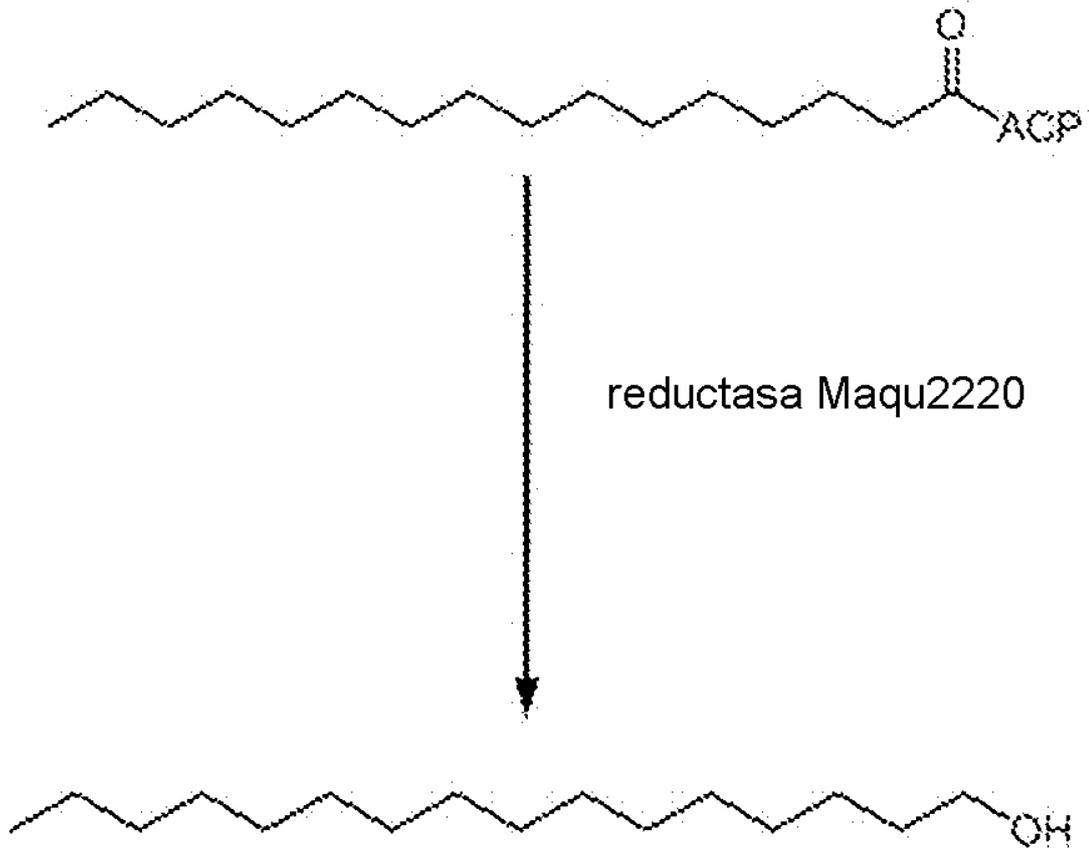


Figura 10

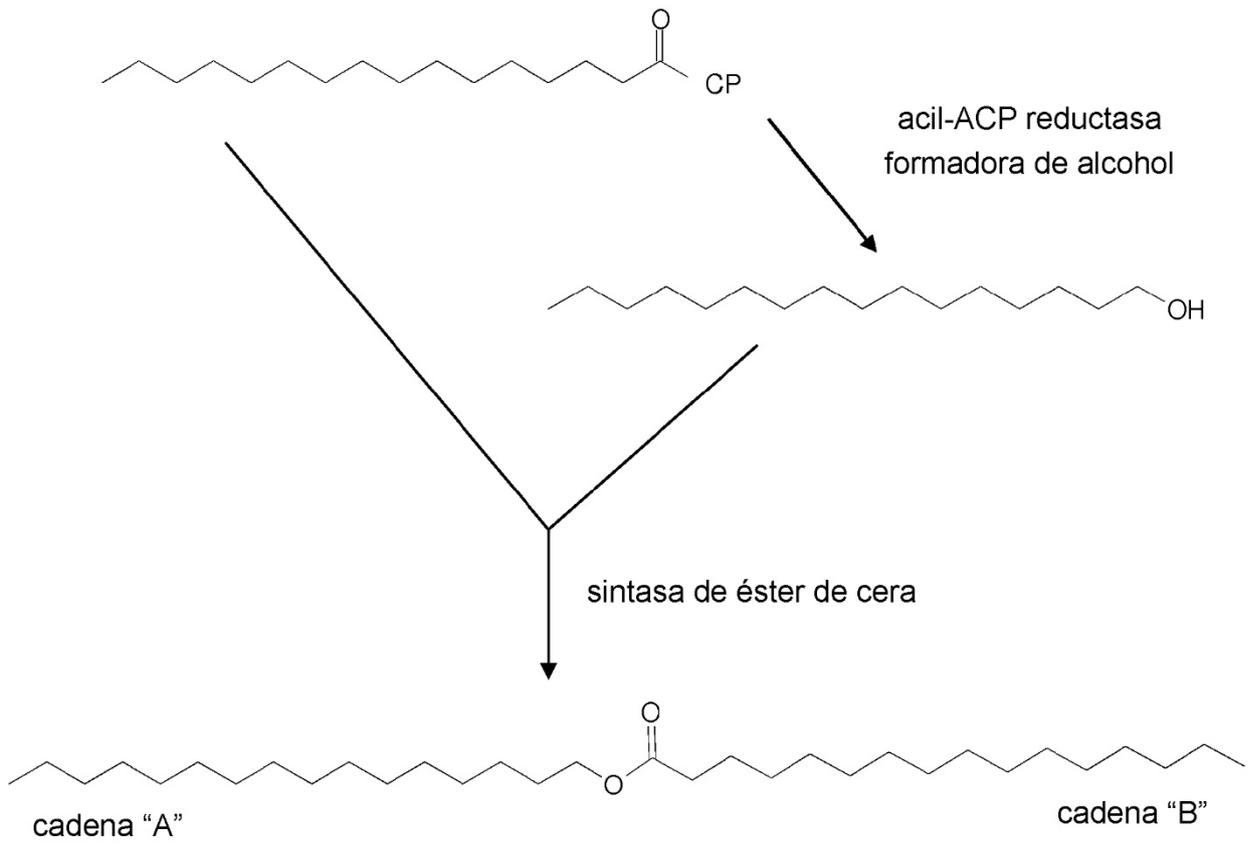


Figura 11

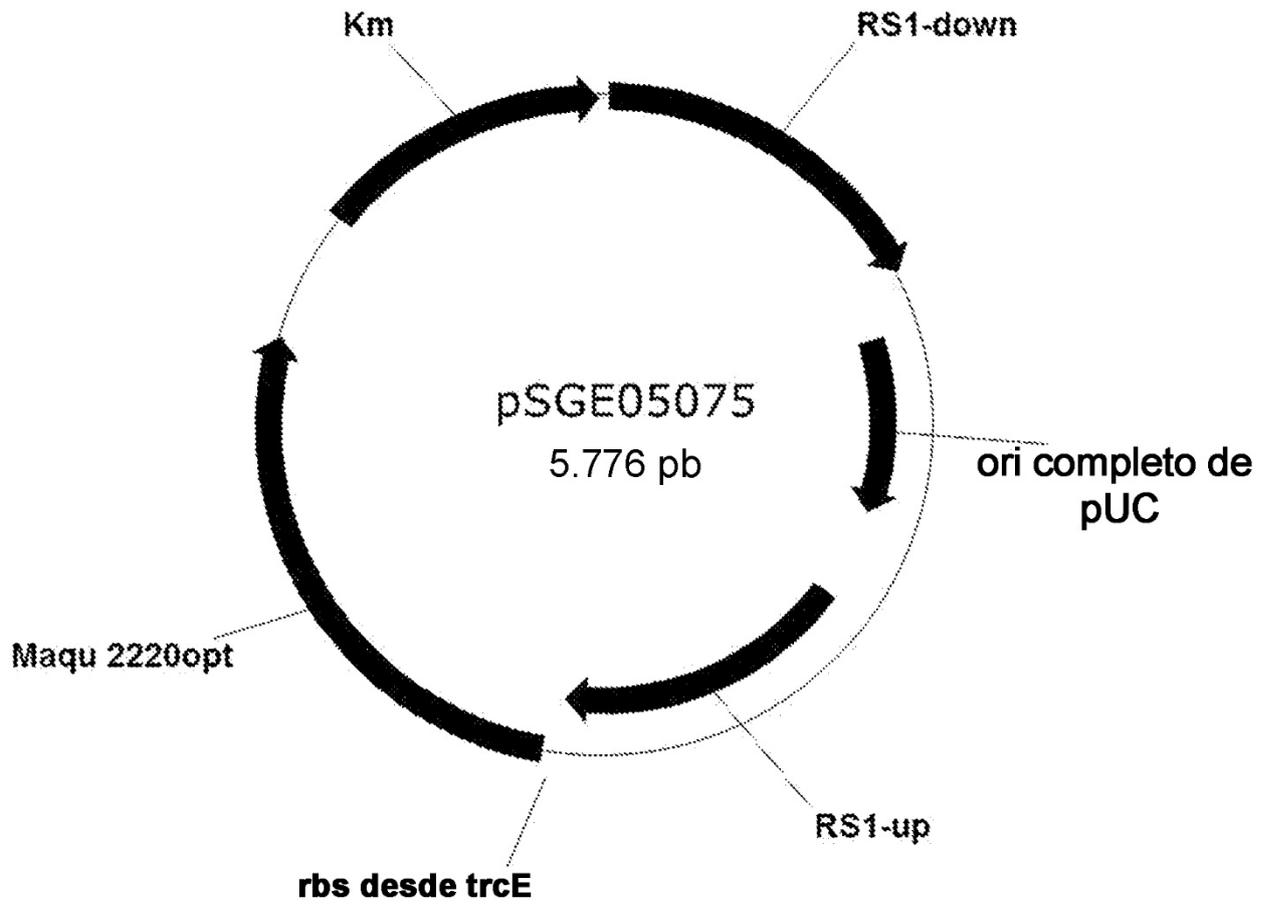


Figura 12

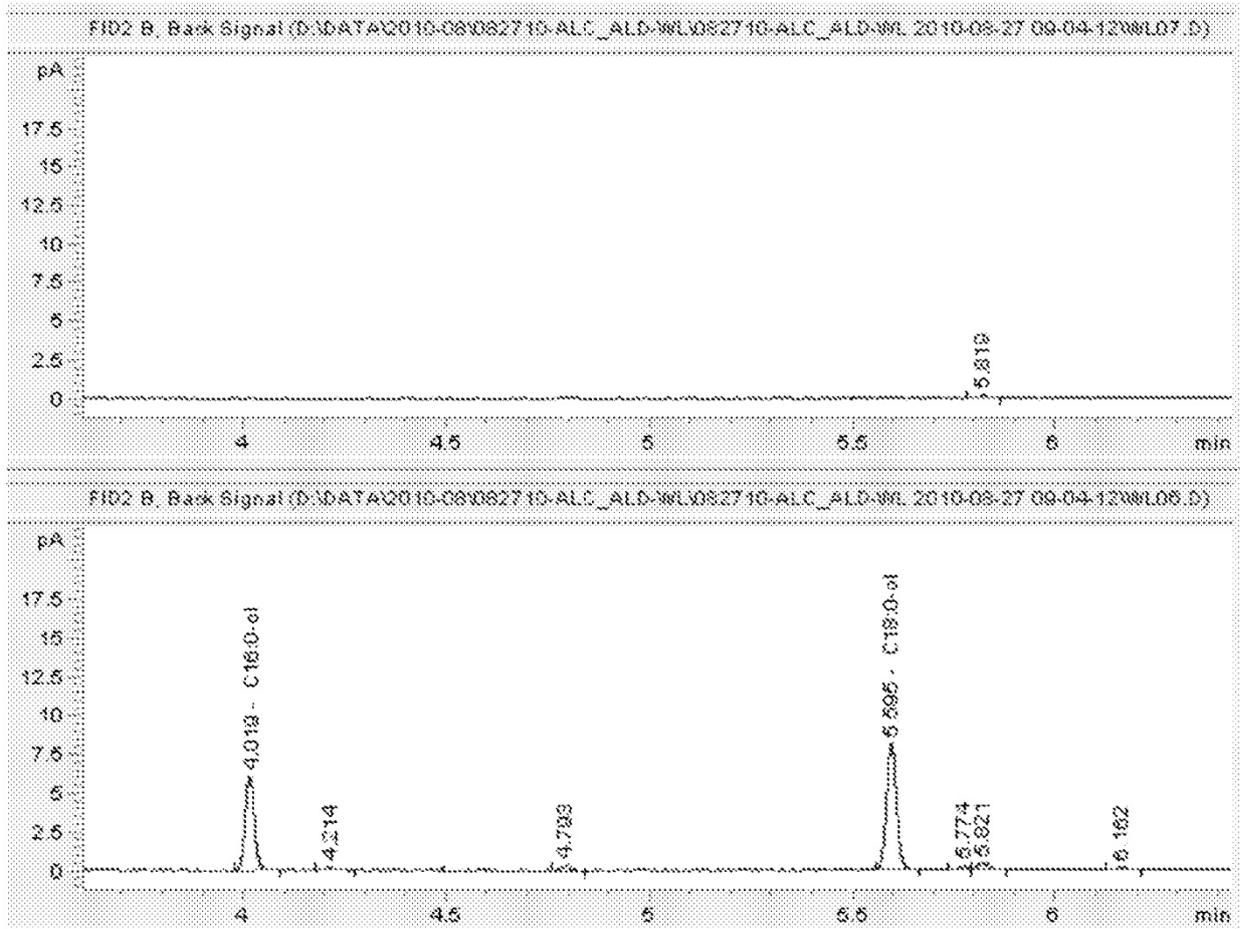


Figura 13

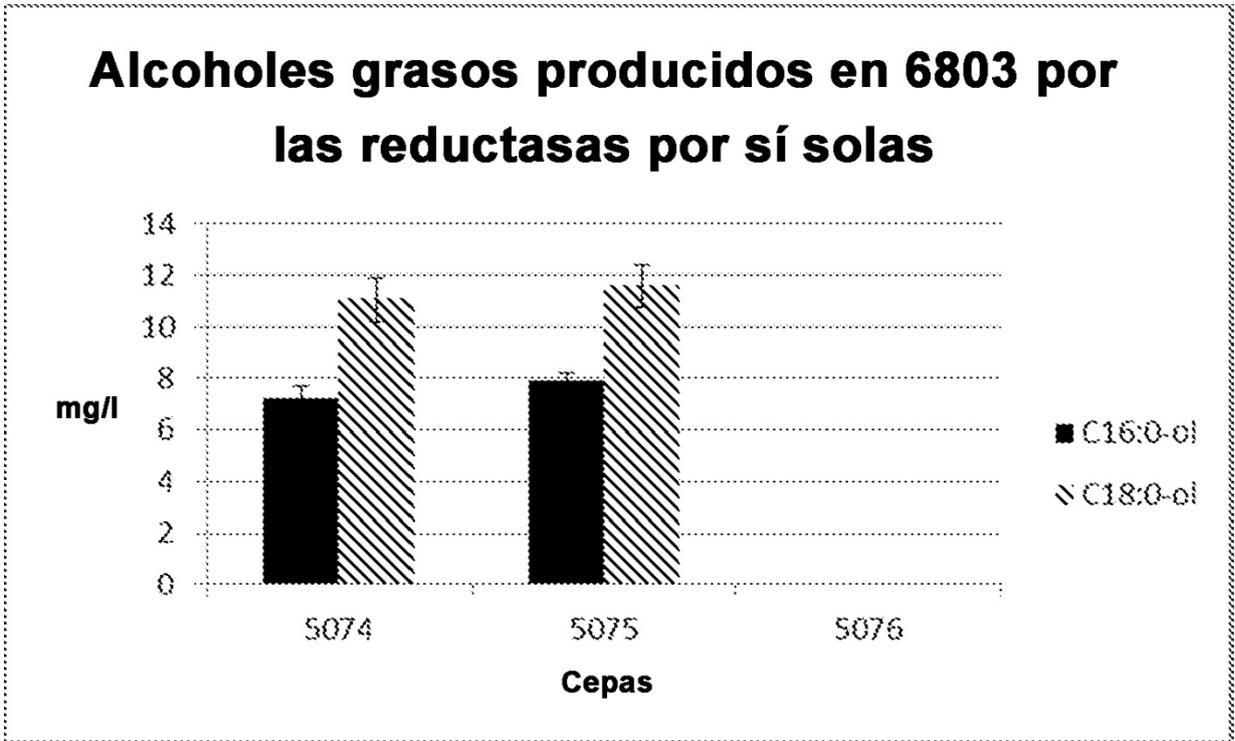


Figura 14

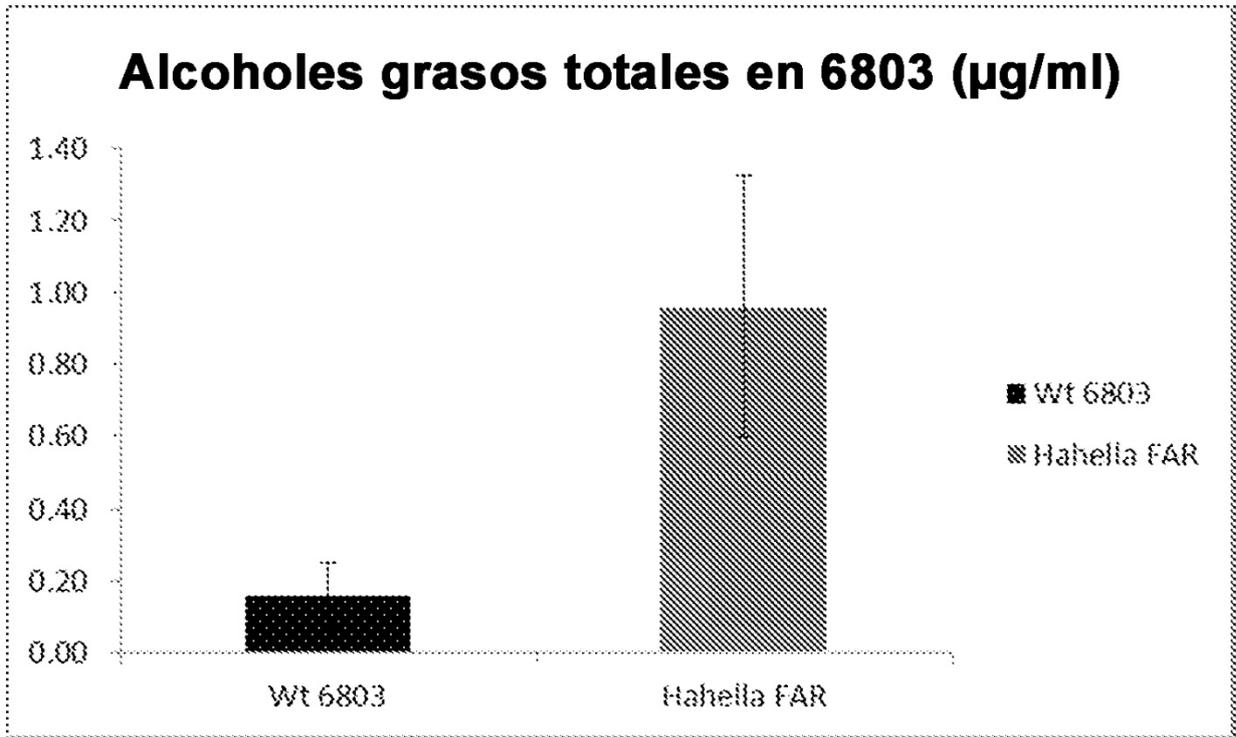


Figura 15

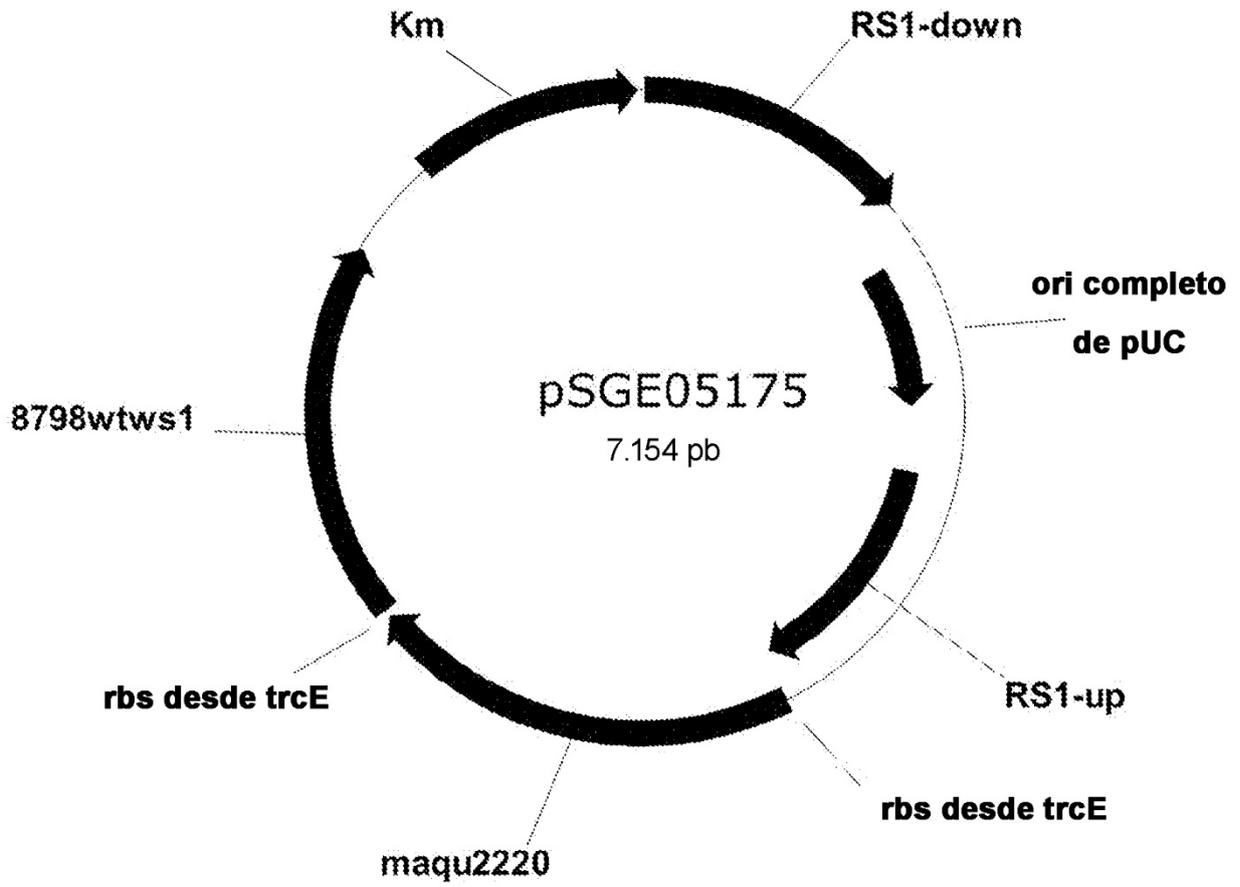


Figura 16

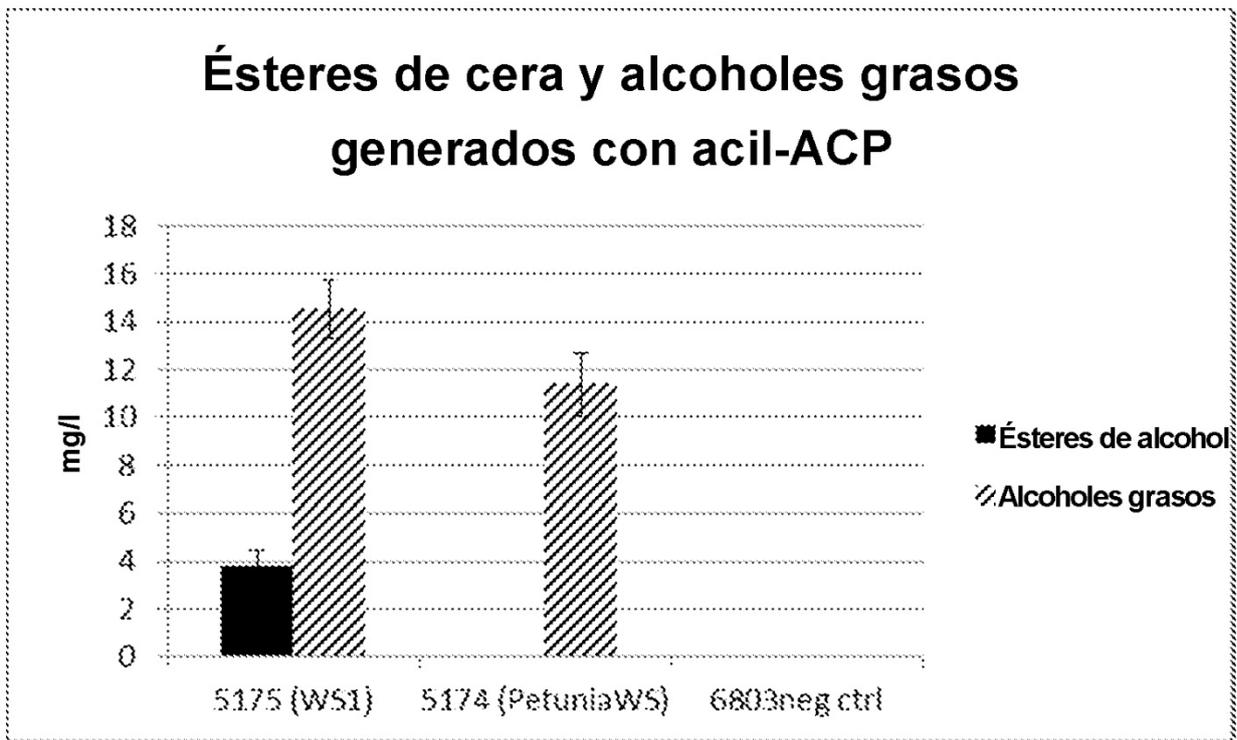


Figura 17