

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 624**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20	(2006.01)
C12N 9/02	(2006.01)
C12N 9/04	(2006.01)
C12N 9/10	(2006.01)
C12P 7/04	(2006.01)
C12P 7/64	(2006.01)
C10L 1/08	(2006.01)
C10L 1/10	(2006.01)
C12N 9/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2007 E 14193614 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 2840131**

54 Título: **Producción de ácidos grasos y derivados de los mismos**

30 Prioridad:

19.05.2006 US 802016 P
19.05.2006 US 801995 P
13.02.2007 WO PCT/US2007/003736
28.03.2007 US 908547 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2020

73 Titular/es:

GENOMATICA, INC. (100.0%)
4757 Nexus Center Drive
San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 763 624 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción de ácidos grasos y derivados de los mismos

5 Referencias con respecto a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos N.º 60/802 016 presentada el 19 de mayo de 2006, de la solicitud provisional de los Estados Unidos N.º 60/801 995 presentada el 19 de mayo de 2006, de la solicitud provisional de los Estados Unidos N.º 60/908 547 presentada el 28 de marzo de 2007 y de la solicitud PCT con el número PCT/US2007/003736 presentada el 13 de febrero de 2007.

Campo

Se proporcionan microorganismos genomodificados que producen productos a partir de la ruta biosintética de los ácidos grasos (derivados de ácidos grasos), así como métodos de su uso.

Antecedentes

Los desarrollos tecnológicos han estado acompañados por una mayor dependencia de las fuentes de combustible y dichas fuentes de combustible son cada vez más limitadas y difíciles de adquirir. Con la quema de combustibles fósiles a un ritmo sin precedente, es probable que la demanda mundial de combustible supere pronto los suministros actuales de combustible.

Como resultado, se han dirigido esfuerzos hacia el aprovechamiento de fuentes de energía renovable, tales como la luz solar, agua, viento y biomasa. El uso de biomasa para producir nuevas fuentes de combustible que no procedan de fuentes de petróleo, (es decir, biocombustible) ha surgido como una opción alternativa. El biocombustible (biodiésel) es un combustible inflamable biodegradable, de combustión limpia, compuesto por alcanos y ésteres de cadena larga. El biodiésel puede usarse en forma pura en la mayoría de los motores diésel de combustión interna, lo que se denomina biodiésel "puro", o como una mezcla en cualquier concentración con diésel de petróleo normal. Los métodos actuales de producción de biodiésel implican la transesterificación de triacilglicéridos (principalmente aceite vegetal) que conduce a una mezcla de ésteres de ácidos grasos y al producto secundario no deseado, la glicerina, proporcionando por tanto un producto que es heterogéneo y un producto de desecho que provoca ineficiencias económicas.

35 Sumario

En el presente documento se desvelan microorganismos recombinantes que son capaces de sintetizar productos derivados de la ruta biosintética de los ácidos grasos (derivados de ácidos grasos), y opcionalmente liberar dichos productos en el caldo de fermentación. Dichos derivados de ácidos grasos son útiles, entre otras cosas, como biocombustibles y productos químicos especializados. Estos biocombustibles y productos químicos especializados pueden utilizarse para fabricar productos adicionales, tales como complementos nutricionales, polímeros, sustitutos de parafina y productos para el cuidado personal.

Los microorganismos recombinantes desvelados en este documento pueden genomodificarse para producir diversos derivados de ácidos grasos que incluyen, pero sin limitación, alcoholes de cadena corta tales como etanol, propanol, isopropanol y butanol, alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, hidrocarburos y ésteres de ceras.

En un ejemplo, la divulgación proporciona un método para modificar un microorganismo para que produzca y, opcionalmente libere, derivados de ácidos grasos generados a partir de una fuente de carbono renovable. Dichos microorganismos se genomodifican, por ejemplo, introduciendo una secuencia de ADN exógeno que codifique una o más proteínas capaces de metabolizar una fuente de carbono renovable para producir y, en algunos ejemplos, secretar, un derivado de ácido graso. Después, los microorganismos modificados pueden usarse en un procedimiento de fermentación para producir derivados de ácidos grasos útiles utilizando, como material de partida, la fuente de carbono renovable (biomasa). En algunos ejemplos, se utiliza un microorganismo existente, que puede tratarse genéticamente debido a la facilidad de genomodificar sus rutas para controlar el crecimiento, la producción y reducir o eliminar reacciones secundarias que reducen la eficacia de la ruta biosintética. Además, dichos microorganismos modificados pueden usarse para consumir fuentes de carbono renovables para generar combustibles que puedan usarse directamente como biocombustibles, sin la necesidad de métodos especiales para su almacenamiento o transporte. En otros ejemplos, microorganismos que producen de manera natural hidrocarburos, se genomodifican para que sobreproduzcan hidrocarburos expresando secuencias de ácido nucleico exógeno que aumentan la producción de ácidos grasos.

En el presente documento se proporcionan microorganismos que producen derivados de ácidos grasos que tienen niveles de saturación, ramificación y longitud de la cadena de carbono definidos. En ejemplos particulares, la producción de productos homogéneos disminuye el coste global asociado a la fermentación y separación. En algunos ejemplos, se proporcionan microorganismos que incluyen una o más secuencias de ácido nucleico exógeno que

codifican al menos una tioesterasa (CE 3.1.2.14), y al menos una cera sintasa (CE 2.3.1.75). En otros ejemplos, se proporcionan microorganismos que incluyen una o más secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican al menos una tioesterasa (CE 3.1.2.14) y al menos una alcohol acetiltransferasa (2.3.1.84). En otros ejemplos más, se proporcionan microorganismos que incluyen una o más secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican al menos una tioesterasa (CE 3.1.2.14), al menos una acil-CoA reductasa (CE 1.2.1.50) y al menos una alcohol deshidrogenasa (CE 1.1.1.1). También se proporcionan microorganismos que expresan una o más secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican al menos una tioesterasa (CE 3.1.2.14) y al menos una acil-CoA reductasa formadora de alcohol graso (CE 1.1.1.*). Para proporcionar productos homogéneos pueden elegirse péptidos de tioesterasa codificados por las secuencias de ácido nucleico exógeno.

En algunos ejemplos, el microorganismo que se genomodifica para producir el derivado de ácido graso es *E. coli*, *Z. mobilis*, *Rhodococcus opacus*, *Ralstonia eutropha*, *Vibrio furnissii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactococcus lactis*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas* o *Micrococcus leuteus* y sus microorganismos relacionados.

En otros ejemplos, los microorganismos que producen hidrocarburos de forma endógena pueden genomodificarse para sobreproducir hidrocarburos optimizando la ruta biosintética de los ácidos grasos tal como se describe en el presente documento. Como ejemplos de microorganismos que se sabe que producen hidrocarburos y que pueden genomodificarse para sobreproducir hidrocarburos usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento se incluyen *Arthrobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Botryococcus braunii*, *Chromatium sp.*, *Cladosporium resina* (ATCC22711), *Clostridium pasteurianum* VKM, *Clostridium tenanomorphum*, *Clostridium aciuriaci*, especies de *Corynebacterium*, especies de cianobacterias (*Nostoc muscorum*, *Anacystis (Synechococcus) nidulans*, *Phormidium luridum*, *Chlorogloea fritschii*, *Trichodesmium erythaeum*, *Oscillatoria williamsii*, *Microcoleus chthonoplaseis*, *Coccochloris elabens*, *Agmenellum quadruplicatum*, *Plectonema terebrans*, *M. vaginatus* y *C. scopulorum*), *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC29577), *Kineococcus radiotolerans* (BAA-149), *Micrococcus luteus* (FD533, ATCC 272, 381,382, ISU, 540, 4698, 7468, 27141), *Micrococcus sp.* (ATCC 146, 398, 401, 533), *Micrococcus roseus* (ATCC 412, 416, 516), *Micrococcus lysodeikticus*, especies de *Mycobacterium*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Trichoderma virida*, *Pullularia pullulans*, *Jeotgalicoccus sp.* (*M. candidans*) (ATCC 8456), *Rhodopseudomonas spheroides* *Chlorobium sp.*, *Rhodospirillum rubrum* (ATCC11170), *Rhodomicrobium vannielii*, *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 13637, 17444, 17445, 17666, 17668, 17673, 17674, 17679, 17677), *Saccharomycodes ludwigii* (ATCC 22711), *Saccharomyces sp.* (*oviformus*, *ludwigii*, *tropicalis*), *Vibrio furnissii* M1, *Vibrio marinus* MP-1, *Vibrio ponticus*, *Serratia marinorubra*, *Ustilago maydis*, *Ustilago nuda*, *Urocystis agropyri*, *Sphacelotheca reiliana* y *Tilletia sp.* (*foetida*, *caries*, *controversa*).

Además de genomodificarse para que exprese secuencias de ácido nucleico exógeno que permitan la producción de derivados de ácidos grasos, el microorganismo puede tener adicionalmente uno o más genes endógenos deletados o atenuados funcionalmente. Por ejemplo, *ackA* (CE 2.7.2.1), *ackB* (CE 2.7.2.1), *adhE*. (CE 1.1.1.1, 1.2.1.10), *fabF* (CE 2.3.1.179), *fabR* (registro NP_418398), *fadE* (CE 1.3.99.3, 1.3.99.-), GST (CE 6.3.2.3), *gpsA* (CE 1.1.1.94), *ldhA* (CE 1.1.1.28), *pfkB* (CE 2.3.1.54), *plsB* (CE 2.3.1.15), *poxB* (CE 1.2.2.2), *pta* (EC 2.3.1.8), glutatión sintasa (EC 6.3.2.3) y combinaciones de los mismos, pueden atenuarse.

Además de genomodificarse para que exprese secuencias de ácido nucleico exógeno que permitan la producción de derivados de ácidos grasos, el microorganismo puede tener adicionalmente uno o más genes adicionales sobreexpresados. Por ejemplo, *pdh*, *panK*, *aceEF* (que codifica el componente de deshidrogenasa E1p y el componente de dihidrolipoamida aciltransferasa E2p de los complejos de piruvato y 2-oxoglutarato deshidrogenasa, Registros: NP_414656, NP_414657, CE: 1.2.4.1.2.3.1.61,2.3.1.12), *accABCD* / *fabH* / *fabD/fabG/acpP/fabF* (que codifican FAS, Registros: CAD85557, CAD85558, NP_842277, NP_841683, NP_415613, CE: 2.3.1.180, 2.3.1.39, 1.1.1.100, 1.6.5.3, 2.3.1.179), genes que codifican acil-coA reductasas grasas (Registros: AAC45217, CE 1.2.1.-), *UdhA* o genes similares (que codifican la piridina nucleótido transhidrogenasa, Registro: CAA46822, CE: 1.6.1.1) y genes que codifican acil-CoA reductasas grasas (Registros: AAC45217, CE 1.2.1.-).

En algunos ejemplos, los microorganismos descritos en el presente documento producen al menos 1 mg de derivado de ácido graso por litro de caldo de fermentación. En otros ejemplos, los microorganismos producen al menos 100 mg/l, 500 mg/l, 1 g/l, 5 g/l, 10 g/l, 20 g/l, 25 g/l, 30 g/l, 35 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 100 g/l o 120 g/l de derivado de ácido graso por litro de caldo de fermentación. En algunos ejemplos, el derivado de ácido graso se produce y se libera del microorganismo y en otros ejemplos más, el microorganismo se somete a lisis antes de la separación del producto.

En algunos ejemplos, el derivado de ácido graso incluye una cadena de carbono que tiene una longitud de al menos 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 o 34 carbonos. En algunos ejemplos al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % del producto derivado de ácido graso producido contiene una cadena de carbono que tiene una longitud de 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 o 34 carbonos. En otros ejemplos más, al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % del producto derivado de ácido graso contiene 1, 2, 3, 4 o 5, puntos de insaturación.

También se proporcionan métodos de producción de derivados de ácidos grasos. Estos métodos incluyen el cultivo de los microorganismos descritos en este documento y la separación del producto del caldo de fermentación.

Estos y otros ejemplos se describen adicionalmente en la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

5 En la **figura 1** se muestra la ruta biosintética de FAS (por sus siglas en inglés *Fatty Acid Synthase*, ácido graso sintasa).

10 En la **figura 2** se muestran rutas biosintéticas que producen ceras. Las ceras pueden producirse en una célula hospedadora utilizando alcoholes producidos dentro de la célula hospedadora o pueden producirse añadiendo alcoholes exógenos en el medio. Un microorganismo diseñado para producir ceras producirá enzimas cera sintasa (CE 2.3.1.75) utilizando secuencias de ácido nucleico exógeno, así como secuencias de tioesterasa (CE 3.1.2.14). Otras enzimas que también pueden modularse para aumentar la producción de ceras incluyen enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos (enzimas de FAS CE 2.3.1.85), acil-CoA sintasa (CE 2.3.1.86), acil-CoA reductasa formadora de alcohol graso (CE 1.1.1.*), acil-CoA reductasa (1.2.1.50) y alcohol deshidrogenasa (CE 1.1.1.1).

15 En la **figura 3** se muestran rutas biosintéticas que producen alcoholes grasos. Los alcoholes grasos que tienen longitudes de cadena de carbono definidas pueden producirse expresando secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican tioesterasas (CE 3.1.2.14), y combinaciones de acil-CoA reductasas (CE 1.2.1.50), alcohol deshidrogenasas (CE 1.1.1.1) y acil-CoA reductasas formadoras de alcohol graso (FAR, CE 1.1.1.*). Otras enzimas que también pueden modularse para aumentar la producción de alcoholes grasos son las enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos (enzimas de FAS CE 2.3.1.85) y acil-CoA sintasa (CE 2.3.1.86).

20 En la **figura 4** se muestran rutas biosintéticas que producen ésteres de ácidos grasos. Los ésteres de ácidos grasos que tienen longitudes de cadena de carbono definidas, pueden producirse expresando de manera exógena varias tioesterasas (CE 3.1.2.14), combinaciones de acil-CoA reductasa (1.2.1.50), alcohol deshidrogenasas (CE 1.1.1.1) y acil-CoA reductasa formadoras de alcohol graso (FAR, CE 1.1.1.*), así como, acetil transferasa (CE 2.3.1.84). Otras enzimas que pueden modularse para aumentar la producción de ésteres de ácidos grasos incluyen enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos (enzimas de FAS CE 2.3.1.85) y la acil-CoA sintasa (CE 2.3.1.86).

25 En la **figura 5** se muestra la producción de alcohol graso por la cepa descrita en el ejemplo 4, cotransformada con pCDFDuet-1-fadD-acr1 y plásmidos que contienen varios genes de tioesterasa. Las cepas se cultivaron en condiciones aerobias a 25° C en medio mineral M9 con glucosa al 0,4 % en frascos de agitación. Se identificaron alcoholes grasos C10, C12, C14, C16 y C18 saturados. En algunas muestras también se detectaron pequeñas cantidades de alcoholes grasos C16:1 y C18:1. Los alcoholes grasos se extrajeron de los sedimentos celulares usando acetato de etilo y se derivatizaron con N-trimetilsililo (TMS) imidazol para aumentar la detección.

30 En la **figura 6** se muestra la liberación de alcoholes grasos de la cepa de producción. Aproximadamente, el 50 % del alcohol graso producido se liberó de las células cuando estas se cultivaron a 37° C.

35 En las **figuras 7A-7D** se muestra el espectro de CG-EM (Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas) de octanoato de octilo (C8C8) producido por hospedadores de producción que expresan alcohol acetil transferasa (AAT, CE 2.3.1.84) y hospedadores de producción que expresan cera sintasa (CE 2.3.1.75). En la **figura 7A** se muestra el extracto de acetato de acetilo de la cepa C41(DE3, ΔfadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B) en donde el plásmido pHZ1.43 expresa ADP1 (cera sintasa). En la **figura 7B** se muestra el extracto de acetato de acetilo de la cepa C41(DE3, ΔfadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B) en donde el plásmido pHZ1.43 expresa SAAT. En la **figura 7C** se muestra el extracto de acetato de acetilo de la cepa C41(DE3, ΔfadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B) en donde el plásmido pHZ1.43 no contenía ADP1 (cera sintasa) o SAAT. En la **figura 7D** se muestra el espectro de masas y el patrón de fragmentación de C8C8 producidos por C41(DE3, ΔfadE/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B) en donde el plásmido pHZ1.43 expresaba SAAT.

40 En la **figura 8** se muestra la distribución de ésteres etílicos producidos cuando la cera sintasa de *A. baylyi* ADP1 (WSadp1) se coexpresaba con el gen de tioesterasa de *Cuphea hookeriana* en un hospedador de producción.

45 En las **figuras 9A y 9B** se muestran cromatogramas de análisis de GC/MS. En la **figura 9A** se muestra un cromatograma del extracto de etilo del cultivo de la cepa LS9001 de *E. coli* transformada con los plásmidos pCDFDuet-1-fadD-WSadp1, pETDuet-1-'tesA. Las fermentaciones se sustentaron con etanol. En la **figura 9B** se muestra un cromatograma de hexadecanoato de etilo y oleato de etilo utilizados como referencia.

50 En la **figura 10** se muestra una tabla que identifica varios genes que pueden sobreexpresarse o atenuarse para aumentar la producción de derivados de ácidos grasos. La tabla también identifica varios genes que pueden modularse para alterar la estructura del producto derivado de ácido graso. Un experto habitual en la técnica apreciará que algunos de los genes que se utilizan para alterar la estructura del derivado de ácido graso también aumentarán la producción de derivados de ácido graso.

Abreviaturas y términos

60 Para describir mejor la presente divulgación y para orientar a los expertos habituales en la materia a la hora de llevar a la práctica esta divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos y métodos. Como se usa en el presente documento, "que comprende" significa "que incluye" y las formas en singular "uno(a)", "un" o "el/la" incluyen referencias en plural, a menos que en el contexto se estipule claramente otra cosa. Por ejemplo, la referencia a "que comprende una célula" incluye una o una pluralidad de dichas células, y la referencia a "que comprende la tioesterasa" incluye la referencia a uno o más péptidos de tioesterasa y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos habituales en la materia, y así sucesivamente. El término "o" se refiere a un elemento individual de elementos

alternativos indicados o una combinación de dos o más elementos, a menos que en el contexto se indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la frase "actividad tioesterasa o actividad acil-CoA reductasa formadora de alcohol graso" se refiere a actividad tioesterasa, a actividad acil-CoA reductasa formadora de alcohol graso, o a una combinación de actividad tanto acil-CoA reductasa formadora de alcohol graso como tioesterasa.

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

15 **Números de registro:** Los números de registro a lo largo de esta descripción proceden de la base de datos del NCBI (siglas del inglés *National Center for Biotechnology Information*, Centro Nacional de Información Biotecnológica) gestionada por el Instituto Nacional de Salud (*National Institute of Health*), EE.UU. Los números de registro son tal como se proporcionan en la base de datos del 27 de marzo de 2007.

20 **Números de la clasificación de enzimas (CE):** Los números de la CE proporcionados a lo largo de esta descripción proceden de la base de datos KEGG Ligand, gestionada por la *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics*, financiada en parte por la Universidad de Tokio. Los números de la CE son tal como se proporcionan en la base de datos el 27 de marzo de 2007.

25 **Atenuar:** Reducir el impacto, la actividad o la fuerza de algo. En un ejemplo, la sensibilidad de una enzima particular frente a la inhibición por retroalimentación o inhibición causada por una composición que no es un producto o un reactante (retroalimentación no específica de la ruta), se reduce de manera que la actividad enzimática no se ve afectada por la presencia de un compuesto. Por ejemplo, el gen *fabH* y su secuencia de aminoácidos correspondiente, son sensibles a la temperatura y pueden alterarse para disminuir la sensibilidad frente a fluctuaciones de temperatura. La atenuación del gen *fabH* puede utilizarse cuando se desean aminoácidos ramificados. En otro ejemplo, puede decirse que una enzima que se ha alterado para que sea menos activa es una enzima atenuada.

30 Para atenuar una enzima puede usarse una delección funcional de una enzima. Una delección funcional es una mutación, delección parcial o completa, inserción u otra variación realizada en una secuencia génica o en una secuencia que controla la transcripción de una secuencia génica, que reduce o inhibe la producción del producto génico, o que hace que el producto génico no sea funcional (es decir la mutación descrita en el presente documento para el gen *plsB*). Por ejemplo, la delección funcional de *fabR* en *E. coli* reduce la represión de la ruta biosintética de ácidos grasos y permite que *E. coli* produzca más ácidos grasos insaturados (AGI). En algunos casos, una delección funcional se describe como una mutación de desactivación.

40 Un experto habitual en la técnica apreciará que hay muchos métodos para atenuar una actividad enzimática. Por ejemplo, la atenuación puede realizarse introduciendo cambios en la secuencia de aminoácidos alterando la secuencia de ácido nucleico, colocando el gen bajo el control de un promotor menos activo, expresando ARN de interferencia, ribozimas o secuencias antisentido que se dirigen al gen de interés, o a través de cualquier otra técnica conocida en la materia.

45 **Fuente de carbono:** Generalmente se refiere a un sustrato o compuesto adecuado para su uso como fuente de carbono para el crecimiento de células procariontas o eucariotas sencillas. Las fuentes de carbono pueden ser de varias formas, entre las que se incluyen, aunque sin limitación, polímeros, hidratos de carbono, ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, aminoácidos, péptidos, etc. Éstas incluyen, por ejemplo, varios monosacáridos tales como glucosa, oligosacáridos, polisacáridos, material celulósico, xilosa y arabinosa, disacáridos, tales como sacarosa, ácidos grasos saturados o insaturados, succinato, lactato, acetato, etanol, etc., o mezclas de los mismos. Adicionalmente, la fuente de carbono puede ser un producto de la fotosíntesis, incluyendo, pero sin limitación, glucosa.

50 **ADNc (ADN complementario):** Un trozo de ADN que carece de segmentos internos, no codificantes (intrones) y secuencias reguladoras que determinan la transcripción. El ADNc puede sintetizarse mediante transcripción inversa de ARN mensajero extraído de células.

Delección: La eliminación de uno o más nucleótidos de una molécula de ácido nucleico o uno o más aminoácidos de una proteína, uniéndose entre sí las regiones en ambos lados.

60 **Detectable:** Que puede determinarse su existencia o presencia. Por ejemplo, la producción de un producto a partir de un reactante, por ejemplo, la producción de ácidos grasos C18, es detectable usando el método proporcionado más adelante en el ejemplo 11.

65 **ADN:** Ácido desoxirribonucleico. El ADN es un polímero de cadena larga que incluye el material genético de la mayoría de los organismos vivos (algunos virus tienen genes que incluyen ácido ribonucleico, ARN). Las unidades de repetición en los polímeros de ADN son cuatro nucleótidos diferentes, cada uno de los cuales incluye una de las cuatro bases,

adenina, guanina, citosina y timina unidas un azúcar de desoxirribosa al que se une un grupo fosfato. En las moléculas de ADN, los tripletes de nucleótidos, denominados codones, codifican aminoácidos en un péptido. El término codón también se usa para las secuencias correspondientes (y complementarias) de tres nucleótidos en el ARNm en el que se transcribe la secuencia de ADN.

5 **Endógeno:** Como se usa en el presente documento con referencia a una molécula de ácido nucleico y a una célula o microorganismo particular, se refiere a una secuencia de ácido nucleico o péptido que está en la célula y que no se introdujo en la célula usando técnicas de genomodificación recombinantes. Por ejemplo, un gen que estaba presente en la célula cuando la célula se aisló originalmente de la naturaleza. Un gen se sigue considerando endógeno si las secuencias de control, tales como secuencias promotoras o potenciadoras que activan la transcripción o traducción, se han alterado mediante técnicas recombinantes.

15 **Exógeno:** Como se usa en el presente documento con referencia a una molécula de ácido nucleico y a una célula particular, se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico que no se origina a partir de esa célula particular tal como se encuentra en la naturaleza. Por tanto, una molécula de ácido nucleico que no se produce de manera natural se considera que es exógena con respecto a la célula una vez introducida en la célula. Una molécula de ácido nucleico que se produce de manera natural también puede ser exógena con respecto a una célula particular. Por ejemplo, una secuencia codificante completa aislada de una célula X es un ácido nucleico exógeno con respecto a la célula Y una vez que la secuencia codificante se introduce en la célula Y, incluso si X e Y son el mismo tipo de célula.

20 **Expresión:** El proceso por el cual la información codificada en un gen se convierte en las estructuras y funciones de una célula, tal como una proteína, ARN de transferencia o ARN ribosómico. Los genes expresados incluyen los que se transcriben en ARNm y después se traducen en proteína y los que se transcriben en ARN pero no se traducen en proteína (por ejemplo, ARN de transferencia y ribosómico).

25 **Éster graso:** Incluye cualquier éster compuesto por un ácido graso. Las cadenas de carbono en los ácidos grasos pueden contener cualquier combinación de las modificaciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, la cadena de carbono puede contener uno o más puntos de insaturación, uno o más puntos de ramificación, incluyendo ramificación cíclica, y puede genomodificarse para que sea corta o larga. Para formar ésteres de ácidos grasos puede usarse cualquier alcohol, por ejemplo, alcoholes derivados de la ruta biosintética de ácidos grasos, alcoholes producidos por el hospedador de producción a través de rutas biosintéticas de ácidos no grasos, y alcoholes que se suministran en el caldo de fermentación.

30 **Derivado de ácido grasos:** Incluye productos producidos, en parte, a partir de la ruta biosintética de ácidos grasos del organismo hospedador. La ruta biosintética de ácidos grasos incluye enzimas de ácido graso sintasa que pueden genomodificarse como se describe en el presente documento para producir derivados de ácidos grasos, y en algunos ejemplos, pueden expresarse con enzimas adicionales para producir derivados de ácidos grasos que tienen características de cadena de carbono deseadas. Como ejemplos de derivados de ácidos grasos se incluyen, por ejemplo, alcoholes de cadena corta y larga, hidrocarburos y ésteres de ácidos grasos, incluidas las ceras.

35 **Caldo de fermentación:** Incluye cualquier medio que soporte la vida de los microorganismos (es decir un microorganismo que metabolice activamente carbono). Normalmente, un medio de fermentación contiene una fuente de carbono. La fuente de carbono puede ser cualquier cosa que el microorganismo pueda utilizar, con o sin enzimas adicionales, para obtener energía.

40 **Hidrocarburo:** incluye compuestos químicos que contienen los elementos carbono (C) e hidrógeno (H). Todos los hidrocarburos constan de un esqueleto de carbono y de átomos de hidrógeno unidos a este esqueleto. Algunas veces, el término se usa como una forma abreviada de la expresión "hidrocarburo alifático". Existen esencialmente tres tipos de hidrocarburos: (1) hidrocarburos aromáticos, que tienen al menos un anillo aromático; (2) hidrocarburos saturados, también conocidos como alcanos, que no tienen enlaces dobles, triples o aromáticos; y (3) hidrocarburos insaturados, que tienen uno o más enlaces dobles o triples entre átomos de carbono, se dividen en: alquenos, alquinos y dienos. Los hidrocarburos líquidos extraídos de menara geológica se denominan petróleo (literalmente "aceite de roca") o aceite mineral, mientras que los hidrocarburos geológicos gaseosos se denominan gas natural. Todos son fuentes significativas de combustible y materiales de partida como materias primas para la producción de productos químicos orgánicos y se encuentran habitualmente bajo la superficie de la tierra utilizando herramientas de la geología del petróleo. Las reservas de petróleo en rocas sedimentarias son la principal fuente de hidrocarburos para la industria energética y de productos químicos. Los hidrocarburos son de gran importancia económica porque incluyen los constituyentes de los principales combustibles fósiles (carbón mineral, petróleo, gas natural, etc.) y biocombustibles, así como plásticos, ceras, disolventes y aceites.

45 **Aislado:** Un componente biológico "aislado" (tal como una molécula de ácido nucleico, proteína o célula) se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos en los que el componente se produce de manera natural, tales como otros ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, y proteínas. Las moléculas de ácido nucleico y las proteínas que se han "aislado" incluyen moléculas de ácido nucleico y proteínas purificadas por métodos de purificación estándar. El término también incluye moléculas de ácido nucleico y proteínas preparadas por expresión recombinante en una célula hospedadora, así como moléculas de ácido nucleico y proteínas sintetizadas

químicamente.

En un ejemplo, aislada se refiere a una molécula de ácido nucleico que se produce de manera natural que no está inmediatamente contigua a ambas secuencias con las que está inmediatamente contigua (una en el extremo 5' y otra en el extremo 3') en el genoma de origen natural del organismo del que procede.

Microorganismo: Incluye especies microbianas procariotas y eucariotas de los dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eucarya*, incluyendo este último levaduras y hongos filamentosos, protozoos, algas o *protistas* superiores. Las expresiones "células microbianas" y "microbios" se usan indistintamente con el término microorganismo.

Molécula de ácido nucleico: Abarca moléculas tanto de ARN como de ADN, incluyendo, sin limitación, ADNc, ADN genómico y ARNm. Incluye moléculas de ácido nucleico sintéticas, como las que se sintetizan químicamente o se producen de forma recombinante. La molécula de ácido nucleico puede ser bicatenaria o monocatenaria. Cuando es monocatenaria, la molécula de ácido nucleico puede ser la cadena en sentido o la cadena antisentido. Además, la molécula de ácido nucleico puede ser circular o lineal.

Unido operativamente: Una primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. En general, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteína, están en el mismo marco de lectura. Las configuraciones de genes separados que se transcriben en tándem como ARN mensajero individual se denominan operones. Por tanto, la colocación de genes en estrecha proximidad, por ejemplo, en un vector plasmídico, bajo la regulación transcripcional de un promotor individual, constituye un operón sintético.

ORF (siglas del inglés *open reading frame*, marco abierto de lectura): Una serie de tripletes de nucleótidos (codones) que codifican aminoácidos sin ningún codón de terminación. Normalmente, estas secuencias son traducibles en un péptido.

Sobreexpresado: Cuando se hace que un gen se transcriba a una tasa elevada en comparación con la tasa de transcripción endógena de ese gen. En algunos ejemplos, sobreexpresión incluye adicionalmente una tasa elevada de traducción del gen en comparación con la tasa de traducción endógena de ese gen. En la técnica se conocen bien métodos de ensayo para la sobreexpresión, por ejemplo, los niveles de ARN transcrito pueden evaluarse usando rtPCR y los niveles de proteína pueden evaluarse usando análisis en gel de SDS page.

Purificado: El término purificado no requiere pureza absoluta; más bien, pretende ser un término relativo. Por tanto, por ejemplo, una preparación de derivado de ácido graso purificado, tal como una cera, o una preparación de éster de ácido graso, es una en la que el producto está más concentrado de lo que está el producto en su entorno dentro de una célula. Por ejemplo, una cera purificada es una cera que está sustancialmente separada de los componentes celulares (ácidos nucleicos, lípidos, hidratos de carbono y otros péptidos) que pueden acompañarla. En otro ejemplo, una preparación de cera purificada es una en la que la cera carece sustancialmente de contaminantes, como los que podría haber después de la fermentación.

En un ejemplo, un éster de ácido graso está purificado cuando al menos aproximadamente el 50 % en peso de una muestra está compuesta por el éster de ácido graso, por ejemplo cuando al menos aproximadamente el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 98 % o 99 % o más de una muestra está compuesta por el éster de ácido graso. Los ejemplos de métodos que pueden usarse para purificar ceras, alcoholes grasos y ésteres de ácidos grasos, incluyen los métodos descritos más adelante en el ejemplo 11.

Recombinante: Una molécula de ácido nucleico o proteína recombinante es una que tiene una secuencia que no es de origen natural, que tiene una secuencia compuesta por una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otro modo, o ambas cosas. Esta combinación artificial puede realizarse, por ejemplo, por síntesis química o manipulación artificial de segmentos aislados de moléculas de ácido nucleico o proteínas, tales como técnicas de genomodificación. Recombinante también se usa para describir moléculas de ácido nucleico que se han manipulado artificialmente, pero que contienen las mismas secuencias reguladoras y regiones codificantes que las que se encuentran en el organismo del cual se aisló el ácido nucleico. Una célula o un microorganismo recombinante es una/o que contiene una molécula de ácido nucleico exógeno, tal como una molécula de ácido nucleico recombinante.

Liberación: El movimiento de un compuesto desde el interior de una célula (intracelular) hacia el exterior de una célula (extracelular). El movimiento puede ser activo o pasivo. Cuando la liberación es activa, puede ser facilitada por uno o más péptidos transportadores y, en algunos ejemplos, puede consumir energía. Cuando la liberación es pasiva, puede ser por difusión a través de la membrana y puede facilitarse mediante la recogida continua del compuesto deseado del entorno extracelular, promoviendo así la difusión adicional. La liberación de un compuesto también puede realizarse sometiendo a lisis una célula.

Tensioactivos: Sustancias capaces de reducir la tensión superficial de un líquido en el que están disueltas. Normalmente, se componen de una cabeza soluble en agua y una cadena o cola de hidrocarburo. El grupo soluble en agua es hidrófilo y puede ser iónico o no iónico, y la cadena de hidrocarburo es hidrófoba. Los tensioactivos se utilizan en una variedad de productos, incluidos detergentes y productos de limpieza, y también se utilizan como agentes auxiliares para textiles, cuero y papel, en procedimientos químicos, en productos cosméticos y farmacéuticos, en la industria alimentaria y en agricultura. Además, se pueden utilizar para ayudar en la extracción y el aislamiento de los aceites crudos que se encuentran en entornos de difícil acceso o como emulsiones de agua.

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

Célula transformada o recombinante: Una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico, tal como una molécula de ácido nucleico que codifica la acil-CoA sintasa, por ejemplo, mediante técnicas de biología molecular. La transformación abarca todas las técnicas mediante las cuales se puede introducir una molécula de ácido nucleico en dicha célula, incluyendo, pero sin limitación, transfección con vectores víricos, conjugación, transformación con vectores plasmídicos e introducción de ADN desnudo por electroporación, lipofección y aceleración con pistola de partículas.

En condiciones que permiten la producción de producto: Cualquier condición de fermentación que permita a un microorganismo producir un producto deseado, tal como ácidos grasos, hidrocarburos, alcoholes grasos, ceras o ésteres de ácidos grasos. Las condiciones de fermentación normalmente incluyen intervalos de temperatura, niveles de aireación y selección de medios, que cuando se combinan permiten que el microorganismo crezca. Como ejemplos de medios se incluyen caldos o geles. En general, el medio incluye una fuente de carbono tal como glucosa, fructosa, celulosa, o similares, que el microorganismo puede metabolizar directamente, o pueden usarse enzimas en el medio para facilitar la metabolización de la fuente de carbono. Para determinar si las condiciones de cultivo permiten la producción del producto, el microorganismo se puede cultivar durante 24, 36 o 48 horas y se puede obtener y analizar una muestra. Por ejemplo, las células en la muestra o el medio en el que se cultivaron las células, pueden analizarse para determinar la presencia del producto deseado. Cuando se analiza la presencia de un producto pueden utilizarse ensayos tales como los proporcionados más adelante en los ejemplos.

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

Cera: Una variedad de ésteres de ácidos grasos que forman sólidos o sustancias maleables en un conjunto de condiciones físicas identificadas. Los ésteres de ácidos grasos que se denominan ceras generalmente tienen cadenas de carbono más largas que los ésteres de ácidos grasos que no son ceras. Por ejemplo, una cera generalmente forma una sustancia maleable a temperatura ambiente.

Descripción detallada

I. Producción de derivados de ácidos grasos

El organismo hospedador en el que se transforman secuencias de ADN exógeno puede ser un organismo hospedador modificado, tal como un organismo que se ha modificado para aumentar la producción de acil-ACP o acil-CoA, reducir el catabolismo de derivados de ácidos grasos y productos intermedios, o reducir la inhibición por retroalimentación en puntos específicos en la ruta biosintética. Además de modificar los genes descritos en el presente documento, se pueden desviar recursos celulares adicionales para sobreproducir ácidos grasos, por ejemplo, las rutas de lactato, succinato y/o acetato pueden atenuarse, y puede sobreexpresarse acetil-CoA carboxilasa (ACC). Las modificaciones en el hospedador de producción descrito en el presente documento pueden ser a través de alteraciones genómicas, sistemas de expresión extracromosómicos, o combinaciones de los mismos. En las figuras 1 y 2 se proporciona una visión general de la ruta.

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

La ácido graso sintasa (FAS) es un grupo de péptidos que catalizan el inicio y el alargamiento de cadenas de acilo (Marrakchi et al., *Biochemical Society*, 30:1050-1055, 2002). La proteína transportadora de acilo (ACP, siglas del inglés *acyl carrier protein*) junto con las enzimas en la ruta de FAS controlan la longitud, el grado de saturación y la ramificación de los ácidos grasos producidos. Las enzimas que pueden incluirse en FAS incluyen AccABCD, FabD, FabH, FabG, FabA, FabZ, FabI, FabK, FabL, FabM, FabB y FabF. Dependiendo del producto deseado, uno o más de estos genes pueden atenuarse o sobreexpresarse.

Por ejemplo, la ruta biosintética de ácidos grasos en el hospedador de producción usa los precursores de acetil-CoA y malonil-CoA (figura 2). Para sobreproducir estos componentes, *E. coli* u otros organismos hospedadores genomodificados, pueden servir como punto de partida para etapas posteriores de genomodificación para proporcionar el producto de salida específico (tal como, ésteres de ácidos grasos, hidrocarburos, alcoholes grasos). Se pueden realizar varias modificaciones diferentes, ya sea en combinación o individualmente, en la cepa hospedadora para obtener un aumento de la producción de acetil CoA/malonil CoA/ácido graso y derivado de ácido graso. Por ejemplo, para aumentar la producción de acetil CoA, puede construirse un plásmido con *pdh*, *panK*, *aceEF*, (que codifica el componente (que codifica el componente de deshidrogenasa E1p y el componente de dihidrolipoamida aciltransferasa E2p de los complejos de piruvato y 2-oxoglutarato deshidrogenasa), *fabH/fabD/fabG/acpP/fabF*, y en algunos ejemplos, ADN adicional que codifica acil-CoA reductasas grasas y aldehído descarboxilasas, todo bajo el control de un promotor constitutivo, o que puede controlarse de otra manera. Son ejemplos de números de registro del Genbank para estos genes: *pdh* (BAB34380, AAC73227, AAC73226), *panK* (también conocido como *coaA*, AAC76952), *aceEF* (AAC73227, AAC73226), *fabH* (AAC74175), *fabD* (AAC74176), *fabG* (AAC74177), *acpP* (AAC74178), *fabF* (AAC74179).

Adicionalmente, *fadE*, *gpsA*, *ldhA*, *pflb*, *adhE*, *pta*, *poxB*, *ackA* y/o *ackB* pueden desactivarse, o pueden reducirse sus niveles de expresión, en el microorganismo genomodificado por transformación con plásmidos replicativos o no replicativos de manera condicional que contienen mutaciones nulas o de delección de los genes correspondientes, o sustituyendo secuencias promotoras o potenciadoras. Son ejemplos de números de registro del Genbank para estos genes; *fadE* (AAC73325), *gpsA* (AAC76632), *ldhA* (AAC74462), *pflb* (AAC73989), *adhE* (AAC74323), *pta* (AAC75357), *poxB* (AAC73958), *ackA* (AAC75356) y *ackB* (BAB81430).

Los microorganismos genomodificados resultantes pueden cultivarse en un entorno deseado, por ejemplo uno con glicerol limitado (menos del 1 % p/v en el medio de cultivo). Como tales, estos microorganismos tendrán niveles de producción de acetil-CoA aumentados. La sobreproducción de malonil-CoA puede efectuarse genomodificando el microorganismo como se describió anteriormente, con ADN que codifica *accABCD* (acetil CoA carboxilasa, por ejemplo, número de registro AAC73296, CE 6.4.1.2) incluido en el plásmido sintetizado *de novo*. La sobreproducción de ácidos grasos puede realizarse incluyendo adicionalmente ADN que codifica lipasa (por ejemplo, números de registro CAA89087, CAA98876) en el plásmido sintetizado *de novo*.

En algunos ejemplos, la acetil-CoA carboxilasa (ACC) se sobreexpresa para aumentar su concentración intracelular al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces o al menos 10 veces, por ejemplo, en relación con niveles de expresión nativos.

Además, para eliminar limitaciones en la reserva de acil-CoA, puede utilizarse la mutación D311E (por ejemplo, número de registro AAC77011) de *plsB*.

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

B. De acil-ACP a ácido graso

Para genomodificar un hospedador de producción para la producción de una población homogénea de derivados de ácidos grasos, uno o más genes endógenos pueden atenuarse o delecionarse funcionalmente y pueden expresarse una o más tioesterasas. Por ejemplo, pueden producirse derivados de ácidos grasos C10 atenuando la tioesterasa C18 (por ejemplo, números de registro AAC73596 y P0ADA1), que usa C18:1-ACP y que expresa tioesterasa C10 (por ejemplo, número de registro Q39513), que usa C10-ACP. Por tanto, da como resultado una población relativamente homogénea de derivados de ácidos grasos que tienen una longitud de cadena de carbono de 10. En otro ejemplo, pueden producirse derivados de ácidos grasos C14 atenuando tioesterasas endógenas que producen ácidos grasos no C14 y expresando la tioesterasa con el número de registro Q39473 (que usa C14-ACP). En otro ejemplo más, pueden producirse derivados de ácidos grasos C12 expresando tioesterasas que usan C12-ACP (por ejemplo, número de registro Q41635) y atenuando tioesterasas que producen ácidos grasos no C12. La sobreproducción de acetil CoA, malonil CoA y ácido graso puede verificarse utilizando métodos conocidos en la materia, por ejemplo, usando precursores radiactivos, HPLC y GC-EM posteriores a la lisis celular.

Tabla 1
Tioesterasas

Número de registro	Organismo Fuente	Gen	Producto producido preferentemente
AAC73596	<i>E. coli</i>	<i>tesA</i> sin secuencia líder	C18:1
Q41635	<i>Umbellularia californica</i>	<i>fatB</i>	C12:0
Q39513;	<i>Cuphea hookeriana</i>	<i>fatB2</i>	C8:0 - C10:0
AAC49269	<i>Cuphea hookeriana</i>	<i>fatB3</i>	C14:0 - C16:0
Q39473	<i>Cinnamomum camphorum</i>	<i>fatB</i>	C14:0
CAA85388	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>fatB</i> [M141T] *	C16:1
NP 189147; NP 193041	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>fatA</i>	C18:1
CAC39106	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>fatA</i>	C18:1
AAC72883	<i>Cuphea hookeriana</i>	<i>fatA</i>	C18:1

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

C. De ácido graso a acil-CoA

- 5 Los hospedadores de producción pueden genomodificarse utilizando péptidos conocidos para producir ácidos grasos de varias longitudes. Un método de preparación de ácidos grasos implica aumentar la expresión de, o expresar formas más activas de, uno o más péptidos de acil-CoA sintasa (CE 2.3.1.86).

10 Como se usa en el presente documento, la acil-CoA sintasa incluye péptidos en el número de clasificación de enzimas CE 2.3.1.86, así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de un ácido graso en acil-CoA. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica apreciará que algunos péptidos de acil-CoA sintasa catalizarán también otras reacciones, por ejemplo, algunos péptidos de acil-CoA sintasa aceptarán otros sustratos además de ácidos grasos. Por lo tanto, también se incluyen dichos péptidos de acil-CoA sintasa no específicos. Las secuencias de péptidos de acil-CoA sintasa están a disposición del público. En la **figura 10** se proporcionan ejemplos de números de registro del GenBank.

D. De acil-CoA a alcoholes grasos

20 Los hospedadores de producción pueden genomodificarse utilizando polipéptidos conocidos para producir alcoholes grasos a partir de acil-CoA. Un método de preparación de alcoholes grasos implica aumentar la expresión de, o expresar formas más activas de, acil-CoA reductasa (FAR, CE 1.1.1.*) o acil-CoA reductasas (CE 1.2.1.50) y alcohol deshidrogenasa (CE 1.1.1.1) formadoras de alcohol graso. En lo sucesivo en el presente documento, la acil-CoA reductasa (FAR, CE 1.1.1.*), las acil-CoA reductasas (CE 1.2.1.50) y la alcohol deshidrogenasa (CE 1.1.1.1) formadoras de alcohol graso, se denominan conjuntamente péptidos formadores de alcohol graso. En algunos ejemplos, los tres genes formadores de alcoholes grasos pueden sobreexpresarse en un hospedador de producción, y aún en otros ejemplos, uno o más de los genes formadores de alcoholes grasos pueden sobreexpresarse.

30 Como se usa en el presente documento, los péptidos formadores de alcoholes grasos incluyen péptidos en los números de la clasificación de enzimas CE 1.1.1.*, 1.2.1.50 y 1.1.1.1, así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de acil-CoA en alcohol graso. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica apreciará que algunos péptidos formadores de alcoholes grasos catalizarán también otras reacciones, por ejemplo, algunos péptidos de acil-CoA reductasa aceptarán otros sustratos además de ácidos grasos. Por lo tanto, también se incluyen dichos péptidos no específicos. Las secuencias de péptidos formadores de alcoholes grasos están a disposición del público. En la **figura 10** se proporcionan ejemplos de números de registro del GenBank.

35 Los alcoholes grasos también pueden describirse como tensioactivos a base de hidrocarburo. Para la producción de tensioactivos, el microorganismo se modifica para que produzca un tensioactivo a partir de una fuente de carbono renovable. Dicho microorganismo incluye una primera secuencia de ADN exógeno que codifica una proteína capaz de convertir un ácido graso en un aldehído graso y una segunda secuencia de ADN exógeno que codifica una proteína capaz de convertir un aldehído graso en un alcohol. En algunos ejemplos, la primera secuencia de ADN exógeno codifica una ácido graso reductasa. En una realización, la segunda secuencia de ADN exógeno codifica la aldehído reductasa microsómica de mamífero o la aldehído deshidrogenasa de cadena larga. En un ejemplo adicional, la primera y segunda secuencias de ADN exógeno son de un complejo multienzimático de *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula glutinins*, *Acinobacter sp cepa M-1* o *Candida lipolytica*. En una realización, la primera y segunda secuencias de ADN heterólogo son de un complejo multienzimático de *Acinobacter sp cepa M-1* o *Candida lipolytica*.

50 Como fuentes adicionales de secuencias de ADN heterólogo que codifican proteínas convertidoras de alcohol de cadena larga para dar ácidos grasos, que pueden usarse en la producción de tensioactivos se incluyen, aunque sin limitación, *Mortierella alpina* (ATCC 32222), *Cryptococcus curvatus*, (también denominada *Apiotricum curvatum*), *Alcanivorax jadensis* (T9T =DSM 12718 =ATCC 700854), *Acinetobacter sp.* HO1-N, (ATCC 14987) y *Rhodococcus opacus* (PD630 DSMZ 44193).

En un ejemplo, el derivado de ácido graso es un producto de tensioactivo saturado o insaturado que tiene un contenido en átomos de carbono limitado a entre 6 y 36 átomos de carbono. En otro ejemplo, el producto tensioactivo tiene un contenido en átomos de carbono limitado a entre 24 y 32 átomos de carbono.

Los hospedadores apropiados para producir tensioactivos pueden ser microorganismos eucariotas o procariotas. Como ejemplos de hospedadores se incluyen *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula glutinins*, *Acinobacter sp cepa M-1*, *Arabidopsis thaliana* o *Candida lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* y *E. coli* genomodificados para expresar acetil CoA carboxilasa. También pueden utilizarse hospedadores que demuestran una capacidad innata para sintetizar altos niveles de precursores de tensioactivos en forma de lípidos y aceites, tales como *Rhodococcus opacus*, *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula glutinins* y *E. coli* genomodificados para expresar acetil CoA carboxilasa, y otras bacterias, levaduras y hongos oleaginosos.

E. De alcoholes grasos a ésteres grasos

Los hospedadores de producción pueden genomodificarse utilizando polipéptidos conocidos para producir ésteres grasos de varias longitudes. Un método de preparación de ésteres grasos incluye aumentar la expresión de, o expresar formas más activas de, uno o más péptidos de alcohol O-acetiltransferasa (CE 2.3.1.84). Estos péptidos catalizan la reacción de acetil-CoA y un alcohol para formar CoA y un éster acético. En algunos ejemplos, los péptidos de alcohol O-acetiltransferasa pueden expresarse junto con péptidos de tioesterasa, péptidos de FAS y péptidos formadores de alcoholes grasos seleccionados, permitiendo por tanto controlar la longitud de la cadena de carbono, la saturación y el grado de ramificación. En algunos casos, el operón *bkd* puede coexpresarse para permitir que se produzcan precursores de ácidos grasos ramificados.

Como se usa en el presente documento, los péptidos de alcohol O-acetiltransferasa incluyen péptidos en el número de clasificación de enzimas CE 2.3.1.84, así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de acetil-CoA y un alcohol para formar CoA y un éster acético. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica apreciará que los péptidos de alcohol O-acetiltransferasa también catalizarán otras reacciones, por ejemplo, algunos péptidos de alcohol O-acetiltransferasa aceptarán otros sustratos además de alcoholes grasos o acetil-CoA tioéster, es decir, tales como otros alcoholes y otros acil-CoA tioésteres. Por lo tanto, también se incluyen dichos péptidos de alcohol O-acetiltransferasa no específicos o de especificidad divergente. Las secuencias de péptidos de alcohol O-acetiltransferasa están a disposición del público. En la **figura 10** se proporcionan ejemplos de números de registro del GenBank. En la técnica se conocen bien ensayos para caracterizar la actividad de péptidos de alcohol O-acetiltransferasa particulares. También pueden crearse O-acetiltransferasas y O-aciltransferasas genomodificadas que tengan nuevas actividades y especificidades para el grupo acilo donador o el resto alcohol aceptor. A través de enfoques teóricos y evolutivos bien documentados en la técnica podrían generarse enzimas genomodificadas.

F. De acil-CoA a ésteres grasos (biodiéseles y ceras)

Los hospedadores de producción pueden genomodificarse utilizando péptidos conocidos para producir ésteres de ácidos grasos a partir de acil-CoA y alcoholes. En algunos ejemplos, los alcoholes se proporcionan en los medios de fermentación y en otros ejemplos, el hospedador de producción puede proporcionar el alcohol como se describe en el presente documento. Un experto habitual en la técnica apreciará que, estructuralmente, los ésteres de ácidos grasos tienen un lado A y un lado B. Como se describe en el presente documento, el lado A del éster se usa para describir la cadena de carbono que aporta el alcohol, y el lado B del éster se usa para describir la cadena de carbono que aporta la acil-CoA. Cualquiera de las cadenas puede estar saturada o insaturada, ramificada o no ramificada. El hospedador de producción puede genomodificarse para producir alcoholes grasos o alcoholes de cadena corta. El hospedador de producción también puede genomodificarse para producir moléculas de acil-CoA específicas. Como se usa en este documento, los ésteres de ácidos grasos son ésteres derivados de un acilo graso-tioéster y un alcohol, en donde el lado A y el lado B del éster pueden variar en longitud independientemente. En general, el lado A del éster tiene una longitud de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 carbonos, mientras que el lado B del éster tiene una longitud de 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 o 26 carbonos. El lado A y el lado B pueden ser de cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada.

La producción de ésteres grasos, incluyendo ceras a partir de acil-CoA y alcoholes, puede genomodificarse utilizando polipéptidos conocidos. Como se usa en el presente documento, las ceras son ésteres de ácidos grasos de cadena larga, en donde el lado A y el lado B del éster pueden variar en longitud independientemente. En general, el lado A del éster tiene una longitud de al menos 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 o 26 carbonos. De manera similar, el lado B del éster tiene una longitud de al menos 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 o 26 carbonos. El lado A y el lado B pueden estar mono-, di- y triinsaturados. La producción de ésteres grasos, incluyendo ceras a partir de acil-CoA y alcoholes, puede genomodificarse utilizando polipéptidos conocidos. Un método de preparación de ésteres grasos incluye aumentar la expresión de, o expresar formas más activas de, una o más cera sintasas (CE 2.3.1.75).

Como se usa en el presente documento, las cera sintasas incluyen péptidos en el número de clasificación de enzimas CE 2.3.1.75, así como cualquier otro péptido capaz de catalizar la conversión de un acil-tioéster en ésteres grasos. Adicionalmente, un experto habitual en la técnica apreciará que algunos péptidos de cera sintasa catalizarán también

otras reacciones, por ejemplo, algunos péptidos de cera sintasa aceptarán acil-CoA de cadena corta y alcoholes de cadena corta para producir ésteres grasos. Por lo tanto, también se incluyen dichas cera sintasas no específicas. Las secuencias de péptidos de cera sintasa están a disposición del público. En la **figura 10** se proporcionan ejemplos de números de registro del GenBank. En la patente de Estados Unidos número 7 118 896, que se incorpora en el presente documento por referencia, se proporcionan métodos para identificar la actividad cera sintasa.

En ejemplos particulares, si el producto deseado es un biocombustible a base de éster graso, el microorganismo se modifica para que produzca un éster graso generado a partir de una fuente de energía renovable. Dicho microorganismo incluye una secuencia de ADN exógeno que codifica una éster de cera sintasa que se expresa para conferir a dicho microorganismo la capacidad de sintetizar un éster graso saturado, insaturado o ramificado a partir de una fuente de energía renovable. En algunas realizaciones, las proteínas de síntesis de éster de cera incluyen, aunque sin limitación: ácido graso elongasas, acil-CoA reductasas, aciltransferasas o cera sintasas, acil graso transferasas, diacilglicerol aciltransferasas, acil-coA cera alcohol aciltransferasas, éster de cera sintasa/acil-CoA: diacilglicerol aciltransferasa bifuncional seleccionada de un complejo multienzimático de *Simmondsia chinensis*, *Acinetobacter* sp. cepa ADP1 (anteriormente *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1), *Pseudomonas aeruginosa*, *Fundibacter jadensis*, *Arabidopsis thaliana* o *Alkaligenes eutrophus*. En una realización, las ácido graso elongasas, acil-CoA reductasas o cera sintasas son de un complejo multienzimático de *Alkaligenes eutrophus* y otros organismos que se sabe en la bibliografía que producen cera y ésteres de ácidos grasos.

Las fuentes adicionales de ADN heterólogo que codifica proteínas de síntesis de cera útiles en la producción de éster graso incluyen, aunque sin limitación, *Mortierella alpina* (por ejemplo ATCC 32222), *Cryptococcus curvatus*, (también denominada *Apiotricum curvatum*), *Alcanivorax jadensis* (por ejemplo, T9T =DSM 12718 =ATCC 700854), *Acinetobacter* sp. HO1-N, (por ejemplo ATCC 14987) y *Rhodococcus opacus* (por ejemplo PD630, DSMZ 44193).

Los métodos descritos en este documento permiten la producción de ésteres grasos de longitud variable. En un ejemplo, el producto de éster graso es un producto de éster graso saturado o insaturado que tiene un contenido en átomos de carbono de entre 24 y 46 átomos de carbono. En una realización, el producto de éster graso tiene un contenido en átomos de carbono de entre 24 y 32 átomos de carbono. En otra realización, el producto de éster graso tiene un contenido en carbono de 14 y 20 carbonos. En otra realización, el éster graso es el éster metílico de C18: 1. En otra realización, el éster de ácido graso es el éster etílico de C16:1. En otra realización, el éster graso es el éster metílico de C16: 1. En otra realización, el éster de ácido graso es éster octadecílico de octanol.

Los hospedadores útiles para producir ésteres grasos pueden ser microorganismos eucariotas o procariotas. En algunas realizaciones, dichos hospedadores incluyen, aunque sin limitación, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica*, *E. coli* *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula glutinins*, *Acinobacter sp cepa M-1*, *Candida lipolytica* y otros microorganismos oleaginosos.

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

Opcionalmente, se puede usar un exportador de éster de cera, tal como un miembro de la familia de PTAG, para facilitar la liberación de ceras o ésteres en el entorno extracelular. Un ejemplo de un exportador de éster de cera que puede usarse es la proteína transportadora de ácido graso (cadena larga) CG7400-PA, isoforma A de *Drosophila melanogaster*, en el locus NP_524723.

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

Se sabe que una diversidad de microorganismos produce hidrocarburos, tales como alcanos, olefinas e isoprenoides. Muchos de estos hidrocarburos proceden de la biosíntesis de ácidos grasos. La producción de estos hidrocarburos puede controlarse controlando los genes asociados a la biosíntesis de ácidos grasos en los hospedadores originarios. Por ejemplo, la biosíntesis de hidrocarburos en las algas *Botryococcus braunii* se produce a través de la descarboxilación de aldehídos grasos. Los aldehídos grasos se producen mediante la reducción de acil graso-tioésteres mediante la acil graso-CoA reductasa. Por tanto, la estructura de los alcanos finales puede controlarse genomodificando *B. braunii* para expresar genes específicos, tales como tioesterasas, que controlan la longitud de la cadena de los ácidos grasos que se canalizan hacia la biosíntesis de alcanos. La expresión de las enzimas que dan como resultado la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada en *B. braunii* dará como resultado la producción de alcanos de cadena ramificada. La introducción de genes que afectan a la producción de desaturación de ácidos grasos dará como resultado la producción de olefinas. Otras combinaciones de estos genes pueden proporcionar un control adicional sobre la estructura final de los hidrocarburos producidos. Para producir niveles más altos de los hidrocarburos nativos o genomodificados, los genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos y sus precursores o la degradación a otros productos pueden expresarse, sobreexpresarse o atenuarse. Cada uno de estos enfoques se puede aplicar a la producción de alcanos en *Vibrio furnissii* M1 y sus homólogos funcionales, que produce alcanos a través de una reducción de alcoholes grasos (véase anteriormente en la biosíntesis y genomodificación de la producción de alcoholes grasos). Cada uno de estos enfoques también se puede aplicar a la producción de olefinas producidas por muchas cepas de *Micrococcus leuteus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Jeogalicoccus* sp. (ATCC8456)

y microorganismos relacionados. Estos microorganismos producen olefinas internas de cadena larga que proceden de la condensación directa de precursores de ácidos grasos. Controlar la estructura y el nivel de precursores de ácidos grasos utilizando los métodos descritos en el presente documento dará como resultado la formación de olefinas de diferente longitud de cadena, ramificación y nivel de saturación.

5 Los hidrocarburos también pueden producirse utilizando óxido/reductasas evolucionadas para la reducción de alcoholes primarios. Se sabe que los alcoholes grasos primarios se usan para producir alcanos en microorganismos tales como *Vibrio furnissii* M1 (Myong-Ok, J. Bacteriol., 187:1426-1429, 2005). Una óxido/reductasa dependiente de NAD(P)H es el catalizador responsable. Las oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H sintéticas pueden producirse
10 usando ingeniería genética evolutiva y pueden expresarse en hospedadores de producción para producir derivados de ácidos grasos. Un experto habitual en la técnica apreciará que el procedimiento de "evolucionar" una alcohol reductasa grasa para que tenga la actividad deseada de conoce bien (Kolkman y Stemmer Nat Biotechnol. 19:423-8, 2001, Ness et al., Adv Protein Chem. 55:261-92, 2000, Minshull y Stemmer Curr Opin Chem Biol. 3:284-90, 1999, Huisman y Gray Curr Opin Biotechnol. Ago; 13: 352-8, 2002, y véase la solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0195947). Una biblioteca de oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H se genera mediante métodos estándar, tales como PCR propensa a error, mutagénesis aleatoria específica de sitio, mutagénesis por saturación específica de sitio o mutagénesis específica dirigida al sitio. Adicionalmente, se puede crear una biblioteca a través del "intercambio" se secuencias que codifican oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H que se producen de manera natural. La biblioteca se expresa en un hospedador adecuado, tal como *E. coli*. Después, las colonias individuales que expresan
20 un miembro diferente de la biblioteca de óxido/reductasa, se analizan para determinar su expresión de una óxido/reductasa que puede catalizar la reducción de un alcohol graso. Por ejemplo, cada célula puede analizarse como una bioconversión de célula completa, un extracto celular, una célula permeabilizada o una enzima purificada. Las alcohol graso reductasas se identifican monitorizando la oxidación dependiente de alcohol graso de NAD(P)H por espectrofotometría o fluorometría. La producción de alcanos se monitoriza mediante CG/EM, CCF u otros métodos.
25 Para producir alcanos, alquenos e hidrocarburos ramificados relacionados, se usa óxido/reductasa identificada de esta manera. Esto se realiza o bien *in vitro* o bien *in vivo*. Esto último se realiza expresando el gen de alcohol graso reductasa evolucionada en un organismo que produce alcoholes grasos, tales como los descritos en el presente documento. Los alcoholes grasos actúan como sustratos para la alcohol reductasa que produciría alcanos. También pueden genomodificarse otras oxidorreductasas para catalizar esta reacción, tal como las que usan hidrógeno molecular, glutatión, FADH u otras coenzimas reductoras.
30

II. Genomodificación de la cepa de producción para aumentar la producción de derivados de ácidos grasos

35 Para la producción de derivados de ácidos grasos en una célula hospedadora pueden introducirse de manera estable o transitoria secuencias de ADN heterólogas implicadas en una ruta biosintética usando técnicas bien conocidas en la materia, por ejemplo electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas, conjugación, transducción y similares. Para la transformación estable, una secuencia de ADN puede incluir además un marcador de selección, tal como, resistencia a antibióticos, por ejemplo resistencia a neomicina, tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina, genes que complementan deficiencias auxotróficas, y similares.
40

Diversas realizaciones de esta divulgación utilizan un vector de expresión que incluye una secuencia de ADN heterólogo que codifica una proteína implicada en una ruta metabólica o biosintética. Los vectores de expresión adecuados incluyen, aunque sin limitación, vectores víricos, tales como vectores de baculovirus, vectores de fagos, tales como vectores de bacteriófagos, plásmidos, fagémidos, cósmidos, fósmidos, cromosomas artificiales bacterianos, vectores víricos (por ejemplo, vectores víricos basados en virus variolovacunal, poliovirus, adenovirus, virus adenoasociado, SV40, virus del herpes simple, y similares), cromosomas artificiales basados en P1, plásmidos de levadura, cromosomas artificiales de levadura y cualquier otro vector específico para hospedadores específicos de interés (tales como *E. coli*, *Pseudomonas piscum* y *Saccharomyces cerevisiae*).
45
50

Los vectores de expresión útiles pueden incluir uno o más genes marcadores de selección para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células hospedadoras transformadas. El gen marcador de selección codifica una proteína que es necesaria para la supervivencia o el crecimiento de células hospedadoras transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Las células hospedadoras no transformadas con el vector que contiene el gen marcador de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que
55 (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa de bacilos. En realizaciones alternativas, el gen marcador de selección es uno que codifica la dihidrofolato reductasa o confiere resistencia a neomicina (para su uso en cultivo de células eucariotas), o uno que confiere resistencia a tetraciclina o ampicilina (para su uso en una célula hospedadora procariota, tal como *E. coli*).
60

La secuencia de ADN que codifica el producto génico de la ruta biosintética en el vector de expresión está unida operativamente a una secuencia de control de la expresión apropiada, promotores, potenciadores y similares) para dirigir la síntesis del producto génico codificado. Dichos promotores pueden proceder de fuentes microbianas o víricas, incluyendo CMV y SV40. Dependiendo del sistema de hospedador/vector utilizado, en el vector de expresión pueden
65

usarse cualquiera de varios elementos de control de la transcripción y traducción adecuados, incluidos los promotores constitutivos e inducibles, elementos potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, *etc.* (véase, por ejemplo, Bitter et al., *Methods in Enzymology*, 153:516-544, 1987).

- 5 Los promotores adecuados para su uso en células hospedadoras procariotas incluyen, aunque sin limitación, promotores capaces de reconocer las polimerasas T4, T3, Sp6 y T7, los promotores P_R y P_L del bacteriófago lambda, los promotores *trp*, *recA*, de choque térmico y *lacZ* de *E. coli*, los promotores de alfa-amilasa y específicos de sigma de *B. subtilis*, los promotores de los bacteriófagos de *Bacillus*, los promotores de *Streptomyces*, el promotor int del bacteriófago lambda, el promotor *bla* del gen de beta-lactamasa de pBR322 y el promotor CAT del gen de cloranfenicol acetil transferasa. En Glick, J. *Ind. Microbiol.* 1, 277, 1987; Watson et al., *MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE* 4^a ed., Benjamin Cummins (1987); y Sambrook et al., citados anteriormente, se revisan promotores de procariotas.

- 15 Los ejemplos no limitativos de promotores eucariotas adecuados para su uso dentro de un hospedador eucariota son de origen vírico e incluyen el promotor del gen de la metalotioneína I de ratón (Hamer et al., *J. Mol. Appl. Gen.* 1:273, 1982); el promotor TK del virus del herpes (McKnight, *Cell* 31: 355, 1982); el promotor temprano de SV40 (Benoist et al., *Nature (Londres)* 290: 304, 1981); el promotor del virus del sarcoma de Rous; el promotor de citomegalovirus (Foecking et al., *Gene* 45: 101, 1980); el promotor del gen *gal4* de levadura (Johnston, et al., *PNAS (EE. UU.)* 79: 6971, 1982; Silver, et al., *PNAS (USA)* 81:5951, 1984); y el promotor de IgG (Orlandi et al., *PNAS (USA)* 86:3833, 1989).

- 20 La célula hospedadora microbiana puede modificarse genéticamente con una secuencia de ADN heterólogo que codifica un producto génico de la ruta biosintética que está unida operativamente a un promotor inducible. En la técnica se conocen bien promotores inducibles. Los promotores inducibles adecuados incluyen, aunque sin limitación, promotores que se ven afectados por proteínas, metabolitos o productos químicos. Estos incluyen: un promotor del virus de la leucemia bovina, un promotor de metalotioneína, un promotor de MMTV inducible por dexametasona, un promotor SV40, un promotor de MRP polIII, un promotor de CMV inducible por tetraciclina (tal como el promotor de CMV temprano inmediato humano) así como los de los operones *trp* y *lac*.

- 30 En algunos ejemplos, una célula hospedadora modificada genéticamente se modifica genéticamente con una secuencia de ADN heterólogo que codifica un producto génico de la ruta biosintética que está unida operativamente a un promotor constitutivo. En la técnica se conocen promotores constitutivos adecuados e incluyen, un promotor tardío principal de adenovirus constitutivo, un promotor de MPSV constitutivo y un promotor de CMV constitutivo.

- 35 En algunos ejemplos, una célula hospedadora modificada es una que está modificada genéticamente con una secuencia de ADN exógeno que codifica una proteína individual implicada en una ruta de biosíntesis. En otras realizaciones, una célula hospedadora modificada es una que está modificada genéticamente con secuencias de ADN exógeno que codifican dos o más proteínas implicadas en una ruta de biosíntesis, por ejemplo, la primera y segunda enzimas en una ruta biosintética.

- 40 Cuando la célula hospedadora se modifica genéticamente para expresar dos o más proteínas implicadas en una ruta biosintética, cada una de esas secuencias de ADN puede estar contenida en un vector de expresión individual o en vectores de expresión separados. Cuando esas secuencias de ADN están contenidas en un vector de expresión individual, en algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos estarán unidas operativamente a un elemento de control común (por ejemplo, un promotor), por ejemplo, el elemento de control común controla la expresión de todas las secuencias de ADN que codifican proteínas de la ruta biosintética en el vector de expresión individual.

- 50 Cuando una célula hospedadora modificada se modifica genéticamente con secuencias de ADN heterólogo que codifican dos o más proteínas implicadas en una ruta de biosíntesis, una de las secuencias de ADN puede estar unida operativamente a un promotor inducible, y una o más de las secuencias de ADN pueden estar unidas operativamente a un promotor constitutivo.

- 55 En algunas realizaciones, la concentración intracelular (por ejemplo, la concentración del producto intermedio en la célula hospedadora modificada genéticamente) del producto intermedio de la ruta biosintética puede aumentarse para intensificar adicionalmente el rendimiento del producto final. La concentración intracelular del producto intermedio puede aumentarse de varias maneras, incluyendo, pero sin limitación, aumentar la concentración en el medio de cultivo de un sustrato para una ruta biosintética; aumentar la actividad catalítica de una enzima que es activa en la ruta biosintética; aumentar la cantidad intracelular de un sustrato (por ejemplo, un sustrato primario) para una enzima que es activa en la ruta biosintética; y similares.

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

65

III. Características de la cadena de carbono

Usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, puede producirse una gama de productos. Estos productos incluyen hidrocarburos, alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos y ceras. Algunos de estos productos son útiles como biocombustibles y productos químicos especializados. Estos productos pueden diseñarse y producirse en microorganismos. Los productos pueden producirse de manera que contengan puntos de ramificación, niveles de saturación y longitud de cadena de carbono, por tanto, haciendo que estos productos sean materiales de partida deseables para su uso en muchas aplicaciones (en la **figura 10** se proporciona una descripción de las diversas enzimas que pueden usarse solas o en combinación para preparar diversos derivados de ácidos grasos).

En otros ejemplos, la expresión de genes de FAS exógenos que se originan de diferentes especies o variantes genomodificadas, puede introducirse en la célula hospedadora para dar como resultado la biosíntesis de metabolitos de ácidos grasos estructuralmente diferentes (en longitud, ramificación, grado de insaturación, etc.) a los del hospedador nativo. Estos productos génicos heterólogos también pueden elegirse o genomodificarse para que no se vean afectados por los mecanismos reguladores complejos naturales en la célula hospedadora y, por lo tanto, funcionan de una manera más controlable para la producción del producto comercial deseado. Por ejemplo, las enzimas FAS de *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces spp*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Corynebacteria*, *Brevibacteria*, *Mycobacteria*, levaduras oleaginosas, y similares, pueden expresarse en el hospedador de producción.

Un experto habitual en la técnica apreciará que cuando un hospedador de producción se genomodifica para que produzca un ácido graso a partir de la ruta biosintética de ácidos grasos que contiene un nivel específico de insaturación, ramificación, o longitud de cadena de carbono, el ácido graso genomodificado resultante puede usarse en la producción de derivados de ácidos grasos. Consecuentemente, los derivados de ácidos grasos generados a partir del hospedador de producción pueden presentar características del ácido graso genomodificado. Por ejemplo, un hospedador de producción puede genomodificarse para preparar ácidos grasos de cadena corta, ramificados y después, usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento que se refieren a la producción de alcohol graso (es decir, que incluyen enzimas formadoras de alcohol tales como FAR), el hospedador de producción produce alcoholes grasos de cadena corta, ramificados. De manera similar, puede producirse un hidrocarburo genomodificando un hospedador de producción para producir un ácido graso que tenga un nivel definido de ramificación, insaturación y/o longitud de cadena de carbono, produciendo así una población homogénea de hidrocarburos. Por otra parte, cuando se desea un alcohol, éster de ácido graso o hidrocarburo insaturado, la ruta biosintética de ácidos grasos puede genomodificarse para producir niveles bajos de ácidos grasos saturados y para reducir la producción de producto saturado puede expresarse una desaturasa adicional.

35 **A. Saturación**

Los hospedadores de producción pueden genomodificarse para que produzcan ácidos grasos insaturados genomodificando el hospedador de producción para sobreexpresar *fabB*, o cultivando el hospedador de producción a bajas temperaturas (por ejemplo, inferiores a 37 °C). FabB tiene preferencia a *cis*- δ^3 decenoil-ACP y da como resultado la producción de ácidos grasos insaturados en *E. coli*. La sobreexpresión de FabB dio como resultado la producción de un porcentaje significativo de ácidos grasos insaturados (de Mendoza et al., J. Biol. Chem., 258:2098-101, 1983). Estos ácidos grasos insaturados pueden usarse como productos intermedios en hospedadores de producción que están genomodificados para producir derivados de ácidos grasos, tales como alcoholes grasos, ésteres, ceras, olefinas, alcanos y similares. Un experto habitual en la técnica apreciará que atenuando *fabA*, o sobreexpresando *FabB* y expresando tioesterasas específicas (descritas a continuación), pueden producirse derivados de ácidos grasos insaturados que tienen una longitud de cadena de carbono deseada. De manera alternativa, el represor de la biosíntesis de ácidos grasos, FabR (registro de Genbank NP_418398), puede delecionarse, lo que también dará como resultado una mayor producción de ácidos grasos insaturados en *E. coli* (Zhang et al., J. Biol. Chem. 277: págs. 15558, 2002.). Se puede realizar un aumento adicional de ácidos grasos insaturados mediante la sobreexpresión de FabM (trans-2, cis-3-decenoil-ACP isomerasa, registro de Genbank (DAA05501) y la expresión controlada de FabK (trans-2-enoil-ACP reductasa II, registro de Genbank (NP_357969) de *Streptococcus pneumoniae* (Marrakchi et al., J. Biol. Chem. 277: 44809, 2002), mientras que se deleciona Fab I de *E. coli* ((trans-2-enoil-ACP reductasa, registro de Genbank (NP_415804). Adicionalmente, para aumentar el porcentaje de ésteres de ácidos grasos insaturados, el microorganismo también puede tener sobreexpresado *fabB* (que codifica β -cetoacil-ACP sintasa I, Registros: BAA16180, CE: 2.3.1.41), *Sfa* (que codifica un supresor de *fabA*, Registro: AAC44390) y *gnsA* y *gnsB* (ambos codifican supresores mutantes nulos de *secG*, también conocidos como proteínas de choque frío, Registro: ABD18647.1, AAC74076.1).

En algunos ejemplos, el gen de *fabF* endógeno puede estar atenuado, aumentando así el porcentaje de palmitoleato (C16: 1) producido.

B. Ramificación que incluye restos cíclicos

Utilizando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento pueden producirse derivados de ácidos grasos que contienen puntos de ramificación, restos cíclicos, y combinaciones de los mismos.

Microorganismos que producen de manera natural ácidos grasos lineales (AGI) pueden genomodificarse para producir ácidos grasos de cadena ramificada (AGr) expresando una o más secuencias de ácido nucleico exógeno. Por ejemplo, *E. coli* produce de manera natural ácidos grasos lineales (AGI). Para genomodificar *E. coli* para producir AGr, pueden introducirse y expresarse varios genes que proporcionan precursores ramificados (operón *bkd*) y permiten el inicio de la biosíntesis de ácidos grasos a partir de precursores ramificados (*fabH*). Adicionalmente, el organismo puede expresar genes para el alargamiento de los AGr (por ejemplo, ACP, FabF) y/o deleciónar los genes de *E. coli* correspondientes que normalmente conducen a AGI y que competirían con los genes introducidos (por ejemplo, FabH, FabF).

Los acil-CoA, 2-metil-butiril-CoA, isovaleril-CoA e isobutil-CoA ramificados, son los precursores de AGr. En la mayoría de los microorganismos que contienen AGr, estos se sintetizan en dos etapas (descritas en detalle a continuación) a partir de aminoácidos ramificados (isoleucina, leucina y valina) (Kadena, Microbiol. Rev. 55: págs. 288, 1991). Para genomodificar un microorganismo para producir AGr, o para sobreproducir AGr, la expresión o sobreexpresión de una o más de las enzimas en estas dos etapas puede genomodificarse. Por ejemplo, en algunos casos, el hospedador de producción puede tener una enzima endógena que puede llevar a cabo una etapa y, por lo tanto, solo es necesario expresar de manera recombinante las enzimas implicadas en la segunda etapa.

La primera etapa en la formación de ácidos grasos ramificados, es la producción de los α -cetoácidos correspondientes mediante un aminoácido aminotransferasa de cadena ramificada. *E. coli* tiene dicha enzima, *IlvE* (EC 2.6.1.42; registro de Genbank (YP_026247)). En algunos ejemplos, puede no expresarse un aminoácido aminotransferasa heteróloga de cadena ramificada. Sin embargo, *IlvE* de *E. coli* o cualquier otro aminoácido aminotransferasa de cadena ramificada, por ejemplo, *ilvE* de *Lactococcus lactis* (registro de Genbank AAF34406), *ilvE* de *Pseudomonas putida* (registro de Genbank NP_745648) o *ilvE* de *Streptomyces coelicolor* (Registro de Genbank NP_629657) pueden sobreexpresarse en un microorganismo hospedador, si la reacción de la aminotransferasa resulta ser limitante de la velocidad en la biosíntesis de AGr en el organismo hospedador elegido para la producción de derivados de ácidos grasos.

La segunda etapa, la descarboxilación oxidativa de los α -cetoácidos para dar la correspondiente acil-CoA de cadena ramificada, está catalizada por complejos de α -cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada (*bkd*; CE 1.2.4.4.) (Denoya et al. J. Bacteriol. 177: págs. 3504, 1995), que constan de las subunidades E1 α / β (descarboxilasa), E2 (dihidrolipoil transacilasa) y E3 (dihidrolipoil deshidrogenasa) y que son similares a los complejos de piruvato y α -cetoglutarato deshidrogenasa. En la **Tabla 2** se muestran posibles genes *bkd* de varios microorganismos, que pueden expresarse en un hospedador de producción para proporcionar precursores de acil-CoA de cadena ramificada. Básicamente, todo microorganismo que posea AGr y/o que se cultive en aminoácidos de cadena ramificada, puede usarse como fuente para aislar genes *bkd* para la expresión en hospedadores de producción tales como, por ejemplo, *E. coli*. Asimismo, *E. coli* tiene el componente E3 (como parte de su complejo de piruvato deshidrogenasa; *lpd*, CE 1.8.1.4, registro de Genbank (NP_414658), por lo tanto, puede ser suficiente expresar solo los genes *bkd* de E1 α / β y E2.

Tabla 2

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

En otro ejemplo, puede producirse isobutil-CoA en un hospedador de producción, por ejemplo en *E. coli*, a través de la coexpresión de una crotonil-CoA reductasa (*Ccr*, EC 1.1.1.9) y una isobutil-CoA mutasa (subunidad grande *IcmA*, CE 5.4.99.2; subunidad pequeña *IcmB*, CE 5.4.99.13) (Han y Reynolds J. Bacteriol. 179: págs. 5157, 1997). La crotonil-CoA es un producto intermedio de la biosíntesis de ácidos grasos en *E. coli* y otros microorganismos. En la **tabla 3** se proporcionan ejemplos de genes *ccr* e *icm* de microorganismos seleccionados.

Tabla 3

Genes <i>ccr</i> e <i>icm</i> de microorganismos seleccionados		
Organismo	Gen	N.º de registro de Genbank
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>ccr</i>	NP_630556
	<i>icmA</i>	NP_629554
	<i>icmB</i>	NP_630904
<i>Streptomyces cinnamonensis</i>	<i>ccr</i>	AAD53915
	<i>icmA</i>	AAC08713
	<i>icmB</i>	AJ246005

Además de la expresión de los genes *bkd* (véase anteriormente), el inicio de la biosíntesis de AGr utiliza β -cetoacil-proteína transportadora de acilo sintasa III (FabH, EC 2.3.1.41) con especificidad por las acil CoA de cadena ramificada (Li et al. J. Bacteriol. 187: págs. 3795, 2005). En la tabla 4 se enumeran ejemplos de dichas FabH. En un hospedador de producción pueden expresarse genes de FabH que están implicados en la biosíntesis de ácidos grasos de cualquier microorganismo que contenga AGr. Las enzimas Bkd y FabH de hospedadores de producción que no producen AGr de forma natural, no pueden sustentar la producción de AGr y, por lo tanto, Bkd y FabH pueden expresarse de manera recombinante. De manera similar, el nivel endógeno de producción de Bkd y FabH puede no ser suficiente para producir AGr, por lo tanto, pueden sobreexpresarse. Adicionalmente, pueden expresarse otros componentes de la maquinaria de biosíntesis de ácidos grasos, tales como proteínas transportadoras de acilo (ACP) y candidatos a β -cetoacil-proteína transportadora de acilo sintasa II son proteínas transportadoras de acilo (ACP) y β -cetoacil-proteína transportadora de acilo sintasa II (*fabF*, CE 2.3.1.41) (en **Tabla 4** se enumeran los candidatos). Además de expresar estos genes, algunos genes en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos endógenos pueden atenuarse en el hospedador de producción. Por ejemplo, en *E. coli* los candidatos que es más probable que interfieran con la biosíntesis de AGr, son los genes *fabH* (n.º de registro de Genbank NP_415609) y/o *fabF* (n.º de registro de Genbank NP_415613).

Como se ha mencionado anteriormente, a través de la combinación de genes de expresión que dan soporte a la síntesis de AGr y a la síntesis de alcohol, se pueden producir alcoholes de cadena ramificada. Por ejemplo, cuando una alcohol reductasa tal como *Acr1* de *Acinetobacter baylyi* ADP1 se coexpresa con un operón *bkd*, *E. coli* puede sintetizar isopentanol, isobutanol o 2-metil butanol. De manera similar, cuando *Acr1* se coexpresa con genes *ccr/icm*, *E. coli* puede sintetizar isobutanol.

Para convertir un hospedador de producción, tal como *E. coli*, en un organismo capaz de sintetizar ácidos grasos cíclicos ω (AG cíclicos), es necesario introducir y expresar varios genes que proporcionen el precursor cíclico ciclohexilcarbonil-CoA (Cropp et al. Nature Biotech. 18: págs. 980, 2000). Los genes enumerados en **Tabla 4** (*fabH*, *ACP* y *fabF*) entonces pueden expresarse entonces para permitir el inicio y el alargamiento de ácidos grasos cíclicos ω . De manera alternativa, los genes homólogos pueden aislarse de microorganismos que producen AG cíclicos y expresarse en *E. coli*.

Tabla 4

Genes <i>FabH</i> , <i>ACP</i> y <i>fabF</i> de microorganismos seleccionados con AGr		
Organismo	Gen	N.º de registro de Genbank
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>fabH1</i>	NP_626634
	<i>ACP</i>	NP_626635
	<i>fabF</i>	NP_626636
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>fabH3</i>	NP_823466
	<i>fabC3 (ACP)</i>	NP_823467
	<i>fabF</i>	NP_823468
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>fabH_A</i>	NP_389015
	<i>fabH_B</i>	NP_388898
	<i>ACP</i>	NP_389474
	<i>fabF</i>	NP_389016
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	SmalDRAFT_0818 (<i>FabH</i>)	ZP_01643059
	SmalDRAFT_0821 (<i>ACP</i>)	ZP_01643063
	SmalDRAFT_0822 (<i>FabF</i>)	ZP_01643064
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>FabH</i>	YP_123672
	<i>ACP</i>	YP_123675
	<i>fabF</i>	YP_123676

La expresión de los siguientes genes es suficiente para proporcionar ciclohexilcarbonil-CoA en *E. coli*: *ansJ*, *ansK*, *ansL*, *chcA* y *ansM* del grupo de genes de ansatrienina de *Streptomyces collinus* (Chen et al., Eur. J. Biochem. 261: págs. 1999, 1999) o *plmJ*, *plmK*, *plmL*, *chcA* y *plmM* del grupo de genes de foslactomicina B de *Streptomyces* sp. HK803 (Palaniappan et al., J. Biol. Chem. 278: págs. 35552, 2003) junto con el gen *chcB* (Patton et al. Biochem., 39:

págs. 7595, 2000) de *S. collinus*, *S. avermitilis* o *S. coelicolor* (véase la **tabla 5** para los números de registro de Genbank).

Tabla 5

Genes para la síntesis de ciclohexilcarbonil-CoA		
Organismo	Gen	N.º de registro de Genbank
<i>Streptomyces collinus</i>	<i>ansJK</i>	U72144*
	<i>ansL</i>	
	<i>chcA</i>	
	<i>ansL</i>	
	<i>chcB</i>	AF268489
<i>Streptomyces</i> sp. HK803	<i>pmlJK</i>	AAQ84158
	<i>pmlL</i>	AAQ84159
	<i>chcA</i>	AAQ84160
	<i>pmlM</i>	AAQ84161
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>chcB/caiD</i>	NP_629292
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>chcB/caiD</i>	NP_629292
Solo <i>chcA</i> se anota en la entrada de Genbank U72144, <i>ansJKLM</i> son según Chen et al. (EUR. J. Biochem. 261: págs. 1999 (1999))		

5

Los genes enumerados en la **Tabla 4** (*fabH*, *ACP* y *fabF*) son suficientes para permitir el inicio y el alargamiento de ácidos grasos cíclicos ω , porque pueden tener una amplia especificidad de sustrato. En el caso de que la coexpresión de cualquiera de estos genes con los genes *ansJKLM/chcAB* o *pmlJKLM/chcAB* de la Tabla 5 no produzca AG cíclicos, pueden aislarse homólogos de *fabH*, *ACP* y/o *fabF* de microorganismos que producen AG cíclicos (por ejemplo, utilizando cebadores de PCR degenerados o sondas de ADN heterólogo) y coexpresarse. La Tabla 6 enumera microorganismos seleccionados que contienen ácidos grasos cíclicos ω .

10

Tabla 6

Ejemplos de microorganismos que contienen ácidos grasos cíclicos ω	
Organismo	Referencia
<i>Curtobacterium pusillum</i>	ATCC19096
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	ATCC49025
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	ATCC27009
<i>Alicyclobacillus cycloheptanicum</i> *	Moore, J. Org. Chem. 62: págs. 2173, 1997.
*utiliza cicloheptilcarbonil-CoA y no ciclohexilcarbonil-CoA como precursor de la biosíntesis de AG cíclicos	

15 C. Características de ésteres

Un experto habitual en la técnica apreciará que un éster incluye un lado A y un lado B. Como se describe en el presente documento, al lado B contribuye un ácido graso producido a partir de la síntesis *de novo* en el organismo hospedador. En algunos casos en los que el hospedador se genomodifica adicionalmente para producir alcoholes, incluyendo alcoholes grasos, el lado A también es producido por el organismo hospedador. En otros ejemplos más, el lado A puede proporcionarse en el medio. Como se describe en el presente documento, seleccionando los genes de tioesterasa deseados puede diseñarse el lado B, y cuando están produciéndose alcoholes grasos el lado A, para que tengan determinadas características de la cadena de carbono. Estas características incluyen puntos de insaturación, ramificación y longitudes de la cadena de carbono deseadas. Más adelante, en el Ejemplo 6, se proporcionan ejemplos de métodos de fabricación de ésteres de ácidos grasos de cadena larga, en los que el hospedador de producción produce los lados A y B. De manera similar, en el ejemplo 5 se proporcionan métodos de preparación de ésteres de ácidos grasos de cadena media. Cuando el hospedador de producción contribuye tanto al lado A como al lado B y se producen usando productos intermedios de la ruta biosintética de ácidos grasos, tendrán características de la cadena de carbono similares. Por ejemplo, al menos el 50 %, 60 %, 70 % u 80 % de los ésteres de ácidos grasos producidos tendrán lados A y lados B que varían en 6, 4 o 2 carbonos de longitud. El lado A y el lado B también presentarán niveles de ramificación y saturación similares.

20

25

30

Además de producir alcoholes grasos para contribuir al lado A, el hospedador puede producir otros alcoholes de cadena corta tales como etanol, propanol, isopropanol, isobutanol y butanol para su incorporación en el lado A usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, el organismo hospedador puede producir butanol. Para crear células productoras de butanol, la cepa LS9001 (descrita en el Ejemplo 1, a continuación) puede genomodificarse adicionalmente para que exprese *atoB* (acetil-CoA acetiltransferasa) de *Escherichia coli* K12, β -hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa de *Butyrivibrio fibrisolvens*, crotonasa de *Clostridium beijerinckii*, butiril CoA deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii*, aldehído deshidrogenasa (ALDH) CoA acilante de *Cladosporium fulvum* y *adhE* que codifica una aldehído-alcohol deshidrogenasa de *Clostridium acetobutylicum* en el vector de expresión pBAD24 bajo el sistema promotor de *ppBCDE*. De manera similar, utilizando los métodos enseñados por Kalscheuer et al., Microbiology

35

40

152:2529-2536, 2006, puede producirse etanol en un hospedador.

IV. Fermentación

5 La producción y el aislamiento de derivados de ácidos grasos puede potenciarse empleando técnicas de fermentación específicas. Un método para maximizar la producción al mismo tiempo que se reducen los costes es aumentar el porcentaje de la fuente de carbono que se convierte en productos de hidrocarburos. Durante los ciclos de vida celulares normales, el carbono se usa en funciones celulares, incluida la producción de lípidos, sacáridos, proteínas, ácidos orgánicos y ácidos nucleicos. La reducción de la cantidad de carbono necesaria para las actividades relacionadas con el crecimiento puede aumentar la eficacia de la conversión de la fuente de carbono en producción. Esto se puede lograr haciendo que los microorganismos crezcan primero a una densidad deseada, tal como una densidad alcanzada en el pico de la fase logarítmica de crecimiento. En dicho punto, los genes de punto de control de la replicación pueden aprovecharse para detener el crecimiento de las células. De manera específica, pueden usarse mecanismos de percepción de cuórum (revisado en Camilli y Bassler Science 311:1113,2006; Venturi FEMS Microbio Rev 30: 274-291, 2006 y Reading y Sperandio FEMS Microbiol Lett 254: 1-11, 2006) para activar genes tales como p53, p21, u otros genes de punto de control. Como genes que pueden activarse para detener la replicación y el crecimiento celular en *E. coli* se incluyen genes de *umuDC*, cuya sobreexpresión detiene la progresión desde la fase estacionaria hasta el crecimiento exponencial (Murli et al., J. of Bact. 182:1127, 2000). *UmuC* es una ADN polimerasa que puede llevar a cabo la síntesis translesión sobre lesiones no codificantes, la base mecánica de la mayor parte de la mutagénesis química y por UV. Los productos génicos de *umuDC* se utilizan para el procedimiento de síntesis translesión y también sirven como punto de control del daño en el ADN. Los productos génicos de *UmuDC* incluyen *UmuC*, *UmuD*, *umuD'*, *UmuD'2C*, *UmuD'2* y *UmuD2*. Simultáneamente, los genes que producen producto se activarían, minimizando así la necesidad de utilizar rutas de replicación y mantenimiento mientras que está preparándose el derivado de ácido graso.

25 El porcentaje de carbonos de entrada convertidos en productos de hidrocarburos es un factor determinante de costes. Cuanto más eficaz (es decir, cuanto mayor sea el porcentaje), menos costoso es el procedimiento. Para fuentes de carbono que contienen oxígeno (es decir, glucosa y otras fuentes basadas en hidratos de carbono), el oxígeno debe liberarse en forma de dióxido de carbono. Por cada 2 átomos de oxígeno liberados, se libera también un átomo de carbono lo que conduce a una eficacia metabólica teórica máxima de -34 % (p/p) (para productos derivados de ácidos grasos). Sin embargo, esta cifra cambia para otros productos de hidrocarburos y fuentes de carbono. Las eficacias típicas en la bibliografía son de ~<5 %. Los microorganismos genomodificados que producen productos de hidrocarburos pueden tener una eficacia superior al 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 %. En un ejemplo, los microorganismos presentarán una eficacia de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 25 %. En otros ejemplos, dichos microorganismos presentarán una eficacia de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 30 %, y en otros ejemplos, dichos microorganismos presentarán una eficacia >30 %.

En algunos ejemplos en los que el producto final se libera de la célula, puede emplearse un procedimiento continuo. En este enfoque, puede ensamblarse un reactor con organismos que producen derivados de ácidos grasos de múltiples modos. En un ejemplo, se retira una parte de los medios y se deja reposar. Los derivados de ácidos grasos se separan de la capa acuosa, que a su vez, se devolverá a la cámara de fermentación.

En un ejemplo, la cámara de fermentación contendrá una fermentación que está sometida a una reducción continua. En este caso, se crearía un entorno reductor estable. El equilibrio de electrones se mantendría mediante la liberación de dióxido de carbono (en forma gaseosa). Los esfuerzos para aumentar el equilibrio de NAD/H y NADP/H también pueden facilitar la estabilización del equilibrio de electrones.

La disponibilidad de NADPH intracelular también puede potenciarse genomodificando el hospedador de producción para que exprese una NADH:NADPH transhidrogenasa. La expresión de una o más NADH:NADPH transhidrogenasas convierte el NADH producido en la glicólisis en NADPH, lo que potencia la producción de derivados de ácidos grasos.

En este documento se desvela un sistema para producir y exportar de manera continua derivados de ácidos grasos fuera de microorganismos hospedadores recombinantes por medio de una proteína transportadora. Muchas proteínas transportadoras y de flujo de salida sirven para excretar una gran variedad de compuestos y estar evolucionadas para ser selectivas para un tipo particular de derivados de ácidos grasos. Por tanto, en algunas realizaciones, el microorganismo hospedador recombinante expresará funcionalmente una secuencia de ADN exógeno que codifica un transportador ABC (por las siglas del inglés *ATP-binding cassette*), de manera que el microorganismo exporta el derivado de ácido graso al medio de cultivo. En un ejemplo, el transportador ABC es un transportador ABC de *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Alkaligenes eutrophus* o *Rhodococcus erythropolis* (locus AAN73268). En otro ejemplo, el transportador ABC es un transportador ABC seleccionado de CER5 (locus At1g51500 o AY734542), *AtMRP5*, *AmiS2* y *AtPGP1*. En algunos ejemplos, el transportador ABC es CER5. En otro ejemplo más, el gen CER5 es de *Arabidopsis* (locus At1g51500, AY734542, At3g21090 y At1g51460).

Por ejemplo, la proteína transportadora, también puede ser una proteína de flujo de salida seleccionada de: *AcrAB*, *ToIC* y *AcrEF* de *E. coli*, o *tll1618*, *tll1619* y *tll0139* de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1.

Además, la proteína transportadora puede ser, por ejemplo, una proteína transportadora de ácidos grasos (PTAG)

seleccionada de *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Mycobacterium tuberculosis* o *Saccharomyces cerevisiae* o cualquiera de las PTAG de mamíferos. Adicionalmente, las PTAG pueden volver a sintetizarse con las regiones membranosas invertidas para invertir la dirección del flujo del sustrato. De manera específica, las secuencias de aminoácidos que componen los dominios hidrófilos (o dominios de membrana) de la proteína, podrían invertirse manteniendo al mismo tiempo los mismos codones para cada aminoácido particular. La identificación de estas regiones se conoce bien en la técnica.

También pueden seleccionarse hospedadores de producción por su capacidad endógena para liberar derivados de ácidos grasos. La eficacia de producción de productos y liberación al caldo de fermentación puede expresarse como una relación de producto intracelular con respecto a producto extracelular. En algunos ejemplos, la relación puede ser de 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 o 1:5.

El hospedador de producción puede genomodificarse adicionalmente para expresar celulosomas recombinantes, tales como los descritos en la solicitud PCT número PCT/US2007/003736, lo que permitirá que el hospedador de producción use material celulósico como fuente de carbono. Por ejemplo, el hospedador de producción puede genomodificarse adicionalmente para expresar invertasas (CE 3.2.1.26) de modo que pueda usarse sacarosa como fuente de carbono.

De manera similar, el hospedador de producción puede genomodificarse utilizando las enseñanzas descritas en las patentes de Estados Unidos números 5 000 000, 5 028 539, 5 424 202, 5 482 846 y 5 602 030 de Ingram et al. de modo que el hospedador de producción pueda asimilar carbono de manera eficaz y usar materiales celulósicos como fuentes de carbono.

IV. Procesamiento posproducción

Los derivados de ácidos grasos producidos durante la fermentación pueden separarse de los medios de fermentación. Se puede usar cualquier técnica conocida para separar derivados de ácidos grasos de medios acuosos. Un ejemplo de procedimiento de separación proporcionado en el presente documento es un procedimiento de separación de dos fases (bifásico). Este procedimiento implica fermentar los hospedadores de producción genomodificados en condiciones suficientes para producir un derivado de ácido graso, permitir que el derivado se recoja en una fase orgánica y separar la fase orgánica del caldo de fermentación acuoso. Este método se puede poner en practicar en un entorno de fermentación tanto discontinua como continua.

La separación bifásica utiliza la inmiscibilidad relativa de los derivados de ácidos grasos para facilitar la separación. Inmiscible se refiere a la relativa incapacidad de un compuesto para disolverse en agua y se define por el coeficiente de reparto de los compuestos. El coeficiente de reparto, P, se define como la concentración en equilibrio de compuesto en una fase orgánica (en un sistema bifásico, la fase orgánica suele ser la fase formada por el derivado de ácido graso durante el procedimiento de producción, sin embargo, en algunos ejemplos, se puede proporcionar una fase orgánica (tal como una capa de octano para facilitar la separación del producto) dividida entre la concentración en equilibrio en una fase acuosa (es decir, caldo de fermentación). Cuando se describe un sistema de dos fases, el P generalmente se indica en términos de logP. Un compuesto con un logP de 10 tendría un reparto de 10:1 en la fase orgánica, mientras que un compuesto de logP de 0,1 tendría un reparto de 10:1 en la fase acuosa. Un experto habitual en la técnica apreciará que eligiendo un caldo de fermentación y la fase orgánica de manera que el derivado de ácido graso que se está produciendo tenga un valor de logP alto, el derivado de ácido graso se separará en la fase orgánica, incluso a concentraciones muy bajas en el recipiente de fermentación.

Los derivados de ácidos grasos producidos mediante los métodos descritos en el presente documento serán relativamente inmiscibles en el caldo de fermentación, así como en el citoplasma. Por lo tanto, el derivado de ácido graso se recogerá en una fase orgánica intracelular o extracelularmente. La recogida de los productos en una fase orgánica reducirá el impacto del derivado de ácido graso sobre la función celular y permitirá que el hospedador de producción produzca más producto. Dicho de otra manera, la concentración del derivado de ácido graso no tendrá un impacto tan significativo sobre la célula hospedadora.

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

V. Composiciones de combustible

Los derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento pueden usarse como combustible. Un experto

habitual en la técnica apreciará que, dependiendo del fin previsto del combustible, se pueden producir y usar diferentes derivados de ácidos grasos. Por ejemplo, para combustible de automóviles destinado a su uso en climas fríos, puede ser deseable un derivado de ácido graso ramificado y, utilizando las enseñanzas proporcionadas en este documento, pueden prepararse hidrocarburos, ésteres de ácidos grasos y alcoholes ramificados. Usando los métodos descritos en el presente documento, pueden producirse combustibles que comprenden derivados de ácidos grasos relativamente homogéneos que tienen calidades de combustible deseadas. Dichos combustibles pueden caracterizarse por la huella de carbono, por su falta de impurezas en comparación con los combustibles derivados del petróleo o biodiésel derivado de triglicéridos y, por otra parte, los combustibles a base de derivados de ácidos grasos pueden combinarse con otros combustibles o aditivos de combustibles para producir combustibles que tengan propiedades deseadas.

A. Huella de carbono

Los derivados de ácidos grasos producidos de manera biológica representan una nueva materia prima para combustibles, tales como alcoholes, diésel y gasolina. Algunos biocombustibles preparados usando derivados de ácidos grasos no se han producido a partir de fuentes renovables y, como tales, son nuevas composiciones de materia. Estos nuevos combustibles se pueden distinguir de los combustibles derivados de carbono petroquímico basándose en la huella isotópica del carbono doble. Adicionalmente, la fuente específica de carbono de origen biológico (por ejemplo, glucosa frente a glicerol) puede determinarse mediante la huella isotópica del carbono doble (véase, la patente de Estados Unidos número 7 169 588, incorporada en el presente documento por referencia).

Este método distingue útilmente materiales químicamente idénticos y distribuye el carbono en los productos por la fuente (y posiblemente el año) de crecimiento del componente biosférico (vegetal). Los isótopos, ^{14}C y ^{13}C , aportan información complementaria a este problema. El isótopo de datación de radiocarbono (^{14}C), con su semivida nuclear de 5 730 años, permite claramente distribuir un carbono de muestra entre materias primas fósiles ("muertas") y biosféricas ("vivas") [Currie, L. A. "Source Apportionment of Atmospheric Particles", Characterization of Environmental Particles, J. Buffle y H. P. van Leeuwen, Eds., 1 del vol. I de la IUPAC Environmental Analytical Chemistry Series (Lewis Publishers, Inc) (1992) 3 74]. La suposición básica en la datación de radiocarbono es que la constancia de la concentración de ^{14}C en la atmósfera conduce a la constancia de ^{14}C en los organismos vivos. Cuando se trata con una muestra aislada, la edad de una muestra puede deducirse aproximadamente por la relación $t = (-5730/0.693) \ln(A/A_{\text{sub.O}})$ (ecuación 5) donde t =edad, 5 730 años es la semivida del radiocarbono, y A y $A_{\text{sub.O}}$ son la actividad de ^{14}C específica de la muestra y del patrón moderno, respectivamente [Hsieh, Y., Soil Sci. Soc. Am J., 56, 460, (1992)]. Sin embargo, debido a las pruebas nucleares atmosféricas desde 1950 y a la quema de combustible fósil desde 1850, el ^{14}C ha adquirido una segunda característica temporal geoquímica. Su concentración en CO_2 atmosférico, y consecuentemente, en la biosfera viva, se duplicó aproximadamente en el pico de las pruebas nucleares, a mediados de la década de 1960. Desde entonces, ha vuelto gradualmente a la tasa de isótopos inicial cosmogénica (atmosférica) en estado estacionario ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$) de aprox. 1.2×10^{12} , con una "semivida" de relajación aproximada de 7-10 años. (esta última semivida no debe tomarse literalmente; sino más bien debe usarse la función de entrada nuclear atmosférica/desintegración detallada para trazar la variación del ^{14}C atmosférico y biosférico desde el inicio de la era nuclear.) Es esta última característica temporal del ^{14}C biosférico la que mantiene la promesa de la datación anual del carbono biosférico reciente. El ^{14}C puede medirse mediante espectrometría de masas con acelerador (EMA), con resultados proporcionados en unidades de "fracción de carbono moderno" (f_m). La f_m se define por los Materiales de Referencia Patrón (MRP) 4990B y 4990C del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, *National Institute of Standards and Technology*), conocidos como patrones de ácidos oxálicos HOxI y HOxII, respectivamente. La definición fundamental se refiere a 0,95 veces la relación de isótopos de $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ de HOxI (denominada AD 1950). Esto es más o menos equivalente a la madera de antes de la revolución industrial corregida para la desintegración. Para la biosfera viva actual (material vegetal), la f_m es de aproximadamente 1,1.

La relación de isótopos de carbono estables ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) proporciona una vía complementaria para obtener la discriminación y distribución. La relación de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en un material de origen biológico dado es una consecuencia de la relación de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en el dióxido de carbono atmosférico en el momento en el que se fija el dióxido de carbono y también refleja la ruta metabólica exacta. También se producen variaciones regionales. El petróleo, las plantas C3 (de hoja ancha), las plantas C.sub.4 (hierbas) y los carbonatos marinos, muestran diferencias significativas en $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y en los correspondientes valores de delta ^{13}C . Asimismo, la materia lipídica de plantas C3 y C4 se analiza de manera diferente a la de los materiales derivados de los componentes de hidratos de carbono de las mismas plantas como consecuencia de la ruta metabólica. Dentro de la precisión de la medición, el ^{13}C muestra grandes variaciones debido a los efectos de fraccionamiento isotópico, siendo el más significativo para la presente invención el mecanismo fotosintético. La principal causa de las diferencias en la relación de isótopos de carbono en las plantas está estrechamente asociada a las diferencias en la ruta del metabolismo de carbono fotosintético en las plantas, particularmente la reacción que se produce durante la carboxilación primaria, es decir, la fijación inicial de CO_2 atmosférico. Dos grandes clases de vegetación son las que incorporan el ciclo fotosintético "C3" (o de Calvin-Benson) y las que incorporan el ciclo fotosintético "C4" (o de Hatch-Slack). Las plantas C3, tales como de madera dura y las coníferas, son dominantes en las zonas de clima templado. En las plantas C3, la fijación de CO_2 primaria o reacción de carboxilación implica la enzima ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa y el primer producto estable es un compuesto de 3 carbonos. Por otro lado, las plantas C4, incluyen plantas tales como hierbas tropicales, maíz y caña de azúcar. En las plantas C4, una reacción de carboxilación adicional que implica otra enzima, fosfoenol-piruvato

carboxilasa, es la reacción de carboxilación primaria. El primer compuesto de carbono estable es un ácido de 4 carbonos que posteriormente se descarboxila. El CO₂ así liberado vuelve a fijarse mediante el ciclo C3.

Las plantas tanto C4 como C3 presentan un intervalo de relaciones isotópicas ¹³C/¹²C, pero los valores típicos son de aprox. -10 a -14 por mil (C4) y de -21 a -26 por mil (C3) [Weber et al., J. Agric. Food Chem., 45, 2942 (1997)]. El carbón y el petróleo se encuentran generalmente en este último intervalo. La escala de medición de ¹³C se definió originalmente por un ajuste a cero con piedra caliza belemnita Pee Dee (PDB, siglas del inglés *Pee Dee Belemnite*), en donde los valores se dan en partes por mil desviaciones con respecto a este material. Los valores de "Δ¹³C" están en partes por mil (por mil), abreviado ‰, y se calculan de la siguiente manera:

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

Dado que el material de referencia (MR) PDB se ha agotado, se ha desarrollado una serie de MR alternativos en cooperación con el IAEA (*International Atomic Energy Agency*, organismo internacional de energía atómica), el SGEU (*United States Geological Survey*, servicio geológico de los Estados Unidos), el NIST (*National Institute of Standards and Technology*, instituto nacional de estándares y tecnología) y con otros laboratorios de isótopos internacionales seleccionados. La anotación para las desviaciones por mil con respecto a PDB es Δ¹³C. Las mediciones se realizan en CO₂ mediante espectrometría de masas de relaciones isotópicas (IRMS, *Isotope-ratio mass spectrometry*) de alta resolución, en iones moleculares de masas 44, 45 y 46.

Los derivados de ácidos grasos y los biocombustibles, productos químicos y mezclas asociados, pueden distinguirse completamente de sus homólogos derivados de productos petroquímicos basándose en ¹⁴C (fM) y en la huella isotópica del carbono, indicando nuevas composiciones de materia.

Los derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento tienen utilidad en la producción de biocombustibles y productos químicos. Las nuevas composiciones de productos basados en derivados de ácidos grasos proporcionadas por la presente invención se pueden distinguir además basándose en la huella isotópica del carbono doble de los materiales obtenidos únicamente de fuentes petroquímicas. La capacidad para distinguir estos productos es beneficiosa en el rastreo de estos materiales en el comercio. Por ejemplo, los combustibles o productos químicos que comprenden perfiles de isótopos de carbono tanto "nuevos" como "antiguos" pueden distinguirse de los combustibles y productos químicos preparados únicamente con materiales "antiguos". Consecuentemente, los presentes materiales pueden rastrearse en el comercio basándose en su perfil único y con el propósito de definir la competencia y para determinar la fecha de caducidad.

En algunos ejemplos, se prepara una composición de biocombustible que incluye un derivado de ácido graso que tiene un δ¹³C de aproximadamente -10,9 a aproximadamente -15,4, en donde el derivado de ácido graso representa al menos aproximadamente el 85 % del material de origen biológico (derivado de un recurso renovable tal como materiales celulósicos y azúcares) en la composición. En otros ejemplos, la composición de biocombustible incluye un derivado de ácido graso que tiene la fórmula



en donde X representa CH₃, -CH₂OR¹; -C(O)OR²; o -C(O)NR³R⁴;

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

n es un número entero de 8 a 34, tal como de 10 a 24; y

R¹, R², R³ y R⁴ se seleccionan independientemente de H y alquilo inferior. Normalmente, cuando R es un compuesto alifático inferior, R representa un resto alquilo inferior o alqueno inferior, ramificado, no ramificado o cíclico. Como ejemplos de grupos R se incluyen, sin limitación, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, ciclopentenilo y similares. El derivado de ácido graso se caracteriza adicionalmente por tener un δ¹³C de aproximadamente -10,9 a aproximadamente -15,4; y el derivado de ácido graso representa al menos aproximadamente el 85 % del material de origen biológico en la composición. En algunos ejemplos, el derivado de ácido graso en la composición de biocombustible se caracteriza por tener una fracción de carbono moderno (fM ¹⁴C) de al menos aproximadamente 1,003, 1,010 o 1,5.

B. Derivados de ácidos grasos

El número de cetano (NC), la viscosidad, el punto de fusión y el calor de combustión para varios ésteres de ácidos grasos se han caracterizado, por ejemplo, en Knothe Fuel Processing Technology 86:1059-1070, 2005, que se incorpora en el presente documento por referencia. Usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, se puede genomodificar un hospedador de producción para producir uno cualquiera de los ésteres de ácidos grasos descritos en Knothe, Fuel Processing Technology 86:1059-1070, 2005.

Los hospedadores de producción descritos en el presente documento pueden producir alcoholes (de cadena corta, de cadena larga, ramificados o insaturados). Dichos alcoholes pueden usarse como combustibles directamente o pueden usarse para crear un éster, es decir, el lado A de un éster como se describió anteriormente. Dicho éster, solo o en

combinación con los otros derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento, son útiles como combustibles.

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

C. Impurezas

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

Los biocombustibles de derivados de ácidos grasos en bruto descritos en el presente documento (antes de mezclar el derivado de ácido graso con otros combustibles tales como combustibles tradicionales) contendrán menos catalizador de transesterificación que diésel petroquímico o biodiésel. Por ejemplo, el derivado de ácido graso puede contener menos de aproximadamente el 2 %, 1,5 %, 1,0 %, 0,5 %, 0,3 %, 0,1 %, 0,05 % o 0 % de un catalizador de transesterificación o una impureza resultante de un catalizador de transesterificación. Los catalizadores de transesterificación incluyen, por ejemplo, catalizadores de hidróxido, tales como NaOH, KOH, LiOH y catalizadores ácidos, tales como catalizadores de ácido mineral y catalizadores de ácido de Lewis. Los catalizadores e impurezas resultantes de los catalizadores de transesterificación incluyen, sin limitación, estaño, plomo, mercurio, cadmio, cinc, titanio, circonio, hafnio, boro, aluminio, fósforo, arsénico, antimonio, bismuto, calcio, magnesio, estroncio, uranio, potasio, sodio, litio y combinaciones de los mismos.

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

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

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

D. aditivos

Para potenciar el rendimiento de un combustible o motor, se utilizan aditivos de combustible. Por ejemplo, pueden utilizarse aditivos de combustible para alterar el punto de congelación/gelificación, el punto de turbidez, la lubricidad, la viscosidad, la estabilidad oxidativa, la calidad de ignición, el nivel de octano y el punto de inflamación. En los Estados Unidos, todos los aditivos de combustible deben estar registrados en la *Environmental Protection Agency* (Agencia de Protección Medioambiental) y las compañías que comercializan el aditivo de combustible y el nombre del aditivo de combustible están a disposición del público en el sitio web de la agencia y también contactando con la agencia. Un experto habitual en la técnica apreciará que los derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento pueden mezclarse con uno o más de estos aditivos para conferir una calidad deseada.

Un experto habitual en la técnica también apreciará que los derivados de ácidos grasos descritos en el presente documento pueden mezclarse con otros combustibles tales como biodiésel derivado de triglicéridos, diversos alcoholes tales como etanol y butanol, y productos derivados de petróleo tales como gasolina. En algunos ejemplos, se produce un derivado de ácido graso, tal como éster etílico C16:1 o éster etílico C18:1, que tiene un punto de gelificación bajo. Este derivado de ácido graso con punto de gelificación bajo se mezcla con biodiésel preparado a partir de triglicéridos para reducir el punto de gelificación global del combustible. De manera similar, un derivado de ácido graso, tal como éster etílico C16:1 o éster etílico C18:1, puede mezclarse con diésel derivado del petróleo para proporcionar una mezcla que tenga al menos, y a menudo más, del 5 % de biodiésel. En algunos ejemplos, la mezcla incluye al menos el 20 % o más del derivado de ácido graso.

Por ejemplo, se puede preparar una composición de biocombustible que incluya al menos aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de un derivado de ácido graso que incluya una cadena de carbono que sea de 8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 14:1, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:0, 20:1, 20:2, 20:3, 22:0, 22:1 o 22:3. Dichas composiciones de biocombustible pueden incluir adicionalmente al menos un aditivo seleccionado de un aditivo que disminuya el punto de turbidez que pueda disminuir el punto de turbidez a una temperatura de hasta menos de aproximadamente 5 °C o 0 °C, un tensioactivo o una microemulsión, al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % u 80 %, 85 %, 90% o 95% de combustible diésel de triglicéridos, gasolina derivada del petróleo o combustible diésel del petróleo.

10 Ejemplos

La **figura 1** es un diagrama de la ruta de FAS que muestra las enzimas directamente implicadas en la síntesis de acil-ACP. Para aumentar la producción de ceras/ésteres de ácidos grasos y alcoholes grasos, una o más de las enzimas pueden sobreexpresarse o mutarse para reducir la inhibición por retroalimentación. Adicionalmente, las enzimas que metabolizan los productos intermedios para preparar productos no a base de ácidos grasos (reacciones secundarias) pueden deleccionarse o atenuarse funcionalmente para aumentar el flujo de carbono a través de la ruta biosintética de ácidos grasos. Los ejemplos 1, 2 y 8 a continuación proporcionan hospedadores de producción ejemplares que se han modificado para aumentar la producción de ácidos grasos.

Las **figuras 2, 3 y 4** muestran vías biosintéticas que pueden genomodificarse para preparar alcoholes grasos y ésteres ácidos grasos/ceras, respectivamente. Como se ilustra en la **figura 2**, la conversión de cada sustrato (acetil-CoA, malonil-CoA, acil-ACP, ácido graso y acil-CoA) en cada producto (acetil-CoA, malonil-CoA, acil-ACP, ácido graso y acil-CoA) puede realizarse utilizando varios polipéptidos diferentes que son miembros de las clases de enzimas indicadas. Los siguientes ejemplos describen microorganismos que se han genomodificado o que pueden genomodificarse para que produzcan alcoholes grasos y ceras/ésteres de ácidos grasos e hidrocarburos específicos.

Ejemplo 1, Construcción del hospedador de producción

Un ejemplo de hospedador de producción es LS9001. LS9001 se produjo modificando C41 (DE3) de Overexpress.com (Saint Beausine, Francia) para deleccionar funcionalmente el gen *fadE* (acil-CoA deshidrogenasa).

Resumiendo, utilizando los cebadores YafV_NotI e Ivry_OI para amplificar aproximadamente 830 pb aguas arriba (sentido 5') de *fadE* y los cebadores Lpcaf_ol y LpcaR_Bam para amplificar aproximadamente 960 pb aguas abajo (sentido 3') de *fadE*, se preparó la cepa de *E. coli* con el gen *fadE* desactivado. Para crear una construcción para la delección en el marco del gen *fadE* completo, se usó PCR de solapamiento. La construcción para la delección de *fadE* se clonó en el plásmido pKOV3 sensible a la temperatura, que contenía un gen *SacB* para la contraselección y se realizó una delección cromosómica de *fadE* según el método de Link et al., J. Bact. 179:6228-6237, 1997). La cepa resultante no podía degradar ácidos grasos y acil graso-CoA (en el presente documento, a esta delección funcional se la denomina Δ *fadE*).

Modificaciones adicionales que pueden incluirse en un hospedador de producción incluyen la introducción de un plásmido que lleva los cuatro genes que son responsables de la actividad acetil-CoA carboxilasa en *E. coli* (*accA*, *B*, *C* y *D*, Registros: NP_414727, NP_417721, NP_417722, NP_416819, EC 6.4.1.2). Los genes *accABCD* se clonaron en dos etapas como operones bicistrónicos en los sitios *NcoI/HindIII* y *NdeI/Avr* de pACYCDuet-1 (Novagen, Madison, WI), el plásmido resultante se denominó pAS004.126.

Modificaciones adicionales que pueden incluirse en un hospedador de producción incluyen las siguientes: sobreexpresión de *aceEF* (que codifica el componente de deshidrogenasa E1p y el componente de dihidrolipoamida aciltransferasa E2p de los complejos de piruvato y 2-oxoglutarato deshidrogenasa); y *fabH/fabD/fabG/acpP/fabF* (que codifican FAS) de cualquier organismo conocido en la técnica que codifica dichas proteínas, incluyendo, por ejemplo, *E. coli*, *Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718), *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces spp*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Corynebacteria*, *Brevibacteria*, *Mycobacteria*, levaduras oleaginosas, y similares, pueden expresarse en el hospedador de producción. De manera similar, pueden genomodificarse hospedadores de producción para que expresen *accABCD* (que codifica la acetil co-A carboxilasa) a partir de *Pisum sativum* en lugar de, o además de, los homólogos de *E. coli*. Sin embargo, cuando el hospedador de producción también está produciendo butanol, es menos deseable expresar el homólogo de *Pisum sativum*.

En algunos hospedadores de producción ejemplares, pueden desactivarse o atenuarse genes utilizando el método de Link, et al., J. Bacteriol. 179:6228-6237, 1997). Por ejemplo, los genes que pueden desactivarse o atenuarse incluyen *gpsA* (que codifica la sn-glicerol 3-fosfato deshidrogenasa biosintética, registro NP_418065, CE: 1.1.1.94); *ldhA* (que codifica la lactato deshidrogenasa, registro NP_415898, CE: 1.1.1.28); *pflb* (que codifica la formiato acetiltransferasa 1, registros: P09373, CE: 2.3.1.54); *adhE* (que codifica la alcohol deshidrogenasa, registros: CAA47743, CE: 1.1.1.1, 1.2.1.10); *pta* (que codifica la fosfotransacetilasa, registros: NP_416800, CE: 2.3.1.8); *poxB* (que codifica la piruvato oxidasa, registros: NP_415392, CE: 1.2.2.2); *ackA* (que codifica la acetato cinasa, registros: NP_416799, CE: 2.7.2.1) y combinaciones de los mismos.

De manera similar, para la delección de *fadE*, puede introducirse la mutación PlsB[D311E] en LS9001 para atenuar PlsB utilizando el método descrito anteriormente. Una vez introducida, esta mutación disminuirá la cantidad de carbono que se desvía a la producción de fosfolípidos (véase la **figura 1**). Resumiendo, reemplazando el codón GAC para aspartato 311 por un codón GAA para glutamato, se prepara un alelo que codifica PlsB[D311E]. El alelo alterado se prepara por síntesis génica y el alelo de tipo silvestre plsB cromosómico se intercambia por el alelo plsB[D311E] mutante usando el método de *Link et al.* (véase anteriormente).

Ejemplo 2, Modificaciones del hospedador de producción

Para la expresión de diversas proteínas que se usaron en la síntesis de derivados de ácidos grasos se construyeron los siguientes plásmidos. Las construcciones se prepararon utilizando métodos de biología molecular convencionales y todos los genes clonados se pusieron bajo el control de promotores inducibles por IPTG (promotores de T7, tac o lac).

El gen *tesA* (gen de tioesterasa A, registro NP_415027 sin secuencia líder (Cho y Cronan, The J. of Biol Chem., 270:4216-9, 1995, CE: 3.1.1.5, 3.1.2.-) de *E. coli*, se clonó en pETDuet-1 digerido con *NdeI/AvrII* (pETDuet-1 descrito en el presente documento está disponible en Novagen, Madison, WI). Genes que codificaban tioesterasas (TE) vegetales de tipo FatB de *Umbellularia californica*, *Cuphea hookeriana* y *Cinnamomum camphorum* (registros: UcFatB1=AAA34215, ChFatB2=AAC49269, ChFatB3=AAC72881, CcFatB=AAC49151 se clonaron individualmente en tres vectores diferentes: (i) pETDuet-1 digerido con *NdeI/AvrII*, (ii) pBluescript KS+ digerido con *XhoI/HindIII* (Stratagene, La Jolla, CA) (utilizado para crear proteínas de fusión lacZ::TE N terminales) y (iii) pMAL-c2X digerido con *XbaI/HindIII* (New England Lab, Ipswich, MA) (usado para crear fusiones MalE::TE N-terminales). El gen *fadD* (que codifica la acil-CoA sintetasa) de *E. coli* se clonó en un derivado de pCDFDuet-1 digerido con *NcoI/HindIII*, que contenía el gen *acr1* (acil-CoA reductasa) de *Acinetobacter baylyi* ADP1 dentro de sus sitios *NdeI/AvrII*. En la **tabla 7** se proporciona un resumen de los plásmidos generados para preparar varias cepas de producción ejemplares, un experto habitual en la técnica apreciará que para obtener cepas similares pueden utilizarse diferentes plásmidos y modificaciones genómicas.

Tabla 7

Resumen de plásmidos utilizados en hospedadores de producción		
Plásmido	Organismo fuente Producto génico	Número de registro, Número de CE
pETDuet-1- <i>tesA</i>	<i>E. coli</i> TesA	Registros: NP_415027, CE: 3.1.1.5, 3,1.2.-
pETDuet-1-TEuc pBluescript-TEuc pMAL-c2X-TEuc	<i>Umbellularia californica</i> UcFatB1	Q41635 AAA34215
pETDuet-1-TEch pBluescript-TEch pMAL-c2X-TEch	<i>Cuphea hookeriana</i> ChFatB2 ChFatB3	ABB71581 AAC49269 AAC72881
pETDuet-1-TEcc pBluescript-TEcc TEci	<i>Cinnamomum camphorum</i> CcFatB	AAC49151
pCDFDuet-1-fadD- <i>acr1</i>	<i>E. coli</i>	<i>fadD</i> : Registros NP_416319, CE 6.2.1.3 <i>acr1</i> : Registros YP_047869

Los plásmidos de expresión elegidos contenían replicones compatibles y marcadores de resistencia a antibióticos, de modo que pudo establecerse un sistema de expresión de cuatro plásmidos. Por lo tanto, LS9001 puede cotransformarse con (i) cualquiera de los plásmidos de expresión de TE, (ii) el plásmido de expresión de *FadD*, que también expresa *acr1* y (iii) el plásmido de expresión de cera sintasa. Cuando se induce con IPTG, la cepa resultante producirá mayores concentraciones de alcoholes grasos a partir de fuentes de carbono tales como glucosa. La longitud de la cadena de carbono y el grado de saturación del alcohol graso producido depende del gen de tioesterasa que se expresa.

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

Los alcoholes grasos se produjeron expresando un gen de tioesterasa y un gen de acil-CoA reductasa (FAR) de manera exógena en un hospedador de producción. De manera más específica, los plásmidos pCDFDuet-1-fadD-*acr1* (acil-CoA reductasa) y pET-Duet-1-*tesA* (tioesterasa) se transformaron en la cepa LS9001 de *E. coli* (descrita en el ejemplo 1) y los transformantes correspondientes se seleccionaron en placa de LB complementado con 100 mg/l de espectinomicina y 50 mg/l de carbenicilina. Cuatro transformantes de LS9001/pCDFDuet-1-fadD-*acr1* se inocularon independientemente en 3 ml de medio M9 complementado con 50 mg/l de carbenicilina y 100 mg/l de espectinomicina). Las muestras que contenían los transformantes se cultivaron a 25 °C en un agitador (250 rpm) hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,5. A un frasco de 250 ml que contenía 30 ml del medio descrito anteriormente, se transfirieron 1,5 ml de cada muestra. El cultivo resultante se cultivó a 25 °C en un agitador hasta que el cultivo alcanzó

una DO₆₀₀ de entre 0,5-1,0. Después, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y el crecimiento continuó durante 40 horas.

Después, las células se centrifugaron a 4 000 rpm y los sedimentos celulares se suspendieron en 1,0 ml de metanol. A continuación, 3 ml de acetato de etilo se mezclaron con las células suspendidas. Después, se añadieron 3 ml de H₂O a la mezcla y se sometió a ultrasonido durante 20 minutos. La muestra resultante se centrifugó a 4 000 rpm durante 5 minutos y la fase orgánica (la fase superior) que contenía alcohol graso se sometió a análisis de CG/EM. El rendimiento de alcohol total (incluyendo tetradecanol, hexadecanol, hexadecenol y octadecenol) fue de aproximadamente 1-10 mg/l. Cuando una cepa de *E. coli*, que llevaba solo vectores vacíos, se cultivó de la misma manera, en el extracto de acetato de etilo solo se encontraron 0,2-0,5 mg/l de alcoholes grasos.

Ejemplo 4, Producción y liberación de alcohol graso del hospedador de producción

Acr1 (acil-CoA reductasa) se expresó en *E. coli* que se cultivó en glucosa como única fuente de carbono y energía. La *E. coli* produjo pequeñas cantidades de alcoholes grasos tales como dodecanol (C12:0-OH), tetradecanol (C14:0-OH) y hexadecanol (C16:0-OH). En otras muestras, se expresó *fadD* (acil-CoA sintetasa) junto con *acr1* en *E. coli* y se observó un aumento de cinco veces en la producción de alcohol graso.

En otras muestras, *acr1*, *fadD*, *accABCD* (acetil-CoA carboxilasa) (plásmido que llevaba *accABCD* construido como se describe en el ejemplo 1), se expresaron junto con varias tioesterasas (TE) individuales en *E. coli* C41(DE3) de tipo silvestre y una *E. coli* C41(DE3 Δ *fadE*, una cepa que carece de acil-CoA deshidrogenasa). Esto dio como resultado aumentos adicionales en la producción de alcohol graso y la modulación de los perfiles de alcoholes grasos (véase la figura 5). Por ejemplo, la sobreexpresión de *tesA* de *E. coli* (pETDuet-1-*tesA*) en este sistema logró un aumento de aproximadamente 60 veces en C12:0-OH, C14:0-OH y C16:0-OH siendo C14:0-OH el alcohol graso principal. Se obtuvo un resultado muy similar cuando se expresó la enzima ChFatB3 (FatB3 de *Cuphea hookeriana* en pMAL-c2X-TEcu). Cuando se expresó la enzima UcFatB1 (FatB1 de *Umbellularia californica* en pMAL-c2X-TEuc), la producción de alcohol graso aumentó aproximadamente 20 veces y C12:0-OH fue el alcohol graso predominante.

La expresión de ChFatB3 y UcFatB1 también condujo a la producción de cantidades significativas de los alcoholes grasos insaturados C16:1-OH y C14:1-OH, respectivamente. La presencia de alcoholes grasos también se encontró en el sobrenadante de las muestras generadas a partir de la expresión de *tesA* (figura 6). A 37 °C se encontraron cantidades aproximadamente iguales de alcoholes grasos en el sobrenadante y en el sedimento celular, mientras que a 25 °C se encontró aproximadamente el 25 % de los alcoholes grasos en el sobrenadante.

Ejemplo 5, Ésteres de ácidos grasos de cadena media

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

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

Usando DNA 2.0 (Menlo Park, CA 94025), se sintetizó un gen de SAAT recombinante. El ADN sintetizado se basaba en la secuencia génica publicada (número de registro AF193789) y se modificó para eliminar el sitio *NcoI*. El gen de SAAT sintetizado (como un fragmento de BamHI-HindIII) se clonó en pRSET B (Invitrogen, Calsbad, California), linealizado con BamHI y HindIII. El plásmido resultante, pHZ1.63A, se cotransformó en un hospedador de producción de *E. coli* con pAS004.114B, que llevaba un gen *fadD* de *E. coli* y un gen *acr1* de *A. baylyi* ADP1. Los transformantes se cultivaron en 3 ml de medio M9 con 2 % de glucosa. Después de la inducción con IPTG y la adición de 0,02 % de ácido octanoico, el cultivo continuó a 25 °C a partir de 40 horas. Después de esto, se añadieron 3 ml de acetato de acetilo a todo el cultivo y se mezcló varias veces con una mezcladora. La fase de acetato de acetilo se analizó mediante CG/EM.

De manera sorprendente, en el extracto de acetato de acetilo, no se encontró acetato de acilo. Sin embargo, se encontró un nuevo compuesto y el compuesto era octanoato de octilo. Mientras que la cepa de control sin el gen de SAAT [C41(DE3, Δ *fadE*)/pRSET B+pAS004.114B] no produjo octanoato de octilo. Además, la cepa [C41(DE3, Δ *fadE*)/pHZ1.43 B+pAS004.114B], en la que pHZ1.43 portaba el gen de cera sintasa de *A. baylyi* ADP1, produjo octanoato de octilo (véase la figura 7B).

El hallazgo de que la actividad de SAAT produce octanoato de octilo no se ha notificado antes y hace posible producir

ceras de cadena media tales como octanoato de octilo, decanoato de octilo, que tienen un punto de fusión bajo y son buenos candidatos para su uso como biocombustible para reemplazar el biodiésel a base de triglicéridos.

Ejemplo 6, Producción de éster de cera en la cepa LS9001 de *E. coli*

Se produjeron ésteres de cera genomodificando un hospedador de producción de *E. coli* para expresar una acil-CoA reductasa formadora de alcohol graso, tioesterasa y una cera sintasa. Por tanto, el hospedador de producción produjo tanto el lado A como el B del éster y la estructura de ambos lados estaba influenciada por la expresión del gen de tioesterasa.

De manera más específica, la cera sintasa de *A. baylyi* ADP1 (denominada WSadp1, registros AA017391, CE: 2.3.175) se amplificó con los siguientes cebadores utilizando, como molde, ADN genómico de *A. baylyi* ADP1. Los cebadores fueron (1) WSadp1_Ndel, 5'-TCATATGCGCCATTACATCCG-3' y (2) WSadp1_Avr, 5'-TCCTAGGAGGGCTAATTTAGCCCTTAGTT-3'. El producto de PCR se dirigió con *NdeI* y *AvrI* y se clonó en pCOALDeut-1 para dar pHZ 1.43. Después, el plásmido que llevaba WSadp1, se cotransformó en la cepa LS9001 de *E. coli* tanto con pETDuet-1'tesA como con pCDFDuet-1-fadD-acr1 y los transformantes se seleccionaron en placas de LB complementado con 50 mg/l de kanamicina, 50 mg/l de carbenicilina y 100 mg/l de espectinomicina. Se inocularon tres transformantes en 3 ml de LBKCS (caldo de LB complementado con 50 mg/l de kanamicina, 50 mg/l de carbenicilina, 100 mg/l de espectinomicina y 10 g/l de glucosa) y se cultivaron a 37 °C en un agitador (250 rpm). Cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,5, se transfirieron 1,5 ml de cada cultivo a frascos de 250 ml que contenían 50 ml de LBKCS y los frascos se cultivaron en un agitador (250 rpm) a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,5-1,0. Después, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM. Los cultivos inducidos se cultivaron en un agitador a 37 °C durante otras 40-48 horas.

Después, el cultivo se colocó en tubos cónicos de 50 ml y las células se centrifugaron a 3 500 X g durante 10 minutos. El sedimento celular se mezcló después con 5 ml de acetato de etilo. El extracto de acetato de etilo se analizó con CG/EM. El rendimiento intracelular de ceras (incluyendo C16C16, C14:1C16, C18:1C18:1, C2C14, C2C16, C2C16:1, C16C16:1 y C2C18:1) fue de aproximadamente 10 mg/l. Cuando una cepa de *E. coli*, que solo llevaba vectores vacíos, se cultivó de la misma manera, solo se encontraron 0,2 mg/l de cera en el extracto de acetato de etilo.

Ejemplo 7, Producción y liberación de éster etílico graso del hospedador de producción

La cepa LS9001 se modificó transformándola con los plásmidos que llevaban un gen de cera sintasa de *A. baylyi* (plásmido pHZ1.43), un gen de tioesterasa de *Cuphea hookeriana* (plásmido pMAL-c2X-TEcu) y un gen *fadD* de *E. coli* (plásmido pCDFDuet-1-fadD). Esta cepa recombinante se cultivó a 25 °C en 3 ml de medio M9 con 50 mg/l de kanamicina, 100 mg/l de carbenicilina y 100 mg/l de espectinomicina. Después de la inducción con IPTG, los medios se ajustaron a una concentración final de etanol al 1 % y glucosa al 2 %. El cultivo se dejó en cultivo durante 40 horas después de la inducción con IPTG. Las células se separaron del medio gastado por centrifugación a 3 500 X g durante 10 minutos). El sedimento celular se resuspendió con 3 ml de medio M9. La suspensión celular y el medio gastado se extrajeron después con 1 volumen de acetato de etilo. Las fases de acetato de etilo resultantes de la suspensión celular y el sobrenadante se sometieron a análisis de CG-EM. Los resultados mostraron que el éster etílico C16 era la especie de éster más relevante (tal como se esperaba para esta tioesterasa, véase la **tabla 1**), y que el 20 % del éster de ácido graso producido se liberaba de la célula (véase la **figura 8**). Un cepa C41(DE3, ΔfadE) de *E. coli* de control, que contenía pCOLADuet-1 (vector vacío para el gen de cera sintasa), pMAL-c2X-TEuc (que contenía *fatB* de *U. californica*) y pCDFDuet-1-fadD (gen *fadD* de *E. coli*), no pudo producir cantidades detectables de ésteres etílicos grasos. Los ésteres de ácidos grasos se cuantificaron, usando como referencia, éster etílico de ácido palmítico comercial. También se prepararon ésteres de ácidos grasos usando los métodos descritos en el presente documento con la salvedad de que se añadió metanol o isopropanol al caldo de fermentación y se produjeron los ésteres de ácidos grasos esperados.

Ejemplo 8, La influencia de varias tioesterasas sobre la composición de ésteres etílicos grasos producidos en cepas de *E. coli* recombinantes.

Las tioesterasas *FatB3* (*C. hookeriana*), *TesA* (*E. coli*) y *FatB* (*U. californica*) se expresaron simultáneamente con cera sintasa (*A. baylyi*). Se construyó un plásmido denominado pHZ1.61 reemplazando el fragmento de *NotI-AvrII* (que llevaba el gen *acr1*) por el fragmento *NotI-AvrII* de pHZ1.43 de modo que *fadD* y la cera sintasa *ADP1* estaban en un plásmido y ambas secuencias codificantes estaban bajo el control de un promotor de T7 distinto. La construcción de pHZ1.61 hizo posible utilizar un sistema de dos plásmidos en lugar del sistema de tres plásmidos como se describe en el ejemplo 6. Después, pHZ1.61 se cotransformó en *E. coli* C41 (DE3, ΔfadE) con uno de los diversos plásmidos que llevaban los diferentes genes de tioesterasa indicados anteriormente.

Los ésteres etílicos de ácidos grasos totales (sobrenadantes y ésteres etílicos de ácidos grasos intracelulares) producidos por estos transformantes se evaluaron usando la técnica descrita en el presente documento. Los rendimientos y la composición de los ésteres etílicos de ácidos grasos se resumen en **tabla 8**.

Tabla 8

Los rendimientos (mg/l) y la composición de ésteres etílicos de ácidos grasos por <i>E. coli</i> C41(DE3, ΔfadE)/pHZ1.61 recombinante y plásmidos que llevan diversos genes de tioesterasa.									
Tioesterasas	C2C10	C2C12:1	C2C12	C2C14:1	C2C14	C2C16:1	C2C16	C2C18:1	Total
'TesA	0,0	0,0	6,5	0,0	17,5	6,9	21,6	18,1	70,5
ChFatB3	0,0	0,0	0,0	0,0	10,8	12,5	11,7	13,8	48,8
ucFatB	6,4	8,5	25,3	14,7	0,0	4,5	3,7	6,7	69,8
pMAL	0,0	0,0	0,0	0,0	5,6	0,0	12,8	7,6	26,0

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

Ejemplo 9, Construcción del hospedador de producción

- Los genes que controlan la producción de ácidos grasos están conservados entre microorganismos. Por ejemplo, en la **tabla 9** se identifican los homólogos de muchos de los genes descritos en el presente documento que se sabe que se expresan en microorganismos que producen hidrocarburos. Para aumentar la producción de ácidos grasos y, por lo tanto, la producción de hidrocarburos en microorganismos tales como los identificados en la **tabla 9**, pueden expresarse genes heterólogos, tales como los de *E. coli*. Un experto habitual en la técnica también apreciará que, utilizando los métodos descritos en el presente documento, también pueden sobreexpresarse o atenuarse genes que son endógenos a los microorganismos proporcionados en la tabla 9. Por otra parte, para permitir la producción de hidrocarburos específicos con longitud de cadena de carbono, puntos de saturación y puntos de ramificación definidos, los genes que se describen en la figura 10, pueden expresarse o atenuarse en microorganismos que producen hidrocarburos de forma endógena.
- Por ejemplo, secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican acetil-CoA carboxilasa, se introducen en *K. radiotolerans*. Los siguientes genes comprenden el producto proteico de acetil-CoA carboxilasa en *K. radiotolerans*: acetil CoA carboxilasa, subunidad alfa (*accA*/ZP_00618306), acetil-CoA carboxilasa, proteína transportadora de biotina y carboxilo (*accB*/ZP_00618387), acetil-CoA carboxilasa, subunidad de biotina carboxilasa (*accC*/ZP_00618040) y acetil-CoA carboxilasa, subunidad beta (carboxiltransferasa) (*accD*/ZP_00618306). Estos genes se clonan en un plásmido de modo que constituyen un operón de acetil-CoA carboxilasa (*accABCD*) sintética bajo el control de un sistema de expresión de *K. radiotolerans* tal como el sistema de expresión desvelado en Ruyter et al., Appl Environ Microbiol. 62:3662-3667, 1996. La transformación del plásmido en *K. radiotolerans* potenciará la producción de ácidos grasos. Usando los métodos desvelados en el presente documento, la cepa productora de hidrocarburos de *K. radiotolerans*, también puede genomodificarse para preparar hidrocarburos ramificados, insaturados que tienen longitudes de cadena de carbono específicas.

Tabla 9
Hospedadores de producción de hidrocarburos

Organismo	Nombre del gen	Número de registro/Seq ID/locus	Nº de CE
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	accA	YP_388034	6.4.1.2
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G22	accC	YP_388573/YP_388033	6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G23	accD	YP_388034	6.4.1.2
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G28	fabH	YP_38S920	2.3.1.180
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G29	fabD	YP_388786	2.3.1.39
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G30	fabG	YP_388921	1.1.1.100
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G31	acpP	YP_388922/YP_389150	3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G32	fabF	YP_388923	2.3.1.179
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G33	gpsA	YP_389667	1.1.1.94
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G34	ldhA	YP_388173/YP_390177	1.1.1.27, 1.1.1.28
<i>Erwinia amylovora</i>	accA	942060 - 943016	6.4.1.2

ES 2 763 624 T3

(continuación)

Hospedadores de producción de hidrocarburos

Organismo	Nombre del gen	Número de registro/Seq ID/locus	Nº de CE
<i>Erwinia</i> (<i>micrococcus</i>) <i>amylovora</i>	accB	3440869 - 3441336	6.4.1.2
<i>Erwinia</i> (<i>micrococcus</i>) <i>amylovora</i>	accC	3441351 - 3442697	6.3.4.14,6.4.1.2
<i>Erwinia</i> (<i>micrococcus</i>) <i>amylovora</i>	accD	2517571 - 2516696	6.4.1.2
<i>Erwinia</i> (<i>micrococcus</i>) <i>amylovora</i>	fadE	1003232 - 1000791	1.3.99.-
<i>Erwinia</i> (<i>micrococcus</i>) <i>amylovora</i>	plsB (D311E)	333843 - 331423	2.3.1.15
<i>Erwinia</i> (<i>micrococcus</i>) <i>amylovora</i>	aceE	840558 - 843218	1.2.4.1
<i>Erwinia</i> (<i>micrococcus</i>) <i>amylovora</i>	aceF	843248 - 844828	2.3.1.12
<i>Erwinia</i> (<i>micrococcus</i>) <i>amylovora</i>	fabH	1579839 - 1580789	2.3.1.180
<i>Erwinia</i> (<i>micrococcus</i>) <i>amylovora</i>	fabD	1580826 - 1581749	2.3.1.39
<i>Erwinia</i> (<i>micrococcus</i>) <i>amylovora</i>	fabG	CAA74944	1.1.1.100
<i>Erwinia</i> (<i>micrococcus</i>) <i>amylovora</i>	acpP	1582658 - 1582891	3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Erwinia</i> (<i>micrococcus</i>) <i>amylovora</i>	fabF	1582983 - 1584221	2.3.1.179
<i>Erwinia</i> (<i>micrococcus</i>) <i>amylovora</i>	gpsA	124800 - 125810	1.1.1.94
<i>Erwinia</i> (<i>micrococcus</i>) <i>amylovora</i>	ldhA	1956806 - 1957789	1.1.1.27, 1.1.1.28
<i>Kineococcus</i> <i>radiotolerans</i> SRS30216	accA	ZP_00618306	6.4.1.2
<i>Kineococcus</i> <i>radioferans</i> SRS30216	accB	ZP_00618387	6.4.1.2
<i>Kineococcus</i> <i>radiotolerans</i> SRS30216	accC	ZP_00618040/ZP_00618387	6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Kineococcus</i> <i>radiotolerans</i> SRS30216	accD	ZP_00618306	6.4.1.2
<i>Kineococcus</i> <i>radiotolerans</i> SRS30216	fadE	ZP_00617773	1.3.99.-
<i>Kineococcus</i> <i>radiotolerans</i> SRS30216	plsB (D311E)	ZP_00617279	2.3.1.15

(continuación)

Hospedadores de producción de hidrocarburos			
Organismo	Nombre del gen	Número de registro/Seq ID/locus	Nº de CE
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	aceE	ZP_00617600	1.2.4.1
<i>Kineococcus radiololerans</i> SRS30216	aceF	ZP_00619307	2.3.1.12
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	fabH	ZP_00618003	2.3.1.180
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	fabD	ZP_00617602	2.3.1.39
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	fabG	ZP_00615651	1.1.1.100
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	acpP	ZP_00617604	3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	fabF	ZP_00617605	2.3.1.179
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	gpsA	ZP_00618825	1.1.1.94
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	ldhA	ZP_00618879	1.1.1.27, 1.1.1.28
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	accA	YP_425310	6.4.1.2
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	accB	YP_427521	6.4.1.2
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	accC	YP_427522/YP_425144/YP_427028/YP_426209/Y P_427404	6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	accD	YP_428511	6.4.1.2
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	fadE	YP_427035	1.3.99.-
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	aceE	YP_427492	1.2.4.1
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	aceF	YP_426966	2.3.1.12
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	fabH	YP_426754	2.3.1.180
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	fabD	YP_425507	2.3.1.39
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	fabG	YP_425508/YP_425365	1.1.1.100
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	acpP	YP_425509	1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	fabF	YP_425510/YP_425510/YP_425285	2.3.1.179
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	gpsA	YP_428652	1.1.1.94
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	ldhA	YP_426902/YP_428871	1.1.1.28
<i>Vibrio furnissii</i>	accA		1, 16 6.4.1.2
<i>Vibrio furnissii</i>	accB		2, 17 6.4.1.2
<i>Vibrio furnissii</i>	accC		3, 18 6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Vibrio furnissii</i>	accD		4, 19 6.4.1.2
<i>Vibrio furnissii</i>	fadE		5, 20 1.3.99.-
<i>Vibrio furnissii</i>	plsB (D311E)		6, 21 2.3.1.15

(continuación)

Hospedadores de producción de hidrocarburos			
Organismo	Nombre del gen	Número de registro/Seq ID/locus	Nº de CE
<i>Vibrio furnissii</i>	aceE		7, 22 1.2.4.1
<i>Vibrio furnissii</i>	aceF		8, 23 2.3.1.12
<i>Vibrio furnissii</i>	fabH		9, 24 2.3.1.180
<i>Vibrio furnissii</i>	fabD		10, 25 2.3.1.39
<i>Vibrio furnissii</i>	fabG		11, 26 1.1.1.100 3.1.26.3
<i>Vibrio furnissii</i>	acpP		12, 27 1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Vibrio furnissii</i>	fabF		13, 28 2.3.1.179
<i>Vibrio furnissii</i>	gpsA		14, 29 1.1.1.94
<i>Vibrio furnissii</i>	ldhA		15, 30 1.1.1.27, 1.1.1.28 6.4.1.2
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	accA	ZP_01643799	6.4.1.2
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	accB	ZP_01644036	6.4.1.2
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	accC	ZP_01644037	6.3.4.14, 6.4.1.2
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	accD	ZP_01644801	6.4.1.2
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	fadE	ZP_01645823	1.3.99.-
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	plsB (D311E)	ZP_01644152	2.3.1.15
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	aceE	ZP_01644724	1.2.4.1
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	aceF	ZP_01645795	2.3.1.12
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	fabH	ZP_01643247	2.3.1.180
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	fabD	ZP_01643535	2.3.1.39
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	fabG	ZP_01643062	1.1.1.100
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	acpP	ZP_01643063	3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	fabF	ZP_01643064	2.3.1.179
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	gpsA	ZP_01643216	1.1.1.94
<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3</i>	ldhA	ZP_01645395	1.1.1.27, 1.1.1.28

Para la tabla 9, los números de registro son del GenBank, versión 159.0 del 15 de abril de 2007, Los números de CE son de la KEGG, versión 42.0 de abril de 2007 (más actualizaciones diarias hasta el 05/09/07 inclusive), los resultados de la cepa Ea273 de *Erwinia amylovora* se extrajeron del centro de secuenciación Sanger, secuencia aleatoria completada el 5/9/07, las posiciones de *Erwinia* representan ubicaciones en el pseudocromosoma de Sanger, las secuencias de *Vibrio furnissii* M1 son del pseudocromosoma LS9 VFM1, v2 creada el 28/09/06 e incluye el gen completo, y también puede incluir la secuencia flanqueante

Ejemplo 10, Cepas de producción ejemplares adicionales

- 5 En la tabla 10, a continuación, se proporcionan cepas de producción ejemplares adicionales. Se describen dos ejemplos de rutas biosintéticas para producir ácidos grasos, alcoholes grasos y ésteres de ceras. Clonando la expresión de los genes accABCD de *E. coli*, el gen *tesA* de *E. coli* y el gen *fadD* de *E. coli* en una célula hospedadora, puede producirse un hospedador genomodificado. Las células hospedadoras pueden seleccionarse de *E. coli*, levaduras, añadir a la lista. Estos genes también pueden transformarse en una célula hospedadora que se modifica para que contenga una o más de las manipulaciones genéticas descritas anteriormente en los ejemplos 1 y 2.
- 10 anteriormente. Como se proporciona en la tabla 10, utilizando los genes exógenos indicados, pueden crearse hospedadores de producción adicionales.

Tabla 10
Combinación de genes útiles para preparar cepas de producción genomodificadas

Péptido	Fuentes de genes	Genes	Ácidos grasos		Alcoholes grasos		Cera/ésteres grasos	
			ejemplo 1	ejemplo 2	ejemplo 1	ejemplo 2	ejemplo 1	ejemplo 2
acetil-CoA carboxilasa	<i>E. coli</i>	accABCD	x		x		x	
	<i>E. coli</i>	tesA	x		x		x	
tioesterasa	<i>Cinnamomum camphora</i>	ccFatB						
	<i>Umbellularia californica</i>	umFatB						
	<i>Cuphea hookeriana</i>	chFatB2		x		x		
	<i>Cuphea hookeriana</i>	chFatB3						
	<i>Cuphea puta</i>	chFata						
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtFatA1						
acil-CoA sintasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtFatB1 [M141T]						
	<i>E. coli</i>	fadD	x		x		x	
acil-CoA reductasa	<i>Bombyx mori</i>	bFAR						
	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	acr 1			x			
	<i>Simmondsia chinensis</i>	jjFAR				x		x
	<i>Triticum aestivum</i>							
	<i>Mus musculus</i>	mFAR1						
	<i>Mus musculus</i>	mFAR2						
	<i>Acinetobacter sp</i> M1	acr M1						
	<i>Homo sapiens</i>	hFAR						
	<i>Fundibacter jedensis</i> DSM 12178	WST9						
	<i>Acinetobacter sp.</i> H01-N	WSHN					x	
cera sintasa/alcohol aciltransferasa	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	WSadp1						x
	<i>Mus musculus</i>	mWS						
	<i>Homo sapiens</i>	hWS						
	<i>Fragaria x ananassa</i>	SAAT						
	<i>Malus x domestica</i>	MpAAT						
	<i>Simmondsia chinensis</i>	JjWS (AAD38041)						
Descarbonilasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	cer1						
	<i>Oryza sativa</i>	cer1						
Transportador	<i>Acinetobacter sp.</i> H01-N						x	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cer5						x

Ejemplo 11, Fermentación

- También pueden genomodificarse microorganismos hospedadores para que expresen umuC y umuD de *E. coli* en pBAD24 bajo el sistema del promotor de *prpBCDE* a través de síntesis *de novo* de este gen con los genes de producción de productos finales apropiados. Para la producción de productos de hidrocarburos a pequeña escala, células de *E. coli* BL21(DE3), que contenían pBAD24 (con resistencia a ampicilina y la ruta de síntesis de productos finales) así como pUMVC1 (con resistencia a kanamicina y el sistema de sobreexpresión de acetil CoA/malonil CoA), se incubaron durante la noche a 37 °C en frascos de 2 l con agitación a >200 rpm en 500 ml de medio LB complementado con ampicilina 75 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml hasta que los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de >0,8. Tras lograr una DO₆₀₀ de > 0,8, las células se complementaron con propionato de sodio 25 mM (pH 8.0) para activar los sistemas génicos genomodificados para la producción, así como para detener la proliferación celular (a través de la activación de las proteínas umuC y umuD). La inducción se realizó durante 6 horas a 30 °C. Después de la incubación, los medios se examinaron para detectar el producto usando CG-EM (como se describe a continuación).
- Para la producción de productos a gran escala, los microorganismos genomodificados se cultivaron en lotes de 10 l, 100 l o más grandes, se fermentaron y se indujeron para expresar los productos deseados en función de los genes específicos codificados en los plásmidos, según corresponda. Se incubaron células de *E. coli* BL21(DE3), que contenían pBAD24 (con resistencia a ampicilina y la ruta de síntesis de productos finales) así como pUMVC1 (con resistencia a kanamicina y el sistema de sobreexpresión de acetil CoA/malonil CoA), a partir de un cultivo de siembra de 500 ml para fermentaciones de 10 l (5 l para fermentaciones de 100 l) en medios LB (sin glicerol) a 37 °C con agitación a >200 rpm hasta que los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de >0,8 (normalmente 16 horas) incubados con kanamicina 50 µg/ml y ampicilina 75 µg/ml. Los medios se tratan con complementación continua para mantener propionato de sodio 25 mM (pH 8,0) para activar los sistemas génicos genomodificados para la producción, así como para detener la proliferación celular (a través de la activación de las proteínas umuC y umuD). Los medios se complementan de manera continua con glucosa para mantener una concentración de 90 g/100 ml. Después de la primera hora de inducción, cada hora, se retiran partes alícuotas de no más del 10 % del volumen celular total y se dejan reposar sin agitar para permitir que el producto de hidrocarburo suba a la superficie y experimente una separación de fases espontánea. Después, se recoge el componente de hidrocarburo y la fase acuosa se devuelve a la cámara de reacción. La cámara de reacción funciona de manera continua. Cuando la DO₆₀₀ cae por debajo de 0,6, las células se reemplazan por un nuevo lote cultivado a partir de un cultivo de semillas.

Para la producción de ésteres de cera, después del aislamiento, los ésteres de cera se lavan sucintamente en HCl 1 M para escindir el enlace éster, y se devuelven a pH 7 con un lavado exhaustivo con agua destilada.

Ejemplo 12, Caracterización del producto

- Para caracterizar y cuantificar los alcoholes grasos y los ésteres de ácidos grasos, se utilizó la cromatografía de gases (CG) acoplada con detección por espectros de masas (EM) de impacto electrónico. Las muestras de alcohol graso se derivatizaron primero con un exceso de N-trimetilsililo (TMS) imidazol para aumentar la sensibilidad de la detección. Los ésteres de ácidos grasos no requerían derivatización. Se disolvieron tanto los derivados de alcohol graso-TMS como los ésteres de ácidos grasos en un disolvente volátil apropiado, como acetato de etilo. Las muestras se analizaron en una columna capilar DP-5 de 30 m utilizando el siguiente método. Después de una inyección no dividida de 1 µl en la columna de CG/EM, el horno se mantiene a 100 °C durante 3 minutos. La temperatura se elevó hasta 320 °C a una velocidad de 20 °C/minuto. El horno se mantuvo a 320 °C durante 5 minutos más. La velocidad de flujo del gas portador helio era de 1,3 ml/minuto. La EM de cuadrupolo escanea de 50 a 550 m/z. Los tiempos de retención y los patrones de fragmentación de picos de producto se compararon con referencias auténticas para confirmar la identidad de los picos.

- Por ejemplo, un éster etílico del ácido hexadecanoico se eluyó a los 10,18 minutos (figuras 9A y 9B). El ion original de 284 unidades de masa se observó fácilmente. Más abundantes fueron los iones hijos producidos durante la fragmentación de masas. Esto incluía el ion hijo más frecuente de 80 unidades de masa. El alcohol graso derivatizado hexadecanol-TMS eluyó a los 10,29 minutos y se pudo observar el ion original de 313. El ion más frecuente fue el ion M-14 de 299 unidades de masa.

- La cuantificación se llevó a cabo inyectando varias concentraciones de las referencias auténticas apropiadas usando el método de CG/EM descrito anteriormente. Esta información se utilizó para generar una curva patrón con respuesta (recuento total de iones integrados) frente a la concentración.

EQUIVALENTES

- Aunque en el presente documento se divulgan explícitamente ejemplos específicos de las invenciones en cuestión, la memoria descriptiva y los ejemplos anteriores del presente documento, son ilustrativos y no restrictivos. Muchas variaciones de las invenciones resultarán obvias para los expertos en la técnica después de la revisión de esta memoria descriptiva incluyendo los ejemplos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> LS9, Inc

5 <120> Producción de ácidos grasos y derivados de los mismos

<130> EP61667IVFZ210pau

<140> aún no asignado

10 <141> se adjunta con la presente

<150> 07 809 099.0

<151> 18/05/2007

15 <150> PCT/US2007/011923

<151> 18/05/2007

<150> 60/908 547

<151> 28/03/2007

20 <150> PCT/US2007/003736

<151> 13/02/2007

<150> 60/802 016

25 <151> 19/05/2006

<150> 60/801 955

<151> 19/05/2006

30 <160> 30

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

35 <211> 498

<212> ADN

<213> *Vibrio furnissii*

<400> 1

gtagatgagc ctaaattttc tagaatttag aaaaacctat tgtagaactg gaagctaaaa 60

ttcaggcgct tcgtgacgtg tctcgtcatg gcggtggaac ttccgtagat cttgaaaaag 120

agatcgaaca gctagaaaag aaaagcctag agcttaaaaa gaaaattttc ggtgatttag 180

gggcatggca agtggcacag atggctcgcc atccacaacg tccttacacc ttagattaca 240

tcaacaacat gtttacggag ttcgatgaac tagccgggtga ccgtgcattt gctgacgaca 300

aagcgatcgt gggcggcatg gcccgcttag atggctcgccc tgtgatggtg attggtcatc 360

agaaaggccg tgaaaccgct gaaaaagtaa aacgtaactt tgggatgcca aagccagaag 420

gttaccgtaa agccctgcgt ttgatggaaa tggctgagcg tttcaacatg ccaatcatta 480

40 ccttcatcga cacggcgg 498

<210> 2

<211> 564

45 <212> ADN

<213> *Vibrio furnissii*

<400> 2

ES 2 763 624 T3

atgaattcgc tttgtcggca gccgttcgcg cgctgcaagc aaagtaaacc caaacactct 60
gcagctcaat tgagctgtct tattcacaag ataaaagaga aagaaacaat ggatattcgt 120
aaaatcaaga agcttatcga attggttgaa gagtcaggca ttgctgagct agaaatttct 180
gaaggtgaag aatcggtagc catcagtcgt cacggtgtcg cccagttgc acctatccag 240
tatgcagcac ctgcaccaat ggcagcgcca gtagcagcac ctgcagcagc gccagtcgct 300
gaagcaccag cagcagccaa aacgcctgcg ggccacatgg ttctttctcc aatggtgggt 360
acgttctacc gttcaccaag tccagatgca aatcattca tcgaagtggg tcaaactgtg 420
aaagcgggtg acacattgtg catcgttgaa gcgatgaaaa tgatgaacca aatcgaagca 480
gacaagtctg gtgtagtgac cgagatcctt gttgaagacg gtcaggccgt agaattcgac 540
cagccacttg ttgtcatcga ataa 564

5 <210> 3
<211> 1344
<212> ADN
<213> *Vibrio furnissii*

10 <400> 3

ES 2 763 624 T3

atgctagata agttagtcat cgcgaaccga ggcgaaattg cgcttcgtat tcttcgtgca 60
 tgtaaagagt tgggcatcaa aactggtgcc gttcactcca cagcagaccg cgatctaaaa 120
 cacgtcctgc tggcggatga aaccgtatgt atcggccctg caaaaggcat cgatagctac 180
 ttgaacattc cacgcatcat ttcagccgct gaagtgaccg gcgcagtggc catccacccg 240
 ggttacggct tcctgtctga aaatgcggac tttgctgaac aagttgagcg cagcggcttt 300
 atcttcgtgg gtccaaaagc cgacaccatc cgctgatgg gcgataaagt gtcagccatc 360
 accgcatga agaaagcagg cgttccttgt gtaccggggt ctgacggtcc tctggacaac 420
 gatgaagtga aaaaccgtgc acacgcgaaa cgcattgggt acccagtgat catcaaagcc 480
 tctggtggcg gcggcggctc cggtatgcgt gtggttcgca gcgaagcggg actggtcaat 540
 gccatcagca tgaccctgctc agaagcgaaa gcggcgttca acaacgacat ggtttacatg 600
 gagaaatacc tcgaaaacc acgtcacggt gaagtccaag ttctggccga tggtcagggc 660
 agcgcgatcc acttgggtga acgcgactgt tccatgcagc gtcgtcacca gaaagtagtg 720
 gaagaagcgc cagcaccagg cattactgaa gagatgcgta agtacatcgg tgaacgctgt 780
 acccgtgcgt gtatcgaaat cggttaccgc ggcgcaggta cgtttgagtt cctgtacgaa 840
 aacggcgaat tctacttcat cgaaatgaac acacgtattc aggttgaaca cccagtgact 900
 gaaatggtca caggcgttga cttgatcaaa gaacagctgc gcatcgcagc aggccaaccg 960
 ctgtcgttca cacaagacga catcaaaatt cgtggccatg cgatggaatg ccgtatcaac 1020
 gcggaagacc cagaacgctt cctacottgc ccaggcaaga tcaccctgtt ccactcacca 1080
 ggtggcatgg gcgtgcgctt ggaatcacac atctactcag gctacaccgt accggcgtac 1140
 tacgactcga tgatcggcaa actgatcacc tttggtgaga accgtgacgt cgcgattgca 1200
 cggatgcgta acgcgctcga tgagatgatt gtggaaggta tcaaaaccaa cattccactg 1260
 cagcaagtaa tcatgaaaga tgagaacttc caacacggtg gcaccaacat ccactatctg 1320
 gagaaaaagc tggggctgca ataa 1344

<210> 4
 <211> 927
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnissii*
 <400> 4

5

ES 2 763 624 T3

atgagctggc ttgagaagat tttagaaaa agcaacatcg gaagttcacg taaagcgtct 60
atccctgaag gggtttgac caaatgtaca tcgtgtgaac aggtgcttta ttacgctgaa 120
ctagagcgca atcttgaagt ttgtccgaag tgtaatcatc acatgcgtat gaaggcgcgc 180
cgtcgtcttg aaacgttctt ggacgaagca aaccgttacg aaatcgcgga cgaactcgaa 240
ccgcaagata aactgaaatt taaagactcc aaacgttaca aagagcgtct tgcgactgcg 300
cagaagagca gtggcgaaaa agatgcgctg attgtgatga aaggcgagtt gatgacgatt 360
ccagtcgtgg cgtgtgcggt tgaattctcg ttcattggcg gttcaatggg gtcggttgtc 420
ggtgcgcggt tcgtgctgac agttgaagcg gcgattgaag cgaactgtgg tctggtctgt 480
ttctctgcc a gtggtgccg acgtatgcaa gaagcgtgca tgtcgtgat gcagatggcc 540
aaaaccagtg cagcgtcga gcgtctaacg gcgaaaggtc tcccgtttat ctccgtgatg 600
acagacccaa ccatgggtgg ggtgtctgac agtctggcaa tgctggcgga catcaacatc 660
ggtgagccga aagcactgat cggtttcgac ggtcgtcgcg tgatcgagca gaccgtgcgc 720
gaagagctgc cggaaggttt ccaacgcagc gaattcctgc tggagcacgg tgcgattgat 780
atgatcgttg accgtcgtga aatgcgtcag cgtgtggctg gcctgctggc gaaaatgaca 840
cgtcaggagt cgccgctggt ggtttctgtg aacgatgcgc caaatgaagc cgcatattct 900
gtaccagaag cgaacaaaaa agggtaa 927

<210> 5
<211> 2445
<212> ADN
<213> *Vibrio furnissii*

<400> 5

atggacatct tgctctcaat cttagggttc gtggctcgtg taagcggctg cctgtaccac 60
agaacctcat taatgactgc cttagccgca ctgaccgtga ccatggttgg cctgtcgttg 120
tttgccccag tgggtatcat cagctgggac ctgtacttag ccgctatcgc ggtattggca 180

5

10

ES 2 763 624 T3

gtcccgtaa tccgtcaaag tctcatcagc ggtaagacac taaaggtatt caaaaaagta 240
ctgcctgcga tgtcgcagac agaaaaagaa gcgcttgatg ctggcaccgt gtggtgggaa 300
gccgaactgt tcaaaggcaa accggactgg caacagctga gccatatcaa agcgccaca 360
ctttctgccg aagaacaggc gttcctcgat ggcccagtga acgaagtgtg cgccatggtg 420
aacgactatc aggtgactca cgaattggcg gatttgcctc cggaagtgtg gcaatacctg 480
aaagaccaca aatthttcgc catgatcatt aagaagcagt acggcggcctt ggaatthttcc 540
gcgtagcgc aatcgctggt gctacaaaag ctgacgggcg tatcgggcgt gctctcttcc 600
accgtcggcg tgccgaactc tctcggcccg ggcgaactgc tgcaacatta cggcaccgac 660
gatcagaaaag attactacct ccctcgtttg gcggaaggca aagagattcc atgthttcgcg 720
ctgaccagcc cagaagcggg ctctgatgcy ggctcgattc cggattacgg catcgtgtgc 780
aaagacgaat ggggaaggcaa agaagtgtg ggcattgcgc tgacatggaa caaacgctac 840
atcacgtgcy cgccagttgc gacggthttt ggtthttgcct ttaaacgtgc cgaccctgac 900
gggctattgg gcgaccaaaa agagattggc atcacgtgtg cthttgatccc gacacacctc 960
aaaggggtgg aatcgcaa tcgtcactc ccattgaacg tgccgthcca aatggcccg 1020
acgcgcgca acgatctatt tgtgccgctg gacttcatca tcggtggccc atcgatggcc 1080
ggccaaggth ggcgcatgct ggtggaatgt ttatcagtg gtcgcggtat tacgctgcca 1140
tcgaactcaa ctggcggcat caaacggcg gcaatggcaa cggcgctta tgcgcgcat 1200
cgtcgtcag tcaagcaacc cattggtcac atggaaggga ttgaagaacc thttggcgcg 1260
cttgcaaggga acgcttacgt gatggatgca gcgagcaacc tcaactgtcg ggggattgat 1320
gccggcgaaa aacctcgtt tathttcgcg attgtgaagt atcaactgtac ccaccgcg 1380
caacgtcaa tcatcgatc aatggacatc gtcggcggca aaggcatctg thttgggcca 1440
tcgaacttcc ttgcgcgagg ttaccaagg tcccctatcg cgatcaccgt ggaaggcgcc 1500
aacattctga cccgctccat gatcatctt ggtcagggtg ctattcgtg ccacccgtac 1560
gthttgaaag agatggaagc agcgtattca gacagcgcca atcggtcga acaatthgac 1620
gccgcgctgg ctggccatgt cagctthacc atgagtaact tgggtcgctg catctgthtt 1680
ggtctgaccg acgggthtag ctctgccgca ccaaccaaag atgccaccaa acgthtactat 1740
cagcaactca accgthacag tgcaaacctt gccctgctgg ccgatathtt catggccgta 1800
ctgggtggct ccctgaaacg taaagagcgc ctgtccgcg gthttgggtga ththttaaag 1860
caactthatc tcagctcagc aacgtgaag cgctthgaga atgatggtcg ccagcagaa 1920
gattthgctt tggtagactg ggggctgcaa gacagcttga aacagaccga agtggcgatt 1980
gatgagthct tggcgaactt cccgaacaag gtgatcggca aagccctcg tgtcttgatc 2040
atgccatthg gccgcgtgcy caaacacca aacgacaagc tcgacagcaa agtggcgag 2100

ES 2 763 624 T3

atcattcaaa cgccaagtgc gacccgctca cgcacatcggtc gtcacatcagta cctcgaaccg 2160
 actgcacata acgcggtcgg caagattgaa ctggcggttga atgtgattct tcaagcagaa 2220
 ccggtgttcg acaaggtatg caaagcgcgtg aacgaacgtc gccattcac gcaattggat 2280
 caagtggcac aatgtggcct tgagcaaaag ctgatcaccg agcaagaagc cgaactgctg 2340
 atcgaagccg agcaacaccg cttatacacc atcaatgtgg atgactttgc gccgcaggag 2400
 ttagcagcaa aaaagtcaca acccaagctg gtcgaggtcg cgtga 2445

<210> 6
 <211> 2424
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnissii*

5

<400> 6

atgtottctg gacactcatt ttgcggttcc ttgttgaaat taccactgtc tgttctggta 60
 aaaggtacgg tcattccatc caatccgatc gatgatctcg agattgatat taacaagccg 120
 atcgtctatg cactaccctt tcgctccaat gtcgacctgt tgacgctgca aacgcatgcg 180
 ttacaagccg gcctgccgga tccgtagaa ccgctgacca ttcatagtca cacgctgaaa 240
 cgttacgtgt tcatctcgtc gcgccccacg ctgctgcaag atgacaatca ggtgccgacc 300
 gattctatcg ccacattcag cgaaatgctc agcctgcatc aagaagattc ggagttggat 360
 gtgcaggtca ttctgtccac cgtcctgtgg ggacgcaaac cgggcaaaga aggtcgggaa 420
 cgtccatatt tgcaagcctt gaatggcccg caaaaagcca aagcggctctt tgccgccgga 480
 cgggactggt tgggtgcgctt tagccccgtg gtctcgtctc gttatatggc cgactcgcac 540
 ggcaaccgatg cctcgattgc ccacaagctg gcacgtgtgg cgcgcattca cttctcacgt 600
 cagaagctgg cggcgtctgg gccgaacctg ccacaacgcc accagttggt ccaacgcttg 660
 atgaattccc cagcgatcga aaaagcgatt gctgatgaag cggccgcgaa gaacatctcg 720
 ctggagaaag cgcgtaaaga agcgcacgac atgcttgatg aaatcgccgc agatttctct 780
 tactcgttgg tgcgcaaagg cgatcgcatt ctgggttggg tatggaaccg catctatcaa 840
 ggcttgaaca tcaataacgc cgcgacggtg cgcgcttgg cacaagatgg tcacgagatt 900
 gtgtatgtgc cctgtcaccg cagccacatg gattacctgt tgctgtcata cgtgttgtat 960
 cacgaaggca tgggtgcccc gcacattgca gcaggtatta acctcaactt cttccccgcc 1020
 ggaccgattt tccgccgtgg tggcgcattc tttattcgtc gcagctttaa aggcaacaaa 1080
 ctctattcaa ccatcttccg cgagtatctg gcagagctgt ttgccaaagg ctactcgggtg 1140
 gagtacttca gtgaaggggg ccgctcacgc acaggtcggc tgctgcaagc caaaaccggc 1200
 atgctggcga tgaccattca agccatggtg cgcggtctca accgcccggg cactctggtg 1260
 cccgtgtaca tcggctatga acatgtgatg gaagtgggta cttacgcaa agagctgcgc 1320

10

ES 2 763 624 T3

ggtaaacgca aagagaaaga gaatgccagc ctagtgctgc gcaccattcg taaactgcg 1380
 aacttcggtc aaggctacgt gaactttggt gagccgattc cattgaacca gttcttgaat 1440
 gagcaagtgc ccgagtggac acaagacatc gatgccatgg gcgccagcaa accccagtgg 1500
 atgacaccgg tggatgaaca gctcgcgacg aagatgatga cgcacattaa cgatgcagcg 1560
 gccgccaatg ccatgaccct atgtgcgacg gcgcttttgg catcgcgtca gcgcgcgctg 1620
 gcccggtgaca atctggtgaa gcagatcgat tgctacctgc aactgctgcg caacgtgccc 1680
 tattccaaca cctataccgt gccaagcgac agcgcggaaa gtttgggtgca gcacgccgaa 1740
 tcaactggata agtttgtggt ggaaaccgac accatggggc acatcatttc gctcgatcgc 1800
 aatcagtcga ttctgatgac ctactaccgc aacaacatca ttcacctgct ggcggtgcca 1860
 tcaactgattg cgcagatgct gatccgtcag caacaaatgc cgggtggaaca gattcagacc 1920
 tgtggtgca aggtgtacc atctctcaa caagagctgt tctcagcca tgatgaaacg 1980
 caactcgatg aggtggtgat gcattatctc gctgagctgc aacgccaaca actggtgacg 2040
 ctggacgatg gcattgccac catcaaccaa gcgcagacgc aggtgctgat gcttctgggt 2100
 cgcaccatct ctgagacgct gcaacgctac gcgatcacgc tcaacctggt ggtggctaac 2160
 cctgagctgg gcaaatccga tctggaaagc aagagccaag aaattgcgca gcgtctgggt 2220
 cgactgcacg gcatcaacgc ccccgagttt ttcgacaaag gcgtgttctc atcgatggtt 2280
 gtcacgctca aacagcaagg ttacctcgc agcgatggca actgccacct cgaccagacc 2340
 aagcacttct cgcgatgct ctacaccatg ctttaccctg aagtgcgcct gactattcag 2400
 gaaagtatct gtcaggtgga ataa 2424

<210> 7
 <211> 2661
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnissii*

5

<400> 7

atgtctgaca tgaagcatga cgtagatgca ctggaaactc aggagtgggt agccgcactt 60
 gagtcagttg tacgtgaaga aggcgtagag cgtgccagat atctactaga agaagtactg 120
 gaaaaagcac gtctagacgg cgttgatag ccaactggta ttacaactaa ctacatcaac 180
 acgattcctg cggcgcaaga accggcatac ccaggcgaca cgaccattga acgtcgtatt 240
 cgttcgatca ttcggttgaa cgcgatcatg atcgttctgc gtgcatcgaa gaaagacctg 300
 gatctggggc gccacatggc atcattccag tcttcagctg cgttctatga aacatgtttc 360
 aaccacttct tccgtgcacc aaacgagaag gacgggtggg acctggttta ctaccaaggt 420
 catatttctc cagggattta cgcgcgtgca ttcggtgaag gccgcctgac agaagaacaa 480
 ctggataact tccgtcaaga agtggatggc aaaggtattc cttcctacc acacccgaaa 540

10

ES 2 763 624 T3

ctgatgcctg aattctggca attcccaact gtatcgatgg gtctgggtcc tatcgcatcg 600
 atctaccaag ctcgcttcct gaaatacctg gaaggccgtg gcatgaaaga cactgctgag 660
 cagcgcgttt acgcgttctt gggcgacggg gagatggatg agccagaatc acgtggtgcc 720
 atttctttcg cggcgcgtga gaaactggac aacctgtgct tcctgatcaa ctgtaacctg 780
 caacgtctgg atggcccagt aatgggtaac ggcaagatca toccaagagct agaaggcctg 840
 ttcaaaggcg ctggctggaa cgtggtgaaa gtgatctggg gtaacaactg ggattctctg 900
 ctggcaaaaag acacttcagg taaattgctg caactgatga acgaaacat cgacggcgac 960
 taccaaactg tcaaagcgaa agatggcgcg tacgttcgtg agcatttctt cggtaaatac 1020
 ccagagacag cagcgtctgt tgctgacatg actgacgacg aagtgttcgc cctgaaactg 1080
 ggtggtcacg agtcttctaa actgtacgca gcgttcaaga acgcacaaga caccaaaggc 1140
 cgtccaaccg ttatcctcgc gaagactgta aaaggttacg gcatgggtga tgcggtcaa 1200
 ggtaagaaca ttgcacacca agtgaagaag atggacatga cgcacgtgat cgcgatgcgt 1260
 aacgtctgg gtctgcaaga cataatttct gatgaagaag tgaacaacct gccttacctg 1320
 aaactggaag aaggttcaaa agaattcgaa tacctgcacg ctcgtcgtaa agcgtgcac 1380
 ggttacacgc cacagcgtct gcctaagttc acacaagagc ttgtgattcc tgaactggaa 1440
 gagttcaaac cgcttctgga agaacagaaa cgtgaaatct cttcaacat ggcttacgtg 1500
 cgtgcactga acattctgtt gaaagacaaa aatattggta agaacatcgt tcctatcatt 1560
 gctgacgaag cacgtacttt cggtatggaa ggtctgttcc gtcaaactcg tatctacaac 1620
 ccacacggcc agacgtacac gcctgaagac cgtggcgtgg tgtcttacta caaagaagac 1680
 actgcaggtc aggtactgca agaagggatc aacgaactgg gtgcaatgtc atcttgggtt 1740
 gcggctgcga catcttacag caccaacaac ctgccaatga ttccgttcta catctactac 1800
 tcaatgttcg gtttccaacg cgttggcgac atggcatgga tggcaggtga ccaacaagcg 1860
 cgtggtttcc tactggcgc aacggctggc cgtacaacc cgaacgggtga aggcctgcag 1920
 cacgaagatg gtcactcaca cattcaagcc gcgacaattc cgaactgtat ctcttacgac 1980
 ccaacattcg cttacgaagt tgcggtgatc atgcaagacg gtatccgtcg tatgtatggc 2040
 gatcaagaga acgtgttcta ctacatgacg ctgatgaacg agaactacgc taccacagcg 2100
 atgccagaag gcgcagaaga aggtatccgt aaaggtatct acaaaactgga aacgtgtct 2160
 ggttctaaag gtaaggttca actgatgagc tcaggtacta tcatgaatga agtacgcaaa 2220
 gcggcagtga tcctgagcga agaatacggc atcgcgtctg atgtttactc tgtaacctca 2280
 ttcaacgaac tggctcgtga tggtcagaac gtcgagcgtt acaacatgct taccacagaa 2340
 gccgaagcgc aagtacctta catcgcttca gtgatgggaa ctgaaccagc aatcgctgca 2400

ES 2 763 624 T3

accgactaca tgaagaacta cgctgaccaa gttcgcgcgt tcattcctgc agagtcttac 2460
 aaagtgctgg gtactgacgg ctteggctgt tcagacagcc gtgagaacct acgtcgtcac 2520
 ttcgaagtga acgcaggcta cgtcgttggt gctgcgctaa acgaactagc gaaacgtggt 2580
 gaagttgaga aatctgtggt ggcggaagct atcaagaaat tcgacatcga cactgaaaaa 2640
 actaaccgcg tatacgctta a 2661

<210> 8
 <211> 1893
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnissii*

5

<400> 8

atggctatcg aaatttacgt accagatata ggtgcagatg aggttgaagt gactgagatt 60
 cttgtcagcg taggcgacaa ggttgaagaa gaacaatctc tgattactgt tgaaggcgac 120
 aaagcttcta tggaagttcc tgcgtctcag gccggatttg tcaaagaaat caaagttgtg 180
 actggtgata aagtcacaac tggctcactg atcatggtgt ttgaagcggg aggtgcagca 240
 gcggctgcac cagcacctgc ggcggaagca gcaccagttg cggcagcacc agcagccggt 300
 gaactgaaag aagttaacgt accggacatc ggcggtgacg aagttgaagt gactgaaatc 360
 atggttgctg tgggtgacac cgtgtctgaa gagcagtcgc tgatcaccgt tgaaggcgac 420
 aaagcgtcaa tggaagtgcc tgcgccattc gcgggtaccg tgaagagat caagatcgca 480
 tcgggtgaca aagtgaccac aggtcactg atcatggtct tcgaagtggc cgttctggt 540
 gcgccagcag cggcagcgcc agctcaggca gcggctccag cagcagcgcc agcggtagca 600
 gcagataaag aagttaacgt gccagatata ggcggcgatg aagttgaagt gactgaaatc 660
 atggttgctg ttggcgacat ggtgagcga gagcaatctc tgatcactgt ggaaggcgac 720
 aaagcgtcga tggaagttcc tgcaccattc gcgggtaaag tgaagcgat caaagtcgag 780
 gctggcgaca aagtgtcgac tggctcactg atcatggtgt ttgaagtggc aggcgcagcg 840
 ccggcagctg tttcagcacc agctcaagcc gcagcacctg cagcagcggc accgaaagct 900
 gaagcgccag cggcagcagc acctgcagcg gcaaccggcg acttccaaga gaacaatgaa 960
 tacgcacacg cgtcgccagt ggttcgtcgc ttagcgcgtg aattcgggtg gaacctgtct 1020
 aaagtgaaag gttcaggtcg taagagccgc attctgaaag aagatgttca gaactacgtg 1080
 aaagaagcgc tgaacgctt agaatcaggc gcagcatcag ccgcatctgg caaaggcgac 1140
 ggcgcagcac ttggcctgct accttgcca aaagtggact tcagcaagtt cggtgacact 1200
 gaaattcagc cactgtctcg cattaagaag atctctggcg cgaacctgca ccgtaactgg 1260
 gtgatgatcc cgcacgtgac ccagtgggat aacgcagaca tcacagaact agaagctttc 1320
 cgtaaagaac agaaccgat cgaagcgaag aaagacactg gcatgaagat cacgccactg 1380

10

ES 2 763 624 T3

gtgtttatca tgaagcggc tgcgaaagcg ctggaagcat tccctgcggt caactcgtct 1440
ctgtctgaag atggtgaaag cctgattctg aagaaatcgc tgaacatcgg tatcgcgggt 1500
gatacaccaa acggtctggt tgttcctgtg ttcaaagacg tgaacaagaa aggcatttac 1560
gagctgtctg aagagttggc agtcgtatcg aagaaagcac gtgcaggtaa actgacggcg 1620
tctgacatgc aaggcggctg tttcaccatc tctagtctgg gtggtatcgg cggtagcagca 1680
ttcacaccaa tctgtaatgc accagaagta ggtattctgg gtgtgtctaa gtctgaaatg 1740
aagccagtgt ggaacggcaa agaatttgcg ccacgtctgc aactgcctct gtctctgtca 1800
tacgaccacc gtgtgatcga tggcgcggaa ggtgcacgct tcatcactta cttgaacggt 1860
tgctgagcgc acattcgtcg tctggttctg taa 1893

5 <210> 9
<211> 951
<212> ADN
<213> *Vibrio furnissii*

10 <400> 9

atgtatagca aaatthtagg tacaggcagc tacctgccat ctcagggtgcg tactaacgcg 60
gatttagaga aaatggtaga tacaagtgat gagtggattg tcacgcgtac tggatttcgc 120
gagcgtcgta ttgccgcaga taatgaaacc gttgccgata tgggctttta cgcggcgcaa 180
aacgctattg agatggcggg cattgataaa aacgacatcg atttaatcat ccttgccacg 240
accagtagca gtcacacggt cccttcgtct gcctgtcagg tgcaagcgaa actgggcatt 300
aaaggttgcc cagcgtttga ccttgccgca gcgtgttctg gttttatcta cggattgtca 360
gtcgcggatc aacacatcaa atcgggcatg tgtaaaaacg tgctggtgat tgggtgccgat 420
gcgttgtcaa aaacgtgtga cccaaccgat cgctcaacca ttatcctggt tgggtgatggt 480
gcgggtgcgg ttgtggttgg tgccagtga gaacctggca ttttgcgac tcatgtttac 540
gctgatggtc aattcggcga cctgctcagc ctggaagtac cagagcgtgg cggatgatgtg 600
gacaaatggc tatatatggc cggcaacgaa gtgttcaaag tggcgggtgac gcagctttca 660
aaactggtca aagacacgct ggcagccaac aatatgcaca agtctgaact agactggttg 720
gtaccgcatc aagcgaacta tgcattatt tctgcgacgg cgaaaaaatt gtcgatgtcg 780
ctggatcaag tgggtgatcac gttggaccgt catgggaaca cgtctgctgc aacgggtgccg 840
acggcactgg acgaagcggg acgtgatggc cggatcaaac ggggtcagac gctactttta 900
gaagcctttg gtggtggttt cacctggggt tctgcgtag tgaagttcta a 951

15 <210> 10
<211> 924
<212> ADN

ES 2 763 624 T3

<213> *Vibrio furnissii*

<400> 10

atgagcaagt ttgctatcgt atttccaggt caaggttctc aagcggttgg tatgcttgcc	60
gagcttggcg aacagtatga cgtagttaa caaactttcg cagaagcgtc tgacgcactg	120
ggttacgacc tatgggcatt ggttcagaac ggtcctggtg aagatctcaa ccagactttc	180
cgtacgcaac ctgcactgct ggcgtcttct gtggcgattt ggcgtgtatg gcaagcgtg	240
ggtcttgagc agccagaagt gctggcaggc cacagccttg gtgaatactc tgcaactggt	300
tgtgccggtg tgattgattt taaagccgcg atcaaattgg tcgaactgcg tgggtcaactg	360
atgcaagaag cagtacctgc aggaaccggc gcaatgtacg cgatcatcgg tttggatgat	420
gcggcgattg ccaaagcgtg tgaagacgct gcgcaaggcg acgtggtgtc tccggtgaac	480
ttcaactcac caggccaagt ggtcattgcc ggtcagaaag atgcggtaga acgcgcgggc	540
gcaactgtgta aagaagcggg cgcgaaacgt gcaactgccac tgccggtgtc agtgccttca	600
caactgcgcg tgatgaaacc tgcagcagaa aaactggctg tggcgctaga agcgttgag	660
ttcaacgcgc cgcaaattcc agtgattaac aacgtggacg ttgcgacaga aacggatcca	720
gcgaaaatca aagatgcggt ggttcgtcaa ctacacagcc cagtccgctg gacagaaggc	780
gtggagaaga tggcagcaca aggcattgaa aaactaattg aagttggccc aggcaaagta	840
ctgactggtt tgactaaacg tattgtgaaa acgcttgatg cagcagcagt gaacgacatc	900
gcttcaactgg aagccgtaa gtaa	924

5

<210> 11

<211> 747

<212> ADN

10

<213> *Vibrio furnissii*

<400> 11

ES 2 763 624 T3

atgagtaatt tcatgaacct ggaaggcaaa attgtcctgg ttactggcgc aagccgtggt 60
atcggtaaag caatcgcgga actattgggt gaacgtggtg ccacagtgat tggtagacgcg 120
accagcgaag gcgggcgaga tgcgatcagt gcgtacctag gcgacaacgg caaaggctcg 180
gcggtgaatg tgacagatgt agcgtctatc gaatccgtgc tgaaaagcat taacgatgaa 240
ttcggcgggtg ttgatattct ggtgaacaac gcgggtatca cgcgtgacaa cctgctgatg 300
cgtatgaaag atgacgagtg gaccgatatt ctggatacca acttgacgtc gatcttccgt 360
ctgtctaaag ctgtacttcg tggcatgatg aaaaaacgcc aaggccgtat cattaatgtc 420
ggttctggtg tcggtacaat gggtaacgcg ggtcaaaca actacgcagc cgcaaaagcg 480
ggcgtaatcg gctttacgaa gtcaatggca cgtgaagttg catcccgtgg cgtgaccgtg 540
aacacagttg caccaggtt catcgaaacg gatatgacaa aagcgtgaa tgacgaccaa 600
cgtgctgcta cacttgaca agtgccagca ggtcgtctgg gtgatccacg tgaaatcgca 660
tccgcgggtg cattcttggc atctccagaa gcagcgtaca ttaccggtga aactctgcac 720

gttaacggcg gaatgtacat ggtttaa 747

5

<210> 12
<211> 525
<212> ADN
<213> *Vibrio furnissii*

<400> 12

gaagtgaacg gaacttggtc ggtaaaatgt tgacttcgtc caaaacttgt caatgaaatg 60
cgcaagatth gtgcatgata tatgtcaaaa atggtgtgaa tttcgggtta aatcgccaaa 120
tttgtgggtt gaccagcaag gtcccccttg caactttcac tagtttgaat aaactacgga 180
atcatcgcac taggcgaaat ctgtaaagga aaagaaaaaa tgagcaacat cgaagaacgc 240
gtaaagaaaa tcatcgttga acagctaggc gtagacgaag cagaagtgaa aaacgaagct 300
tctttcgttg aagacctagg tgcggattct ctagacactg ttgagcttgt tatggctctg 360
gaagaagaat tcgacactga gattcctgat gaagaagcag agaaaatcac tactgttcaa 420
gctgcgatcg attacgtaaa cagcgtcag taatgtctct cccagggcgg ccctctggcc 480
gcctgagttt ttctcaactca totataatct ctcatagaat tttca 525

10

<210> 13
<211> 1251
<212> ADN
<213> *Vibrio furnissii*

<400> 13

15

ES 2 763 624 T3

atgatcgtgt ccaagcgtcg tgtcggtgtc actggcatgg gtatggtgtc accggtaggc 60
 aacactgtag aatcttcttg gaaagccctg ctagctggtc aaagtggat cgtgaatatac 120
 gaacactttg atacaacaaa tttctcaact cgtttcgcag gtctggtaaa agatttcaac 180
 tgccaagagt acatgtctaa aaaagatgcc cgtaaaatgg atttatttat ccagtacggc 240
 attgctgctg gcatccaagc gctagacgat tctggctggtg tgatcactga agaaaacgcg 300
 ccacgcgtcg gtggtgcaat cggctcgggc atcgggtggc ttgatttgat cgaaaaaggc 360
 catcaagcgc ttatggagaa aggtccacgt aaagtgagcc cattcttcgt cccttcaacc 420
 atcgtgaaca tgggtgccg taacttatct atcatgcgtg gtcttcgtgg tcctaacatac 480
 gcgatttcaa ctgcatgtac cacaggttta cataacatcg gccacgcggc gcgtatgatt 540
 gcatacggcg atgcggaagc gatggttgct ggtggtagtg aaaaagcgtc taccctctg 600
 ggtatggctg gcttcggtgc cgctaaagcg ctgtctacac gcaacgatga acctgcaaaa 660
 gcttctcgcc cttgggacaa agaccgtgac ggttttgttc tgggtgacgg cgcaggcgtg 720
 atggttctgg aaggatacga acacgcaaaa gcgcgtggcg cgaaaatcta cgcagaaatac 780
 gtaggcttcg gtatgtccgg tgacgcgtac cacatgactt cgccaagcga agatggttca 840

 ggtggcgcgc tggctatgga agcggcgatg cgtgatgcag cactagcggg tacacaaatac 900
 ggctacgtga acgcgcacgg tacgtcaaca ccagcaggtg acgtagcggg agtgaaaggc 960
 atcaaactg cacttggcga agacgggtgcg aaacaagtac tgatctcttc aaccaaatcg 1020
 atgaccggtc acctactggg tgctgcaggc tcggtagaag ccatcattac cgtgatgtct 1080
 ctggttgacc aaatcgttcc gccaacatc aacctggata atccagaaga aggtttgggc 1140
 gtggatttgg ttccgcacac agcacgtaaa gtggaaggca tggaaatcgc gatgtgtaac 1200
 tcgtttggct ttggtggcac aaacggttca ctgatcttca agcgcgtata a 1251

<210> 14
 <211> 1035
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnissii*

5

<400> 14

ES 2 763 624 T3

atgactgatt cacacacaaa caatgcttac ggtaaagcga tcgccatgac cgtcattggc	60
gcgggttcgt acggcacatc tctggccatt tctttggctc gcaacggcgc caatgttgtc	120
ctgtggggac acgatccggt ccacatggcg cgtttggaag cggaacgtgc taaccacgaa	180
ttcctccctg acatcgattt tccaccgtcg ctgatcattg aatccgattt gcaaaaagcg	240
gtgcaagcga gccgcgatct gctggtggtg gtgccaagcc atgtgtttgc gattgtgctc	300
aacagcctgc aaccttactt gcgagaagat acccgatatct gctgggcaac caaagggttg	360
gaaccggaca caggacgttt gctgcaagat gtggcgcgatg acgtgctggg tgaatcccat	420
ccattggcgg tgctgtctgg cccgacgttt gcgaaagagc tggcgatggg tatgcccact	480
gcgatttcag tggcatcgcc tgacgcgcag tttgtcgccg atctgcagga aaagattcac	540
tgcagcaaaa ccttccgtgt ttatgccaac agcgatttca tcggcatgca actggggggc	600
gctgtgaaga acgtgattgc cattggtgcg gggatgtcgg atggcatcgg ctttggtgcc	660
aacgctcgta cggcgtgat taccggtggt ttggcggaaa tgaccctct gggcgcggcg	720
ctgggcgcgc agccggaaac cttcatgggc atggcggggc tgggtgattt ggtgctgacg	780
tgtaccgata accaatcgcg caaccgtcgt tttggtttgg ccttgggcca aggcaaagat	840
gtcgatacgg cgcaacaaga tatcgggtcaa gtggtggaag ggtatcggaa caccaaagag	900
gtgtggctac tggcgcaacg catgggcgtg gagatgccaa tagttgaaca aatttatcaa	960
gtattgtatc aaggaaagga cgcccgcgatg gcagcacaag atttgctggc gcgcgataaa	1020
aaagcagaac gataa	1035

<210> 15
 <211> 855
 <212> ADN
 <213> *Vibrio furnissii*

5

<400> 15

ES 2 763 624 T3

gtggtgtgtg cgtttgtgaa cgacgatttg agtgcgaccg tgttgaaga actgtatcaa 60
 gggggcactc gcctgatcgc catgcgctgc gcgggctttg ataaagtga ttagacgcc 120
 gcaaaacgca ttggcatgca ggtggttcgc gtacctgctg attcaccaga agcgggtggca 180
 gagcacgagg tcgggttgat gatgtgtctg aaccgccgtt accacaaagc gtatcagcgc 240
 acacgtgagg ccaacttctc gttggaaggc ttggtgggct ttaacttcta tggcaaaacc 300
 gtgggtgtga ttggttcagg caagattggc attgcagcga tgcgtatcct caaaggcctt 360
 ggcatagaaca ttctctgctt tgacctgat gaaaacccat tggccattga aatcggcgcg 420
 aaatacgttc aattgccgga gctgatgca aacagcgaca tcattacgct gactgcccg 480
 atgaccaaag aaaactacca cctgctggat gagcaagcgt tcgctcaaat gaaggatggg 540
 gtgatgatca tcaataccag ccgtggcgaa ttgcttgatt cagtcgcagc cattgaagcg 600
 ctcaaacgtg gccgtattgg cgcgctgggc ttagacgtat acgacaacga aaaagatctg 660
 ttcttccaag acaagtogaa cgatgtgatt gtagatgacg tgttccgccg cctgtccgcc 720
 tgccataacg tgctgtttac cggccatcag gcgtttttga cagaagatgc cctgcacaat 780
 atcgcgcaaa ccacgcttaa caacgtgctg gcgtttgagc aaggcaccaa atctggaaac 840
 gaattagtta actaa 855

<210> 16
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> *Vibrio furnissii*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 16

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

5

10

15

ES 2 763 624 T3

Glu Phe Asp Glu Leu Ala Gly Asp Arg Ala Phe Ala Asp Asp Lys Ala
 85 90 95

Ile Val Gly Gly Met Ala Arg Leu Asp Gly Arg Pro Val Met Val Ile
 100 105 110

Gly His Gln Lys Gly Arg Glu Thr Arg Glu Lys Val Lys Arg Asn Phe
 115 120 125

Gly Met Pro Lys Pro Glu Gly Tyr Arg Lys Ala Leu Arg Leu Met Glu
 130 135 140

Met Ala Glu Arg Phe Asn Met Pro Ile Ile Thr Phe Ile Asp Thr Ala
 145 150 155 160

Gly Ala Tyr Pro Gly Val Gly Ala Glu Glu Arg Gly Gln Ser Glu Ala
 165 170 175

Ile

- <210> 17
- <211> 187
- <212> PRT
- <213> *Vibrio furnissii*

5

<400> 17

Met Asn Ser Leu Cys Arg Gln Pro Phe Ala Arg Cys Lys Gln Ser Lys
 1 5 10 15

Pro Lys His Ser Ala Ala Gln Leu Ser Cys Leu Ile His Lys Ile Lys
 20 25 30

Glu Lys Glu Thr Met Asp Ile Arg Lys Ile Lys Lys Leu Ile Glu Leu
 35 40 45

Val Glu Glu Ser Gly Ile Ala Glu Leu Glu Ile Ser Glu Gly Glu Glu
 50 55 60

Ser Val Arg Ile Ser Arg His Gly Val Ala Pro Val Ala Pro Ile Gln
 65 70 75 80

Tyr Ala Ala Pro Ala Pro Met Ala Ala Pro Val Ala Ala Pro Ala Ala
 85 90 95

Ala Pro Val Ala Glu Ala Pro Ala Ala Ala Lys Thr Pro Ala Gly His
 100 105 110

10

ES 2 763 624 T3

Met Val Leu Ser Pro Met Val Gly Thr Phe Tyr Arg Ser Pro Ser Pro
 115 120 125

Asp Ala Lys Ser Phe Ile Glu Val Gly Gln Thr Val Lys Ala Gly Asp
 130 135 140

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

Asp Lys Ser Gly Val Val Thr Glu Ile Leu Val Glu Asp Gly Gln Ala
 165 170 175

Val Glu Phe Asp Gln Pro Leu Val Val Ile Glu
 180 185

<210> 18
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> *Vibrio furnissii*

5

<400> 18

Met Leu Asp Lys Leu Val Ile Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Leu Arg
 1 5 10 15

Ile Leu Arg Ala Cys Lys Glu Leu Gly Ile Lys Thr Val Ala Val His
 20 25 30

Ser Thr Ala Asp Arg Asp Leu Lys His Val Leu Leu Ala Asp Glu Thr
 35 40 45

Val Cys Ile Gly Pro Ala Lys Gly Ile Asp Ser Tyr Leu Asn Ile Pro
 50 55 60

Arg Ile Ile Ser Ala Ala Glu Val Thr Gly Ala Val Ala Ile His Pro
 65 70 75 80

Gly Tyr Gly Phe Leu Ser Glu Asn Ala Asp Phe Ala Glu Gln Val Glu
 85 90 95

Arg Ser Gly Phe Ile Phe Val Gly Pro Lys Ala Asp Thr Ile Arg Leu
 100 105 110

Met Gly Asp Lys Val Ser Ala Ile Thr Ala Met Lys Lys Ala Gly Val
 115 120 125

Pro Cys Val Pro Gly Ser Asp Gly Pro Leu Asp Asn Asp Glu Val Lys
 130 135 140

10

ES 2 763 624 T3

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

ES 2 763 624 T3

Met Ser Trp Leu Glu Lys Ile Leu Glu Lys Ser Asn Ile Gly Ser Ser
 1 5 10 15

Arg Lys Ala Ser Ile Pro Glu Gly Val Trp Thr Lys Cys Thr Ser Cys
 20 25 30

Glu Gln Val Leu Tyr Tyr Ala Glu Leu Glu Arg Asn Leu Glu Val Cys
 35 40 45

Pro Lys Cys Asn His His Met Arg Met Lys Ala Arg Arg Arg Leu Glu
 50 55 60

Thr Phe Leu Asp Glu Ala Asn Arg Tyr Glu Ile Ala Asp Glu Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Gln Asp Lys Leu Lys Phe Lys Asp Ser Lys Arg Tyr Lys Glu Arg
 85 90 95

Leu Ala Thr Ala Gln Lys Ser Ser Gly Glu Lys Asp Ala Leu Ile Val
 100 105 110

Met Lys Gly Glu Leu Met Thr Ile Pro Val Val Ala Cys Ala Phe Glu
 115 120 125

Phe Ser Phe Met Gly Gly Ser Met Gly Ser Val Val Gly Ala Arg Phe
 130 135 140

Val Arg Ala Val Glu Ala Ala Ile Glu Ala Asn Cys Gly Leu Val Cys
 145 150 155 160

Phe Ser Ala Ser Gly Gly Ala Arg Met Gln Glu Ala Leu Met Ser Leu

ES 2 763 624 T3

				165					170					175			
Met	Gln	Met	Ala	Lys	Thr	Ser	Ala	Ala	Leu	Glu	Arg	Leu	Thr	Ala	Lys		
			180					185					190				
Gly	Leu	Pro	Phe	Ile	Ser	Val	Met	Thr	Asp	Pro	Thr	Met	Gly	Gly	Val		
		195					200					205					
Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Met	Leu	Gly	Asp	Ile	Asn	Ile	Gly	Glu	Pro	Lys		
	210					215					220						
Ala	Leu	Ile	Gly	Phe	Ala	Gly	Arg	Arg	Val	Ile	Glu	Gln	Thr	Val	Arg		
225					230					235					240		
Glu	Glu	Leu	Pro	Glu	Gly	Phe	Gln	Arg	Ser	Glu	Phe	Leu	Leu	Glu	His		
				245					250					255			
Gly	Ala	Ile	Asp	Met	Ile	Val	Asp	Arg	Arg	Glu	Met	Arg	Gln	Arg	Val		
			260					265					270				
Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Lys	Met	Thr	Arg	Gln	Glu	Ser	Pro	Leu	Val	Val		
		275					280					285					
Ser	Val	Asn	Asp	Ala	Pro	Asn	Glu	Ala	Ala	Tyr	Ser	Val	Pro	Glu	Ala		
	290					295					300						
Asn	Lys	Lys	Gly														
			305														

5
 <210> 20
 <211> 814
 <212> PRT
 <213> *Vibrio furnissii*
 <400> 20

ES 2 763 624 T3

Met Asp Ile Leu Leu Ser Ile Leu Gly Phe Val Val Val Leu Ser Gly
1 5 10 15

Cys Leu Tyr His Arg Thr Ser Leu Met Thr Ala Leu Ala Ala Leu Thr
20 25 30

Val Thr Met Leu Val Leu Ser Leu Phe Gly Pro Val Gly Ile Ile Ser
35 40 45

Trp Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Ile Ala Val Leu Ala Val Pro Ser Ile
50 55 60

Arg Gln Ser Leu Ile Ser Gly Lys Thr Leu Lys Val Phe Lys Lys Val

ES 2 763 624 T3

Lys Gly Val Glu Ile Gly Asn Arg His Phe Pro Leu Asn Val Pro Phe
 325 330 335
 Gln Asn Gly Pro Thr Arg Ala Asn Asp Leu Phe Val Pro Leu Asp Phe
 340 345 350
 Ile Ile Gly Gly Pro Ser Met Ala Gly Gln Gly Trp Arg Met Leu Val
 355 360 365
 Glu Cys Leu Ser Val Gly Arg Gly Ile Thr Leu Pro Ser Asn Ser Thr
 370 375 380
 Gly Gly Ile Lys Ala Ala Ala Met Ala Thr Gly Ala Tyr Ala Arg Ile
 385 390 395 400
 Arg Arg Gln Phe Lys Gln Pro Ile Gly His Met Glu Gly Ile Glu Glu
 405 410 415
 Pro Leu Ala Arg Leu Ala Gly Asn Ala Tyr Val Met Asp Ala Ala Ser
 420 425 430
 Asn Leu Thr Val Ala Gly Ile Asp Ala Gly Glu Lys Pro Ser Val Ile
 435 440 445
 Ser Ala Ile Val Lys Tyr His Cys Thr His Arg Gly Gln Arg Ser Ile
 450 455 460
 Ile Asp Ala Met Asp Ile Val Gly Gly Lys Gly Ile Cys Leu Gly Pro
 465 470 475 480
 Ser Asn Phe Leu Ala Arg Gly Tyr Gln Gly Ser Pro Ile Ala Ile Thr
 485 490 495
 Val Glu Gly Ala Asn Ile Leu Thr Arg Ser Met Ile Ile Phe Gly Gln
 500 505 510
 Gly Ala Ile Arg Cys His Pro Tyr Val Leu Lys Glu Met Glu Ala Ala
 515 520 525
 Tyr Ser Asp Ser Ala Asn Ala Val Glu Gln Phe Asp Ala Ala Leu Ala
 530 535 540
 Gly His Val Ser Phe Thr Met Ser Asn Leu Val Arg Cys Ile Trp Phe
 545 550 555 560
 Gly Leu Thr Asp Gly Leu Gly Ser Ala Ala Pro Thr Lys Asp Ala Thr
 565 570 575

ES 2 763 624 T3

Lys Arg Tyr Tyr Gln Gln Leu Asn Arg Tyr Ser Ala Asn Leu Ala Leu
580 585 590

Leu Ala Asp Ile Ser Met Ala Val Leu Gly Gly Ser Leu Lys Arg Lys
595 600 605

Glu Arg Leu Ser Ala Arg Leu Gly Asp Ile Leu Ser Gln Leu Tyr Leu
610 615 620

Ser Ser Ala Thr Leu Lys Arg Phe Glu Asn Asp Gly Arg Pro Ala Glu
625 630 635 640

Asp Leu Ala Leu Val His Trp Gly Leu Gln Asp Ser Leu Lys Gln Thr
645 650 655

Glu Val Ala Ile Asp Glu Phe Leu Ala Asn Phe Pro Asn Lys Val Ile
660 665 670

Gly Lys Ala Leu Arg Val Leu Ile Met Pro Phe Gly Arg Val Arg Lys
675 680 685

Ala Pro Asn Asp Lys Leu Asp Ser Lys Val Ala Gln Ile Ile Gln Thr
690 695 700

Pro Ser Ala Thr Arg Ser Arg Ile Gly Arg His Gln Tyr Leu Glu Pro
705 710 715 720

Thr Ala His Asn Ala Val Gly Lys Ile Glu Leu Ala Leu Asn Val Ile
725 730 735

Leu Gln Ala Glu Pro Val Phe Asp Lys Val Cys Lys Ala Leu Asn Glu
740 745 750

Arg Arg Pro Phe Thr Gln Leu Asp Gln Val Ala Gln Cys Gly Leu Glu
755 760 765

Gln Lys Leu Ile Thr Glu Gln Glu Ala Glu Leu Leu Ile Glu Ala Glu
770 775 780

Gln His Arg Leu Tyr Thr Ile Asn Val Asp Asp Phe Ala Pro Gln Glu
785 790 795 800

Leu Ala Ala Lys Lys Ser Gln Pro Lys Leu Val Glu Val Ala
805 810

<210> 21
<211> 807
<212> PRT
<213> *Vibrio furnissii*

ES 2 763 624 T3

<400> 21

Met Ser Ser Gly His Ser Phe Ser Arg Ser Leu Leu Lys Leu Pro Leu
 1 5 10 15

Ser Val Leu Val Lys Gly Thr Val Ile Pro Ser Asn Pro Ile Asp Asp
 20 25 30

Leu Glu Ile Asp Ile Asn Lys Pro Ile Val Tyr Ala Leu Pro Phe Arg
 35 40 45

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

Leu Pro Asp Pro Leu Glu Pro Leu Thr Ile His Ser His Thr Leu Lys
 65 70 75 80

Arg Tyr Val Phe Ile Ser Ser Arg Pro Thr Leu Leu Gln Asp Asp Asn
 85 90 95

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

His Gln Glu Asp Ser Glu Leu Asp Val Gln Val Ile Pro Ala Thr Val
 115 120 125

Leu Trp Gly Arg Lys Pro Gly Lys Glu Gly Arg Glu Arg Pro Tyr Leu
 130 135 140

Gln Ala Leu Asn Gly Pro Gln Lys Ala Lys Ala Val Phe Ala Ala Gly
 145 150 155 160

Arg Asp Cys Leu Val Arg Phe Ser Pro Val Val Ser Leu Arg Tyr Met
 165 170 175

Ala Asp Ser His Gly Thr Asp Ala Ser Ile Ala His Lys Leu Ala Arg
 180 185 190

Val Ala Arg Ile His Phe Ser Arg Gln Lys Leu Ala Ala Ser Gly Pro
 195 200 205

Asn Leu Pro Gln Arg His Gln Leu Phe Gln Arg Leu Met Asn Ser Pro
 210 215 220

Ala Ile Glu Lys Ala Ile Ala Asp Glu Ala Ala Ala Lys Asn Ile Ser
 225 230 235 240

ES 2 763 624 T3

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

ES 2 763 624 T3

				485						490					495
Lys	Pro	Gln	Trp	Met	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Lys	Leu	Ala	Thr	Lys	Met
			500					505					510		
Met	Thr	His	Ile	Asn	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Ala	Met	Thr	Leu	Cys
		515					520					525			
Ala	Thr	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Arg	Gln	Arg	Ala	Leu	Ala	Arg	Asp	Asn
	530					535					540				
Leu	Val	Lys	Gln	Ile	Asp	Cys	Tyr	Leu	Gln	Leu	Leu	Arg	Asn	Val	Pro
545					550					555					560
Tyr	Ser	Asn	Thr	Tyr	Thr	Val	Pro	Ser	Asp	Ser	Ala	Glu	Ser	Leu	Val
				565					570					575	
Gln	His	Ala	Glu	Ser	Leu	Asp	Lys	Phe	Val	Val	Glu	Thr	Asp	Thr	Met
			580					585					590		
Gly	Asp	Ile	Ile	Ser	Leu	Asp	Arg	Asn	Gln	Ser	Ile	Leu	Met	Thr	Tyr
		595					600					605			
Tyr	Arg	Asn	Asn	Ile	Ile	His	Leu	Leu	Ala	Leu	Pro	Ser	Leu	Ile	Ala
	610					615					620				
Gln	Met	Leu	Ile	Arg	Gln	Gln	Gln	Met	Pro	Val	Glu	Gln	Ile	Gln	Thr
625					630					635					640
Cys	Val	Ala	Lys	Val	Tyr	Pro	Phe	Leu	Lys	Gln	Glu	Leu	Phe	Leu	Ser
				645					650					655	
His	Asp	Glu	Thr	Gln	Leu	Asp	Glu	Val	Val	Met	His	Tyr	Leu	Ala	Glu
			660					665					670		
Leu	Gln	Arg	Gln	Gln	Leu	Val	Thr	Leu	Asp	Asp	Gly	Ile	Ala	Thr	Ile
		675					680					685			
Asn	Gln	Ala	Gln	Thr	Gln	Val	Leu	Met	Leu	Leu	Gly	Arg	Thr	Ile	Ser
	690					695					700				
Glu	Thr	Leu	Gln	Arg	Tyr	Ala	Ile	Thr	Leu	Asn	Leu	Leu	Val	Ala	Asn
705					710					715					720
Pro	Glu	Leu	Gly	Lys	Ser	Asp	Leu	Glu	Ser	Lys	Ser	Gln	Glu	Ile	Ala
				725					730					735	

ES 2 763 624 T3

Gln Arg Leu Gly Arg Leu His Gly Ile Asn Ala Pro Glu Phe Phe Asp
 740 745 750

Lys Gly Val Phe Ser Ser Met Phe Val Thr Leu Lys Gln Gln Gly Tyr
 755 760 765

Leu Asp Ser Asp Gly Asn Cys His Leu Asp Gln Thr Lys His Phe Ser
 770 775 780

Arg Met Leu Tyr Thr Met Leu Tyr Pro Glu Val Arg Leu Thr Ile Gln
 785 790 795 800

Glu Ser Ile Cys Gln Val Glu
 805

5 <210> 22
 <211> 886
 <212> PRT
 <213> *Vibrio furnissii*
 <400> 22

Met Ser Asp Met Lys His Asp Val Asp Ala Leu Glu Thr Gln Glu Trp
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Leu Glu Ser Val Val Arg Glu Glu Gly Val Glu Arg Ala
 20 25 30

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

Asp Met Pro Thr Gly Ile Thr Thr Asn Tyr Ile Asn Thr Ile Pro Ala
 50 55 60

Ala Gln Glu Pro Ala Tyr Pro Gly Asp Thr Thr Ile Glu Arg Arg Ile
 65 70 75 80

Arg Ser Ile Ile Arg Trp Asn Ala Ile Met Ile Val Leu Arg Ala Ser
 85 90 95

Lys Lys Asp Leu Asp Leu Gly Gly His Met Ala Ser Phe Gln Ser Ser
 100 105 110

Ala Ala Phe Tyr Glu Thr Cys Phe Asn His Phe Phe Arg Ala Pro Asn
 115 120 125

Glu Lys Asp Gly Gly Asp Leu Val Tyr Tyr Gln Gly His Ile Ser Pro
 130 135 140

10

ES 2 763 624 T3

Gly Ile Tyr Ala Arg Ala Phe Val Glu Gly Arg Leu Thr Glu Glu Gln
145 150 155 160

Leu Asp Asn Phe Arg Gln Glu Val Asp Gly Lys Gly Ile Pro Ser Tyr
165 170 175

Pro His Pro Lys Leu Met Pro Glu Phe Trp Gln Phe Pro Thr Val Ser
180 185 190

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

Tyr Leu Glu Gly Arg Gly Met Lys Asp Thr Ala Glu Gln Arg Val Tyr
210 215 220

Ala Phe Leu Gly Asp Gly Glu Met Asp Glu Pro Glu Ser Arg Gly Ala
225 230 235 240

Ile Ser Phe Ala Ala Arg Glu Lys Leu Asp Asn Leu Cys Phe Leu Ile
245 250 255

Asn Cys Asn Leu Gln Arg Leu Asp Gly Pro Val Met Gly Asn Gly Lys
260 265 270

Ile Ile Gln Glu Leu Glu Gly Leu Phe Lys Gly Ala Gly Trp Asn Val
275 280 285

Val Lys Val Ile Trp Gly Asn Asn Trp Asp Ser Leu Leu Ala Lys Asp
290 295 300

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

Tyr Gln Thr Phe Lys Ala Lys Asp Gly Ala Tyr Val Arg Glu His Phe
325 330 335

Phe Gly Lys Tyr Pro Glu Thr Ala Ala Leu Val Ala Asp Met Thr Asp
340 345 350

Asp Glu Val Phe Ala Leu Lys Arg Gly Gly His Glu Ser Ser Lys Leu
355 360 365

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

Ile Leu Ala Lys Thr Val Lys Gly Tyr Gly Met Gly Asp Ala Ala Gln
385 390 395 400

ES 2 763 624 T3

Gly Lys Asn Ile Ala His Gln Val Lys Lys Met Asp Met Thr His Val
 405 410 415

Ile Ala Met Arg Asn Arg Leu Gly Leu Gln Asp Ile Ile Ser Asp Glu
 420 425 430

Glu Val Asn Asn Leu Pro Tyr Leu Lys Leu Glu Glu Gly Ser Lys Glu
 435 440 445

Phe Glu Tyr Leu His Ala Arg Arg Lys Ala Leu His Gly Tyr Thr Pro
 450 455 460

Gln Arg Leu Pro Lys Phe Thr Gln Glu Leu Val Ile Pro Glu Leu Glu
 465 470 475 480

Glu Phe Lys Pro Leu Leu Glu Glu Gln Lys Arg Glu Ile Ser Ser Thr
 485 490 495

Met Ala Tyr Val Arg Ala Leu Asn Ile Leu Leu Lys Asp Lys Asn Ile
 500 505 510

Gly Lys Asn Ile Val Pro Ile Ile Ala Asp Glu Ala Arg Thr Phe Gly
 515 520 525

Met Glu Gly Leu Phe Arg Gln Ile Gly Ile Tyr Asn Pro His Gly Gln
 530 535 540

Thr Tyr Thr Pro Glu Asp Arg Gly Val Val Ser Tyr Tyr Lys Glu Asp
 545 550 555 560

Thr Ala Gly Gln Val Leu Gln Glu Gly Ile Asn Glu Leu Gly Ala Met
 565 570 575

Ser Ser Trp Val Ala Ala Ala Thr Ser Tyr Ser Thr Asn Asn Leu Pro
 580 585 590

Met Ile Pro Phe Tyr Ile Tyr Tyr Ser Met Phe Gly Phe Gln Arg Val
 595 600 605

Gly Asp Met Ala Trp Met Ala Gly Asp Gln Gln Ala Arg Gly Phe Leu
 610 615 620

Leu Gly Ala Thr Ala Gly Arg Thr Thr Leu Asn Gly Glu Gly Leu Gln
 625 630 635 640

His Glu Asp Gly His Ser His Ile Gln Ala Ala Thr Ile Pro Asn Cys
 645 650 655

ES 2 763 624 T3

Ile Ser Tyr Asp Pro Thr Phe Ala Tyr Glu Val Ala Val Ile Met Gln
660 665 670

Asp Gly Ile Arg Arg Met Tyr Gly Asp Gln Glu Asn Val Phe Tyr Tyr
675 680 685

Met Thr Leu Met Asn Glu Asn Tyr Ala His Pro Ala Met Pro Glu Gly
690 695 700

Ala Glu Glu Gly Ile Arg Lys Gly Ile Tyr Lys Leu Glu Thr Leu Ser
705 710 715 720

Gly Ser Lys Gly Lys Val Gln Leu Met Ser Ser Gly Thr Ile Met Asn
725 730 735

Glu Val Arg Lys Ala Ala Val Ile Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Ile Ala
740 745 750

Ser Asp Val Tyr Ser Val Thr Ser Phe Asn Glu Leu Ala Arg Asp Gly
755 760 765

Gln Asn Val Glu Arg Tyr Asn Met Leu His Pro Glu Ala Glu Ala Gln
770 775 780

Val Pro Tyr Ile Ala Ser Val Met Gly Thr Glu Pro Ala Ile Ala Ala
785 790 795 800

Thr Asp Tyr Met Lys Asn Tyr Ala Asp Gln Val Arg Ala Phe Ile Pro
805 810 815

Ala Glu Ser Tyr Lys Val Leu Gly Thr Asp Gly Phe Gly Arg Ser Asp
820 825 830

Ser Arg Glu Asn Leu Arg Arg His Phe Glu Val Asn Ala Gly Tyr Val
835 840 845

Val Val Ala Ala Leu Asn Glu Leu Ala Lys Arg Gly Glu Val Glu Lys
850 855 860

Ser Val Val Ala Glu Ala Ile Lys Lys Phe Asp Ile Asp Thr Glu Lys
865 870 875 880

Thr Asn Pro Leu Tyr Ala
885

<210> 23
<211> 630
<212> PRT
<213> *Vibrio furnissii*

ES 2 763 624 T3

<400> 23

Met Ala Ile Glu Ile Tyr Val Pro Asp Ile Gly Ala Asp Glu Val Glu
 1 5 10 15

Val Thr Glu Ile Leu Val Ser Val Gly Asp Lys Val Glu Glu Glu Gln
 20 25 30

Ser Leu Ile Thr Val Glu Gly Asp Lys Ala Ser Met Glu Val Pro Ala
 35 40 45

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

Val Thr Thr Gly Ser Leu Ile Met Val Phe Glu Ala Glu Gly Ala Ala
 65 70 75 80

Ala Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ala Glu Ala Ala Pro Val Ala Ala Ala
 85 90 95

Pro Ala Ala Val Glu Leu Lys Glu Val Asn Val Pro Asp Ile Gly Gly
 100 105 110

Asp Glu Val Glu Val Thr Glu Ile Met Val Ala Val Gly Asp Thr Val
 115 120 125

Ser Glu Glu Gln Ser Leu Ile Thr Val Glu Gly Asp Lys Ala Ser Met
 130 135 140

Glu Val Pro Ala Pro Phe Ala Gly Thr Val Lys Glu Ile Lys Ile Ala
 145 150 155 160

Ser Gly Asp Lys Val Thr Thr Gly Ser Leu Ile Met Val Phe Glu Val
 165 170 175

Ala Gly Ser Gly Ala Pro Ala Ala Ala Ala Pro Ala Gln Ala Ala Ala
 180 185 190

Pro Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala Ala Asp Lys Glu Val Asn Val Pro
 195 200 205

Asp Ile Gly Gly Asp Glu Val Glu Val Thr Glu Ile Met Val Ala Val
 210 215 220

Gly Asp Met Val Ser Glu Glu Gln Ser Leu Ile Thr Val Glu Gly Asp

ES 2 763 624 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Arg Arg Leu Val Leu
 625 630

<210> 24
 <211> 316
 5 <212> PRT
 <213> *Vibrio furnissii*

<400> 24

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

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

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

Glu Thr Val Ala Asp Met Gly Phe Tyr Ala Ala Gln Asn Ala Ile Glu
 50 55 60

10

ES 2 763 624 T3

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

Thr Ser Ser Ser His Thr Phe Pro Ser Ser Ala Cys Gln Val Gln Ala
85 90 95

Lys Leu Gly Ile Lys Gly Cys Pro Ala Phe Asp Leu Ala Ala Ala Cys
100 105 110

Ser Gly Phe Ile Tyr Gly Leu Ser Val Ala Asp Gln His Ile Lys Ser
115 120 125

Gly Met Cys Lys Asn Val Leu Val Ile Gly Ala Asp Ala Leu Ser Lys
130 135 140

Thr Cys Asp Pro Thr Asp Arg Ser Thr Ile Ile Leu Phe Gly Asp Gly
145 150 155 160

Ala Gly Ala Val Val Val Gly Ala Ser Glu Glu Pro Gly Ile Leu Ser
165 170 175

Thr His Val Tyr Ala Asp Gly Gln Phe Gly Asp Leu Leu Ser Leu Glu
180 185 190

Val Pro Glu Arg Gly Gly Asp Val Asp Lys Trp Leu Tyr Met Ala Gly
195 200 205

Asn Glu Val Phe Lys Val Ala Val Thr Gln Leu Ser Lys Leu Val Lys
210 215 220

Asp Thr Leu Ala Ala Asn Asn Met His Lys Ser Glu Leu Asp Trp Leu
225 230 235 240

Val Pro His Gln Ala Asn Tyr Arg Ile Ile Ser Ala Thr Ala Lys Lys
245 250 255

Leu Ser Met Ser Leu Asp Gln Val Val Ile Thr Leu Asp Arg His Gly
260 265 270

Asn Thr Ser Ala Ala Thr Val Pro Thr Ala Leu Asp Glu Ala Val Arg
275 280 285

Asp Gly Arg Ile Lys Arg Gly Gln Thr Leu Leu Leu Glu Ala Phe Gly
290 295 300

Gly Gly Phe Thr Trp Gly Ser Ala Leu Val Lys Phe
305 310 315

<210> 25
<211> 307

ES 2 763 624 T3

<212> PRT
 <213> *Vibrio furnissii*

<400> 25

5

Met Ser Lys Phe Ala Ile Val Phe Pro Gly Gln Gly Ser Gln Ala Val
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 763 624 T3

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

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

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

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

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

Ala Val Lys
305

<210> 26
<211> 248
<212> PRT
<213> *Vibrio furnissii*

5

<400> 26

Met Ser Asn Phe Met Asn Leu Glu Gly Lys Ile Val Leu Val Thr Gly
1 5 10 15

Ala Ser Arg Gly Ile Gly Lys Ala Ile Ala Glu Leu Leu Val Glu Arg
20 25 30

Gly Ala Thr Val Ile Gly Thr Ala Thr Ser Glu Ser Gly Ala Asp Ala
35 40 45

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

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

Phe Gly Gly Val Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp
85 90 95

Asn Leu Leu Met Arg Met Lys Asp Asp Glu Trp Thr Asp Ile Leu Asp
100 105 110

Thr Asn Leu Thr Ser Ile Phe Arg Leu Ser Lys Ala Val Leu Arg Gly
115 120 125

10

ES 2 763 624 T3

Met Met Lys Lys Arg Gln Gly Arg Ile Ile Asn Val Gly Ser Val Val
130 135 140

Gly Thr Met Gly Asn Ala Gly Gln Thr Asn Tyr Ala Ala Ala Lys Ala
145 150 155 160

Gly Val Ile Gly Phe Thr Lys Ser Met Ala Arg Glu Val Ala Ser Arg
165 170 175

Gly Val Thr Val Asn Thr Val Ala Pro Gly Phe Ile Glu Thr Asp Met
180 185 190

Thr Lys Ala Leu Asn Asp Asp Gln Arg Ala Ala Thr Leu Ala Gln Val
195 200 205

Pro Ala Gly Arg Leu Gly Asp Pro Arg Glu Ile Ala Ser Ala Val Ala
210 215 220

Phe Leu Ala Ser Pro Glu Ala Ala Tyr Ile Thr Gly Glu Thr Leu His
225 230 235 240

Val Asn Gly Gly Met Tyr Met Val
245

<210> 27
<211> 77
5 <212> PRT
<213> *Vibrio furnissii*

<400> 27

Met Ser Asn Ile Glu Glu Arg Val Lys Lys Ile Ile Val Glu Gln Leu
1 5 10 15

Gly Val Asp Glu Ala Glu Val Lys Asn Glu Ala Ser Phe Val Glu Asp
20 25 30

Leu Gly Ala Asp Ser Leu Asp Thr Val Glu Leu Val Met Ala Leu Glu
35 40 45

Glu Glu Phe Asp Thr Glu Ile Pro Asp Glu Glu Ala Glu Lys Ile Thr
50 55 60

Thr Val Gln Ala Ala Ile Asp Tyr Val Asn Ser Ala Gln
65 70 75

10

<210> 28
<211> 416
<212> PRT
15 <213> *Vibrio furnissii*

<400> 28

ES 2 763 624 T3

Met Ile Val Ser Lys Arg Arg Val Val Val Thr Gly Met Gly Met Leu
1 5 10 15

Ser Pro Val Gly Asn Thr Val Glu Ser Ser Trp Lys Ala Leu Leu Ala
20 25 30

Gly Gln Ser Gly Ile Val Asn Ile Glu His Phe Asp Thr Thr Asn Phe
35 40 45

Ser Thr Arg Phe Ala Gly Leu Val Lys Asp Phe Asn Cys Glu Glu Tyr
50 55 60

Met Ser Lys Lys Asp Ala Arg Lys Met Asp Leu Phe Ile Gln Tyr Gly
65 70 75 80

Ile Ala Ala Gly Ile Gln Ala Leu Asp Asp Ser Gly Leu Val Ile Thr
85 90 95

Glu Glu Asn Ala Pro Arg Val Gly Val Ala Ile Gly Ser Gly Ile Gly
100 105 110

Gly Leu Asp Leu Ile Glu Lys Gly His Gln Ala Leu Met Glu Lys Gly
115 120 125

Pro Arg Lys Val Ser Pro Phe Phe Val Pro Ser Thr Ile Val Asn Met
130 135 140

Val Ala Gly Asn Leu Ser Ile Met Arg Gly Leu Arg Gly Pro Asn Ile
145 150 155 160

Ala Ile Ser Thr Ala Cys Thr Thr Gly Leu His Asn Ile Gly His Ala
165 170 175

Ala Arg Met Ile Ala Tyr Gly Asp Ala Glu Ala Met Val Ala Gly Gly
180 185 190

Ser Glu Lys Ala Ser Thr Pro Leu Gly Met Ala Gly Phe Gly Ala Ala
195 200 205

Lys Ala Leu Ser Thr Arg Asn Asp Glu Pro Ala Lys Ala Ser Arg Pro
210 215 220

Trp Asp Lys Asp Arg Asp Gly Phe Val Leu Gly Asp Gly Ala Gly Val
225 230 235 240

ES 2 763 624 T3

Met Val Leu Glu Gly Tyr Glu His Ala Lys Ala Arg Gly Ala Lys Ile
 245 250 255

Tyr Ala Glu Ile Val Gly Phe Gly Met Ser Gly Asp Ala Tyr His Met
 260 265 270

Thr Ser Pro Ser Glu Asp Gly Ser Gly Gly Ala Leu Ala Met Glu Ala
 275 280 285

Ala Met Arg Asp Ala Ala Leu Ala Gly Thr Gln Ile Gly Tyr Val Asn
 290 295 300

Ala His Gly Thr Ser Thr Pro Ala Gly Asp Val Ala Glu Val Lys Gly
 305 310 315 320

Ile Lys Arg Ala Leu Gly Glu Asp Gly Ala Lys Gln Val Leu Ile Ser
 325 330 335

Ser Thr Lys Ser Met Thr Gly His Leu Leu Gly Ala Ala Gly Ser Val
 340 345 350

Glu Ala Ile Ile Thr Val Met Ser Leu Val Asp Gln Ile Val Pro Pro
 355 360 365

Thr Ile Asn Leu Asp Asn Pro Glu Glu Gly Leu Gly Val Asp Leu Val
 370 375 380

Pro His Thr Ala Arg Lys Val Glu Gly Met Glu Tyr Ala Met Cys Asn
 385 390 395 400

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

- <210> 29
- <211> 344
- <212> PRT
- <213> *Vibrio furnissii*
- <400> 29

5

Met Thr Asp Ser His Thr Asn Asn Ala Tyr Gly Lys Ala Ile Ala Met
 1 5 10 15

Thr Val Ile Gly Ala Gly Ser Tyr Gly Thr Ser Leu Ala Ile Ser Leu
 20 25 30

Ala Arg Asn Gly Ala Asn Val Val Leu Trp Gly His Asp Pro Val His
 35 40 45

10

ES 2 763 624 T3

Met Ala Arg Leu Glu Ala Glu Arg Ala Asn His Glu Phe Leu Pro Asp
50 55 60

Ile Asp Phe Pro Pro Ser Leu Ile Ile Glu Ser Asp Leu Gln Lys Ala
65 70 75 80

Val Gln Ala Ser Arg Asp Leu Leu Val Val Val Pro Ser His Val Phe
85 90 95

Ala Ile Val Leu Asn Ser Leu Gln Pro Tyr Leu Arg Glu Asp Thr Arg
100 105 110

Ile Cys Trp Ala Thr Lys Gly Leu Glu Pro Asp Thr Gly Arg Leu Leu
115 120 125

Gln Asp Val Ala His Asp Val Leu Gly Glu Ser His Pro Leu Ala Val
130 135 140

Leu Ser Gly Pro Thr Phe Ala Lys Glu Leu Ala Met Gly Met Pro Thr
145 150 155 160

Ala Ile Ser Val Ala Ser Pro Asp Ala Gln Phe Val Ala Asp Leu Gln
165 170 175

Glu Lys Ile His Cys Ser Lys Thr Phe Arg Val Tyr Ala Asn Ser Asp
180 185 190

Phe Ile Gly Met Gln Leu Gly Gly Ala Val Lys Asn Val Ile Ala Ile
195 200 205

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

Ala Leu Ile Thr Arg Gly Leu Ala Glu Met Thr Arg Leu Gly Ala Ala
225 230 235 240

Leu Gly Ala Gln Pro Glu Thr Phe Met Gly Met Ala Gly Leu Gly Asp
245 250 255

Leu Val Leu Thr Cys Thr Asp Asn Gln Ser Arg Asn Arg Arg Phe Gly
260 265 270

Leu Ala Leu Gly Gln Gly Lys Asp Val Asp Thr Ala Gln Gln Asp Ile
275 280 285

Gly Gln Val Val Glu Gly Tyr Arg Asn Thr Lys Glu Val Trp Leu Leu
290 295 300

ES 2 763 624 T3

Ala Gln Arg Met Gly Val Glu Met Pro Ile Val Glu Gln Ile Tyr Gln
305 310 315 320

Val Leu Tyr Gln Gly Lys Asp Ala Arg Met Ala Ala Gln Asp Leu Leu
325 330 335

Ala Arg Asp Lys Lys Ala Glu Arg
340

<210> 30

<211> 284

5 <212> PRT

<213> *Vibrio furnissii*

<400> 30

ES 2 763 624 T3

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

ES 2 763 624 T3

Met Lys Asp Gly Val Met Ile Ile Asn Thr Ser Arg Gly Glu Leu Leu
180 185 190

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

Leu Gly Leu Asp Val Tyr Asp Asn Glu Lys Asp Leu Phe Phe Gln Asp
210 215 220

Lys Ser Asn Asp Val Ile Val Asp Asp Val Phe Arg Arg Leu Ser Ala
225 230 235 240

Cys His Asn Val Leu Phe Thr Gly His Gln Ala Phe Leu Thr Glu Asp
245 250 255

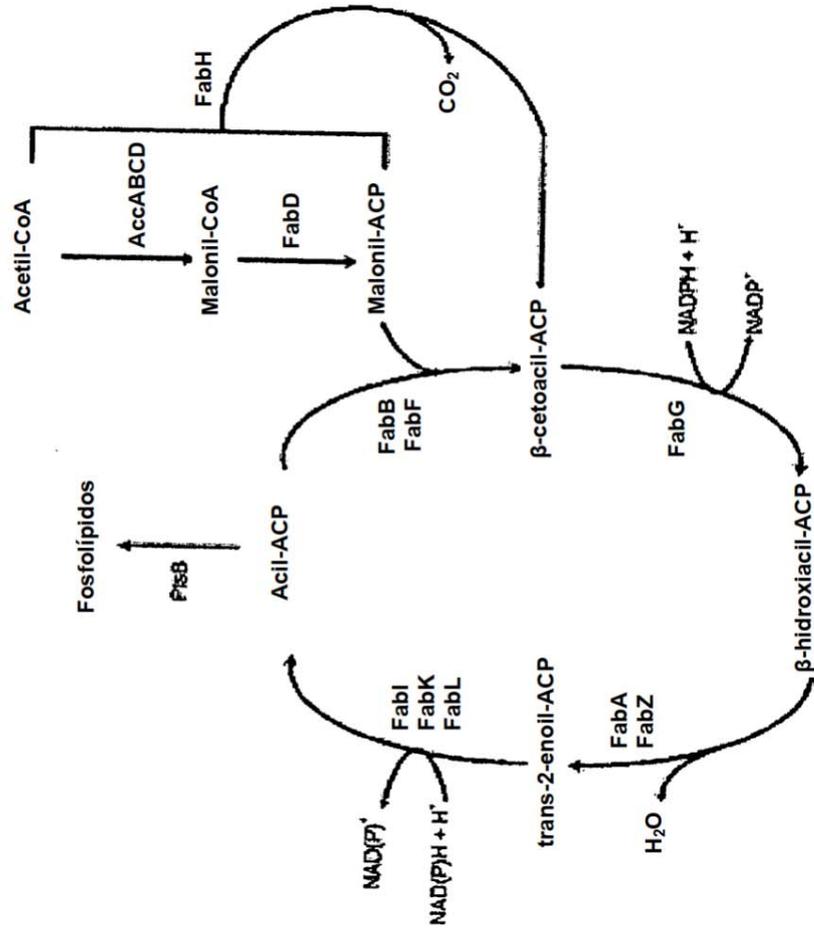
Ala Leu His Asn Ile Ala Gln Thr Thr Leu Asn Asn Val Leu Ala Phe
260 265 270

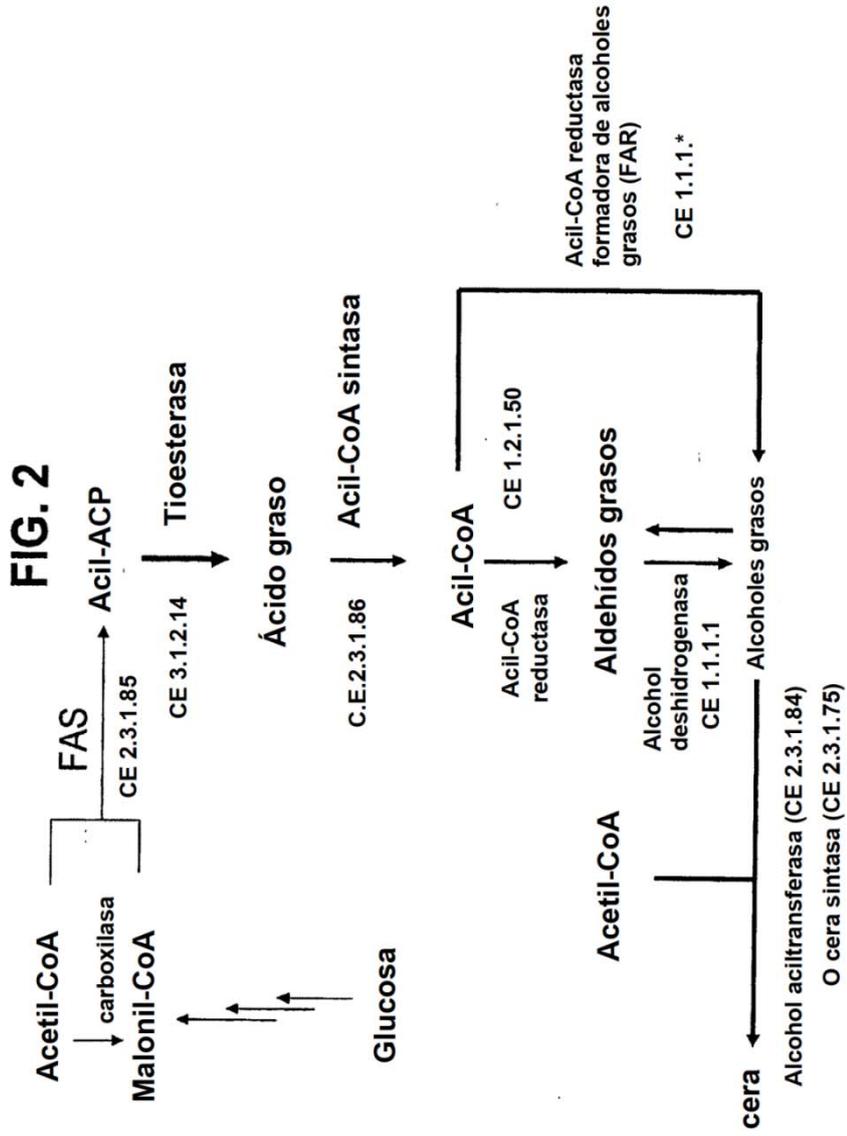
Glu Gln Gly Thr Lys Ser Gly Asn Glu Leu Val Asn
275 280

REIVINDICACIONES

1. Una célula de *E. coli* recombinante que comprende una o más secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican al menos una enzima de una ruta biosintética de alcohol graso para su uso en la producción de un alcohol graso, en donde el alcohol graso se libera de la célula al medio de cultivo a una relación 1: 1 de producto intracelular a producto extracelular, y en donde la una o más secuencias de ácido nucleico exógeno están sobreexpresadas.
2. La célula de *E. coli* recombinante la reivindicación 1, en donde la enzima se selecciona del grupo que consiste en una acetil-CoA carboxilasa de C.E. 6.4.1.2, una tioesterasa de CE 3.1.2.14, una acil-CoA sintasa de CE 2.3.1.86, una acil-CoA reductasa formadora de alcohol graso de CE 1.1.1.*, una acil-CoA reductasa de 1.2.1.50, una alcohol deshidrogenasa de CE 1.1.1.1 y una enzima FAS de CE 2.3.1.85.
3. Un medio de cultivo que comprende la célula de *E. coli* recombinante de la reivindicación 1.
4. El medio de cultivo de la reivindicación 3, que comprende además un alcohol graso que es producido por la célula de *E. coli* recombinante de la reivindicación 1.
5. El medio de cultivo de la reivindicación 4, en donde el derivado de ácido graso comprende de 1 a 5 enlaces dobles.
6. El medio de cultivo de la reivindicación 4, en donde el derivado de ácido graso comprende una longitud de cadena de carbono de 8 a 30.
7. El medio de cultivo de la reivindicación 4, en donde el derivado de ácido graso comprende de 1 a 5 puntos de ramificación.
8. Uso de una célula de *E. coli* recombinante que comprende una o más secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican al menos un polipéptido de una ruta biosintética de alcohol graso para la producción de un alcohol graso, en donde el alcohol graso se libera de la célula al medio de cultivo a una relación 1: 1 de producto intracelular a producto extracelular, y en donde la una o más secuencias de ácido nucleico exógeno están sobreexpresadas.
9. Un método para producir un alcohol graso que comprende cultivar una célula de *E. coli* recombinante que comprende una o más secuencias de ácido nucleico exógeno que codifican al menos un polipéptido de una ruta biosintética de alcohol graso, en donde el derivado de ácido graso se libera de la célula al medio de cultivo a una proporción 1: 1 de producto intracelular a producto extracelular, y en donde la una o más secuencias de ácido nucleico exógeno están sobreexpresadas.
10. El uso de la reivindicación 8, o el método de la reivindicación 9, en donde la enzima se selecciona del grupo que consiste en una acetil-CoA carboxilasa de C.E. 6.4.1.2, una tioesterasa de CE 3.1.2.14, una acil-CoA sintasa de CE 2.3.1.86, una acil-CoA reductasa formadora de alcohol graso de CE 1.1.1.*, una acil-CoA reductasa de 1.2.1.50, una alcohol deshidrogenasa de CE 1.1.1.1 y una enzima FAS de CE 2.3.1.85.
11. El uso de la reivindicación 8, o el método de la reivindicación 9, en donde el derivado de ácido graso comprende de 1 a 5 enlaces dobles.
12. El uso de la reivindicación 8, o el método de la reivindicación 9, en donde el derivado de ácido graso comprende una longitud de cadena de carbono de 8 a 30.
13. El uso de la reivindicación 8, o el método de la reivindicación 9, en donde el derivado de ácido graso comprende de 1 a 5 puntos de ramificación.
14. Un recipiente que contiene la célula de *E. coli* recombinante de la reivindicación 1 o 2, o el medio de cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7.
15. Un caldo de fermentación que comprende la célula de *E. coli* recombinante de la reivindicación 1 o 2, o el medio de cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7.

FIG. 1





Acil-CoA reductasa formadora de alcoholes grasos referencias: Kalscheurer 2006; Metz 2000; Cheng 2004a

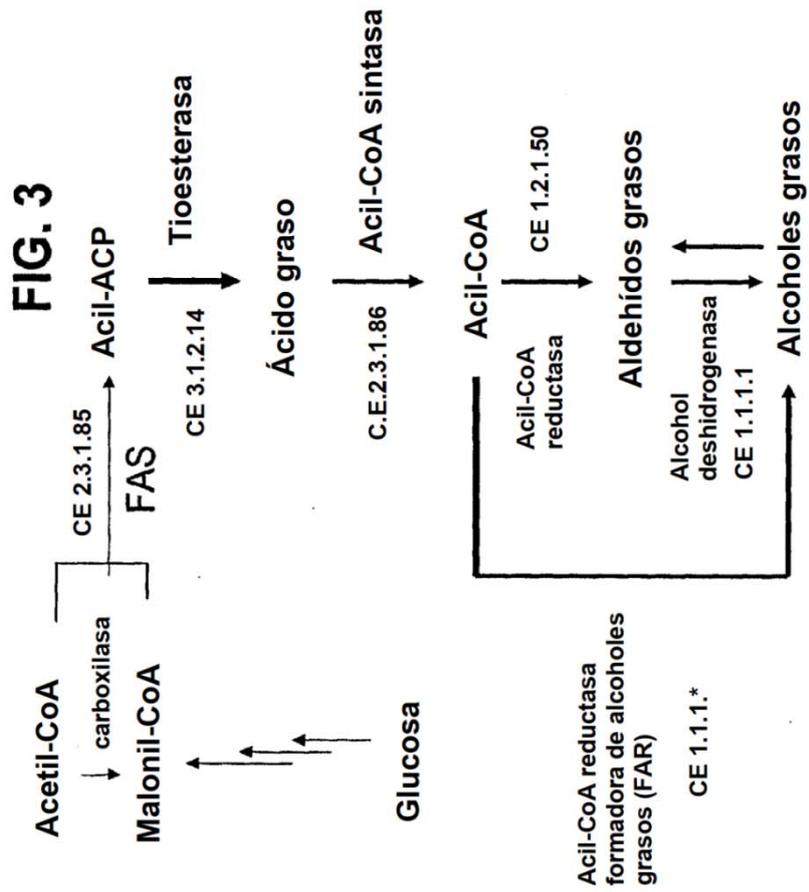


FIG. 4

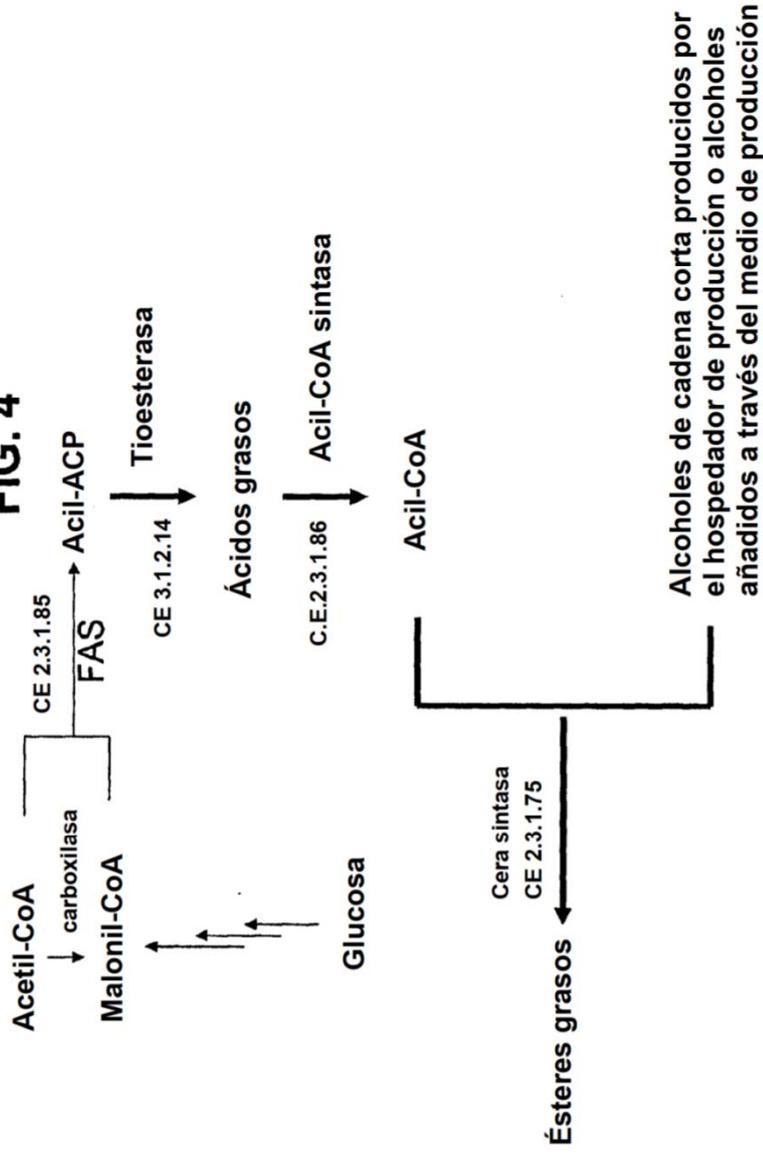


FIG. 5

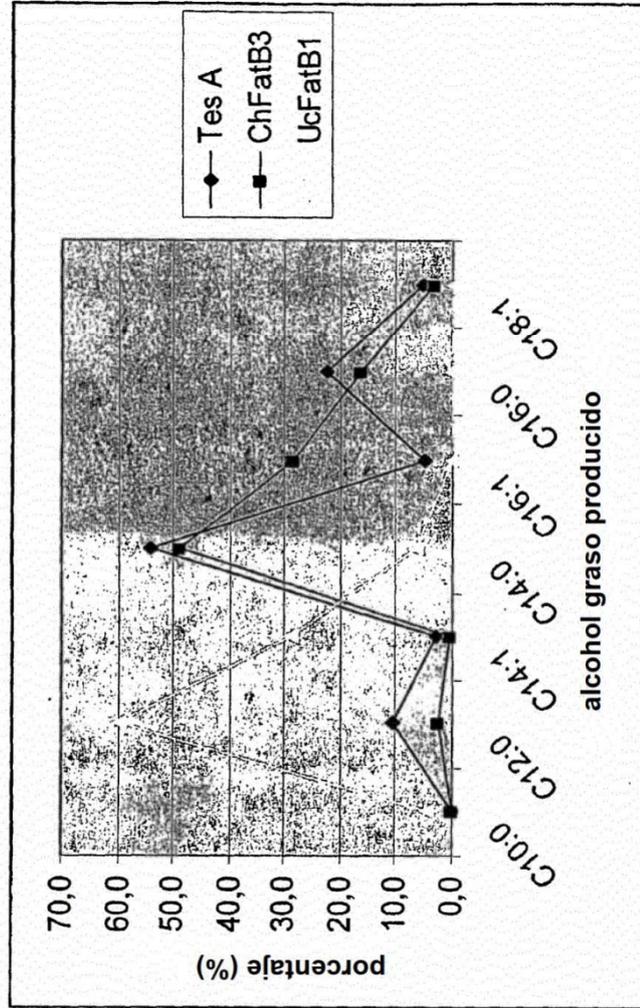
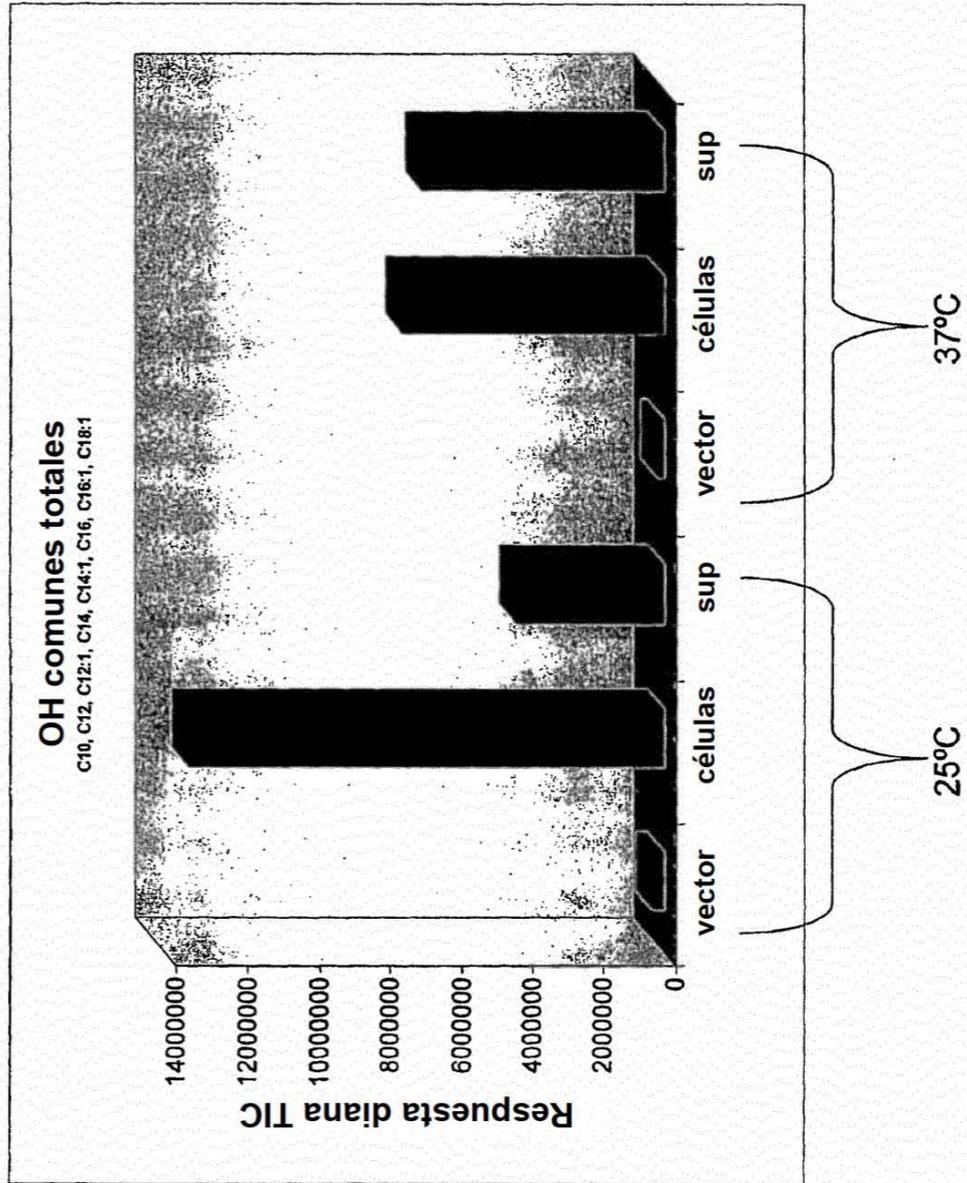


FIG. 6



FIGS. 7A-7D

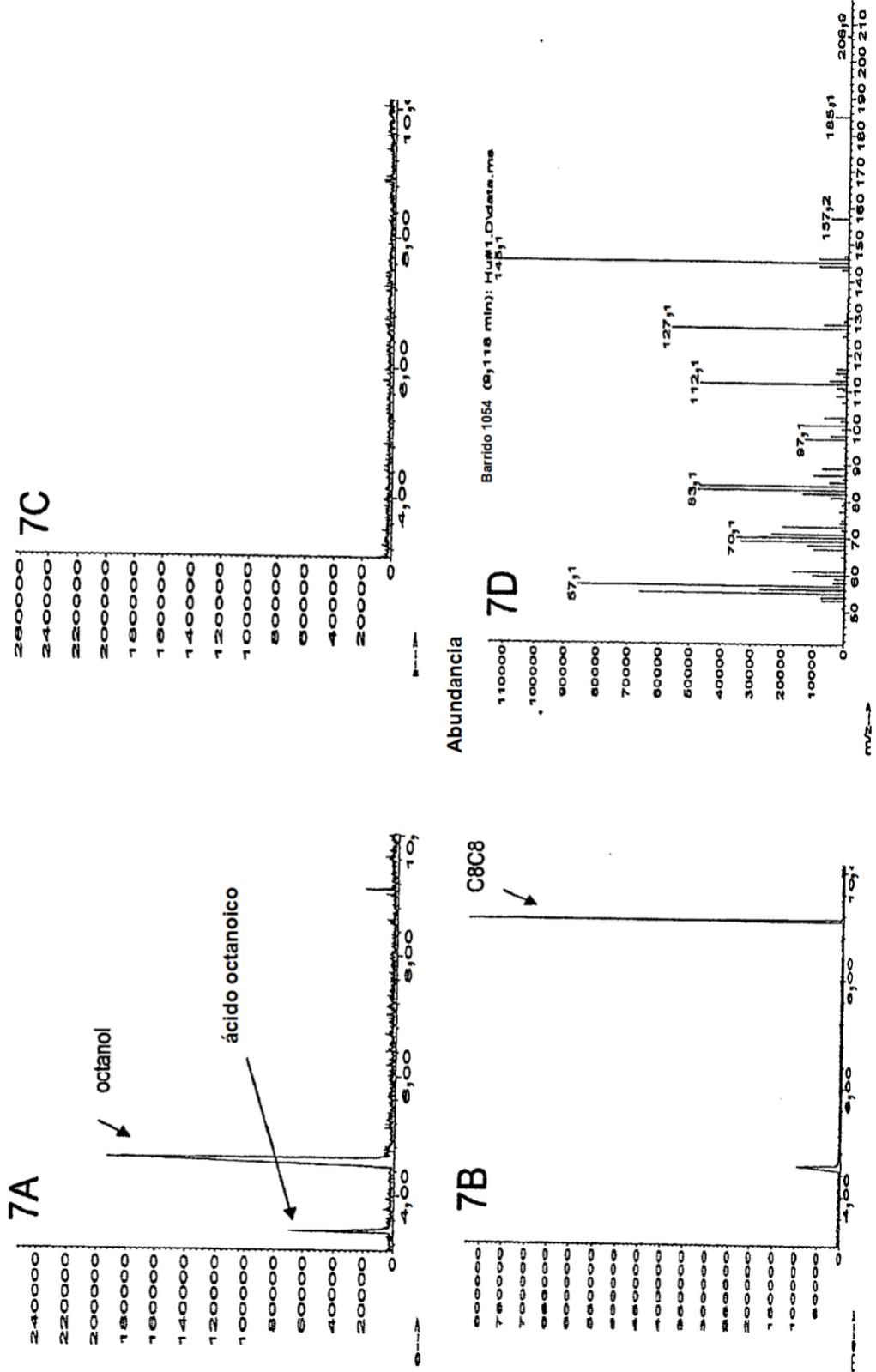
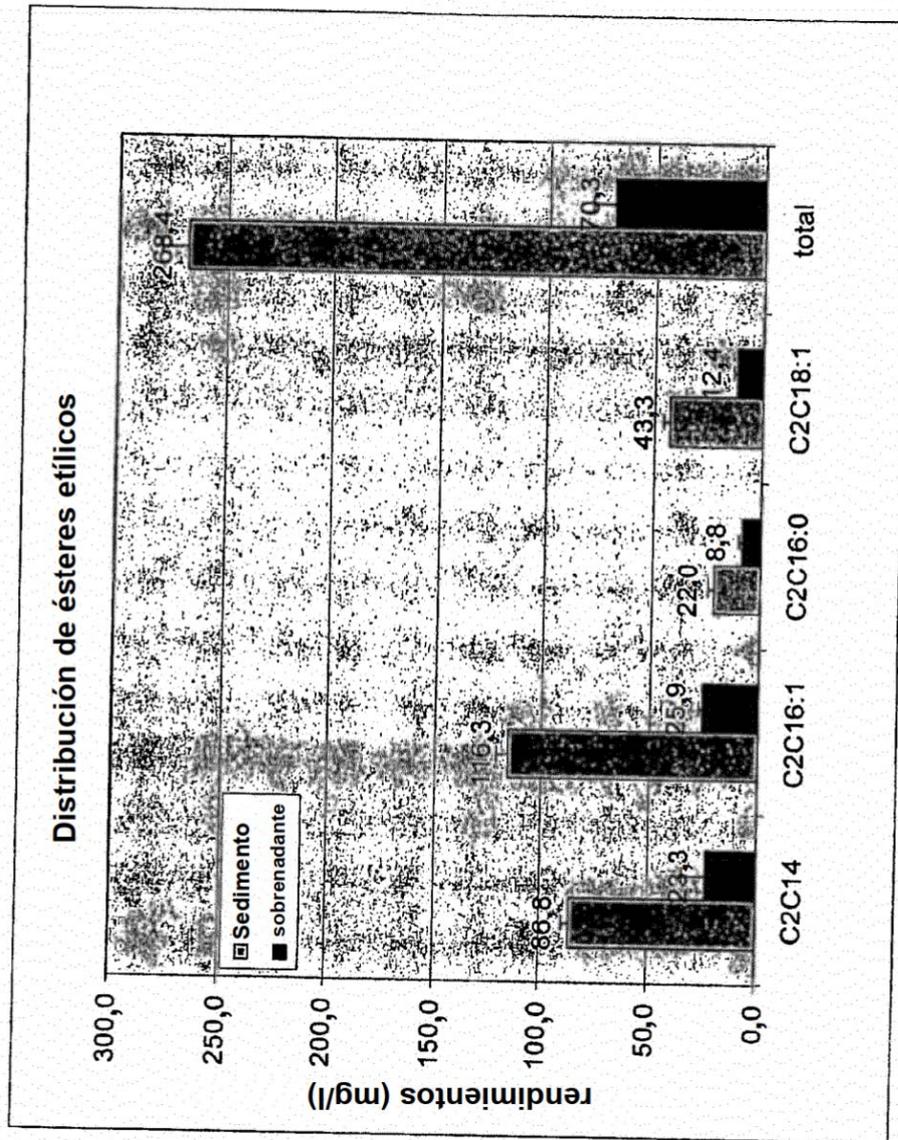


FIG. 8



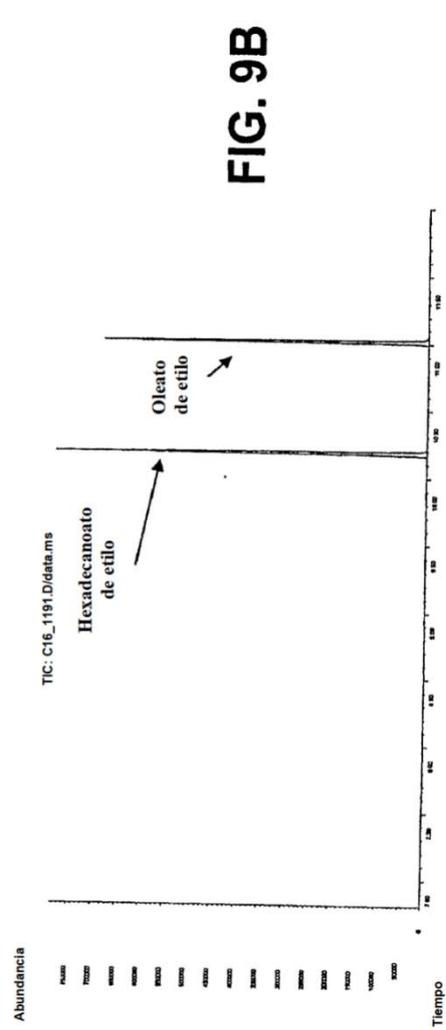
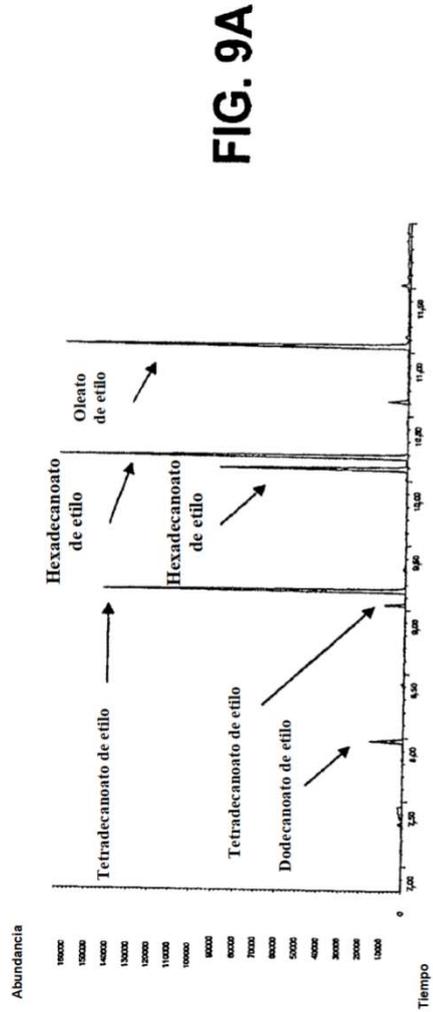


FIG. 10

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

CATEGORÍA GEN	NOMBRE	REGISTRO	NÚMERO DE CE	MODIFICACIÓN	USO	ORGANISMO
<u>1. Aumento de la producción de ácidos grasos/aumento de la producción del producto</u>						
<i>aumentar acil-CoA</i>						
<i>reducir el catabolismo de derivados y productos intermedios</i>						
<i>reducir la inhibición por retroalimentación</i>						
<i>atenuar otras rutas que consumen ácidos grasos</i>						
accA	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad	AAC73296, NP_414727	6.4.1.2	Sobreeexpresar	aumento de la producción de malonil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
accB	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad	NP_417721	6.4.1.2	Sobreeexpresar	aumento de la producción de malonil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
accC	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad	NP_417722	6.4.1.2	Sobreeexpresar	aumento de la producción de malonil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
accD	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad	NP_416819	6.4.1.2 1.2.4.1,	Sobreeexpresar	aumento de la producción de malonil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
accE	piruvato deshidrogenasa, subunidad E1	NP_414656, AAC73226	2.3.1.61,2.3.1 12	Sobreeexpresar	aumento de la producción de acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
accF	piruvato deshidrogenasa, subunidad E2	NP_414657, AAC73227	1-2.4.1, 2.3.1.61 2.3.1.12	Sobreeexpresar	aumento de la producción de acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
ackA	acetato cinasa	AAC75356, NP_416799	2.7.2.1	Delecionar o reducir	aumento de la producción de acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i> .
ackB	acetato cinasa AckB	BAE81430	2.7.2.1	Delecionar o reducir	aumento de la producción de acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
acpP	proteína transportadora de acilo	AAC74178	NINGUNO	Sobreeexpresar	aumento de la producción de acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i>
fadD	acil-CoA sintasa	AP_002424	2.3.1.86	Sobreeexpresar	aumento de la producción de ácidos grasos	<i>Escherichia coli</i> W3110

adhE	alcohol deshidrogenasa	AAAC74323 CAA47743	1.1.1.11	Delecionar o reducir	aumento de la producción de acetil-CoA	<i>Escherichia coli</i> W31J0
cer1	aldehído descarbonilasa	BAA11024	1.2.1.10	Sobreexpresar	aumento de la producción de acetil-CoA	<i>Arabidopsis thaliana</i>
fabA	beta-hidroxidecanoil tioéster deshidrasa	NP_415474	4.1.99.5 42.1.60	Expresar	aumento de la producción de acil graso-CoA	<i>E. coli</i> K12
fabD	[proteína transportadora de acilo] S-maloniltransferasa	AAAC74176	2.3.1.39	Sobreexpresar	aumento de la producción de acetil-CoA	<i>E. coli</i> K12
fabF	3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] sintasa II	AAAC74179	2.3.1.179	Delecionar o sobreexpresar	aumento de la producción de acetil-CoA	<i>E. coli</i> K12
fabG	3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] reductasa	AAAC74177	1.1.1.100	Sobreexpresar	aumento de la producción de acetil-CoA	<i>E. coli</i> K12
fabH	3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] sintasa III	AAAC74175	23.1.180	Sobreexpresar	aumento de la producción de acetil-CoA	<i>E. coli</i> K12
FabI	enoil-[proteína transportadora de acilo] reductasa, dependiente de NADH	NP_415804	1.3.1.9	Expresar	producción de acil graso-CoA	<i>E. coli</i> K12
fabR	Represor transcripcional	NP_418398	NINGUNA	Delecionar o reducir	modula la producción de ácidos grasos insaturados	<i>E. coli</i> K12
fabZ	(3R)-hidroximiristol proteína transportadora de acilo deshidratasa	NP_414722	4.2.1.-			<i>E. coli</i> K12
fadE	acil-CoA deshidrogenasa	AAAC73325	1.3.99.3, 1.3.99.-	Delecionar o reducir	aumento de la producción de acetil-CoA	
acrl	acil graso-CoA reductasa	AAAC45217	1.2.1.-	Sobreexpresar	para la producción de alcohol graso	<i>E. coli</i> K12
GST	Glutación sintasa	P04425	6.32.3	Delecionar o reducir	aumento de Acil-CoA	<i>E. coli</i> K12
gpsA	sn-glicerol 3-fosfato deshidrogenasa biosintética	AAAC76632 NP_418065	CE: 1.1.1.94	Delecionar o reducir	aumento de la producción de acetil-CoA	<i>E. coli</i> K12
ldhA	lactato deshidrogenasa	AAAC74462 NP_415898,	CE: 1.1.1.28	Delecionar o reducir	aumento de la producción de acetil-CoA	<i>E. coli</i> K12
Lipasa	Triglicérido Lipasa	CAA89087 CAA98876	3.1.1.3	expresar	aumento de la producción de ácidos grasos	<i>E. coli</i> K12
	Malonil-CoA descarboxilasa	AAA26500	4.1.1.9,- 4.1.1.41	Sobreexpresar		<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
panD	aspartato 1-descarboxilasa	BAB96708	4.1.1.11	Sobreexpresar	aumento de Acil-CoA	<i>Escherichia coli</i> W3110
panK a.k.a. coaA	Pantotenato cinasa	AAAC76952	2.7.1.33	Sobreexpresar	aumento de la producción de acetil-CoA	

pdh	Piruvato deshidrogenasa	BAB34380, 1.2.4.1 AAC73227, AAC73226 AAC73989, P09373	Sobreexpresar	aumento de la producción de acetyl-CoA	
pfkB	formiato acetiltransferasa	CE: 2.3.1.54	Delecionar o reducir	aumento de la producción de acetyl-CoA	<i>E. coli</i> K12
plsB	aciltransferasa	AAC77011	mutación D311E	reduce los límites en la reserva de acil-CoA	
poxB	piruvato oxidasa	AAC73958 NP_415392, AAC75357, NP_416800	Delecionar o reducir	aumento de la producción de acetyl-CoA	
pta	Fosfoacetiltransferasa	C9AA46822	Sobreexpresar	conversión de NADH a NADPH o conversión de NADH a NADPH o viceversa	
udhA	nucleótido de piridina transhidrogenasa	AP_003956	Delecionar o reducir	Bloqueo de la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
fadB	3-hidroxiacil-CoA epimerasa/delta(3)-cis-delta (2)trans-enoil-CoA isomerasa/enoil-CoA hidratasa y 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa fusionadas	4.2.1.17, 5.1.2.3, 53.3.8, 1.1.1.35			
fadJ	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa; K01692-enoil-CoA hidratasa; K01782	AAC75401	Delecionar o reducir	Bloqueo de la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
fadA	3-hidroxiacil-CoA epimerasa 3-cetoacil-CoA tiolasa	BAE77458	Delecionar o reducir	Bloqueo de la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
fadI	beta-cetoacil-CoA tiolasa	AAC75402	Delecionar o reducir	Bloqueo de la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
YdiO	acil-CoA deshidrogenasa	YP_852786	Delecionar o reducir	Bloqueo de la degradación de ácidos grasos	<i>E. coli</i>
2. Control de la estructura					
2A. Control de la longitud de cadena					
2	tiosterasa	P0ADA1	Delecionar 1 y expresar	Longitud de cadena C18	
tesA	tesA sin secuencia líder tiosterasa	AAC75596, NP_415027	expresar o sobreexpresar	C18:1	<i>E. coli</i>
fatB	tiosterasa	Q41635	expresar o sobreexpresar	C12:0	<i>Umbellularia californica</i>
fatB2	tiosterasa	AAC49269	expresar o sobreexpresar	C8:0-C10:0	<i>Cuphea hookeriana</i>
(<i>umbellularia</i>)					

fatB3	tiosterasa	AAC72881	3.1.1.-	expresar o sobreexpresar	C14:0-C16:0	<i>Cuphea hookeriana</i>
fatB (cinnamonomum)	tiosterasa	Q39473	3.1.1.-	expresar o sobreexpresar	C14:0	<i>Cinnamomum camphora</i>
fatB[M141T]*	tiosterasa	CAA85388	3.1.1.-	expresar o sobreexpresar	C16:1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
fatA1 (Helianthus)	tiosterasa	AAL79361	3.1.1.-	expresar o sobreexpresar	C18:1	<i>Helianthus annuus</i>
atfata	tiosterasa	NP_189147, NP_193041	3.1.1.-	expresar o sobreexpresar	C18:1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
fatA	tiosterasa	CAC39106	3.1.1.-	expresar o sobreexpresar	C18:1	<i>Brassica juncea</i>
fatA (cuphea)	tiosterasa	AAC72883	3.1.1.-	expresar o sobreexpresar	C18:1	<i>Cuphea hookeriana</i>

2B. Control de la ramificación

atenuar *FabH*
expresar *FabH* a partir de
S. glaucescens y
desactivar *FabH* endógeno

expresar *FabH*
a partir de *B. subtilis*
y desactivar
FabH endógeno

Subunidad de
bak-E3-
dihidrolipoil
deshidrogenasa

Subunidad de
bak-E1-
alfa/beta

aumentar los derivados de ácidos grasos de cadena ramificada

CE 1.2.4.4

CE 1.2.4.4

bkdC	dihidrolipoil transacetilasa (E2)	AAA65617	CE 1.2.4.4	Expresar o Sobreexpresar	prepara precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Pseudomonas putida</i>
lpd	dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3)	NP_414658	1.8.1.4	Expresar o Sobreexpresar	prepara precursores de acil-CoA de cadena ramificada	<i>Escherichia coli</i>
IIVe	aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa	YP_026247	2.6.1.42	Expresar o Sobreexpresar	prepara a-cetoácidos ramificados	<i>Escherichia coli</i>
IIVe	aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa	AAF34406	2.6.1.42	Expresar o Sobreexpresar	prepara a-cetoácidos ramificados	<i>Lactococcus lactis</i>
IIVe	aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa	NP_745648	2.6.1.43	Expresar o Sobreexpresar	prepara a-cetoácidos ramificados	<i>Pseudomonas putida</i>
IIVe	aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa	NP_629657	2.6.1.42	Expresar o Sobreexpresar	prepara a-cetoácidos ramificados	Convierte la crotonil-CoA a <i>Streptomyces coelicolor</i>
ccr	crotonil-CoA reductasa	NP_630556	1.1.1.9	Expresar o Sobreexpresar	Convierte crotonil-CoA en butiril-CoA	<i>Streptomyces coelicolor</i>
ccr	crotonil-CoA reductasa	AAD53915	1.1.1.9	Expresar o Sobreexpresar	Convierte crotonil-CoA en butiril-CoA	<i>Streptomyces cinnamomensis</i>
lemA, isobutiril-CoA mutasa	Isobutiril-CoA mutasa, subunidad A	NP_629554	5.4.99.2	Expresar o Sobreexpresar	Convierte butiril-CoA en isobutiril-CoA	<i>Streptomyces coelicolor</i>
lemA, isobutiril-CoA mutasa	isobutiril-CoA mutasa, subunidad A	AAC08713	5.4.99.2	Expresar o Sobreexpresar	convierte butiril-CoA en isobutiril-CoA	<i>Streptomyces cinnamomensis</i>
lemB, isobutiril-CoA mutasa	isobutiril-CoA mutasa, subunidad B	NP_630904	5.4.99.13	Expresar o Sobreexpresar	convierte butiril-CoA en isobutiril-CoA	<i>Streptomyces coelicolor</i>
IcmB, isobutiril-CoA mutasa	isobutiril-CoA mutasa, subunidad B	AJ246005	5.4.99.13	Expresar o Sobreexpresar	convierte butiril-CoA a isobutiril-CoA	<i>Streptomyces cinnamomensis</i>
Genes de FabH, ACP y fabF con especificidad por las acil-CoA de cadena ramificada						
IIVe	beta-cetoacil-ACP sintasa III	CAC12788	CE2.6.1.42	Sobreexpresar	aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa	<i>S. camosus</i>
FabHI		NP_626634	2.3.1.180	Expresar o Sobreexpresar	iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Streptomyces coelicolor</i>

ACP	proteína transportadora de acilo NP_626635	NINGUNO	Expresar o Sobreexpresar	Iniciación y alargamiento de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Streptomyces coelicolor</i>
FabF	beta-cetoacil-ACP-sintasas II NP_626636	2.3.1.179	Expresar o Sobreexpresar	iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Streptomyces coelicolor</i>
FabH3	beta-cetoacil-ACP-sintasas III NP_823466	23.1.180	Expresar o Sobreexpresar	iniciación y alargamiento de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Streptomyces avermitilis</i>
FabC3 (ACP)	proteína transportadora de acilo NP_823467	NINGUNO	Expresar o Sobreexpresar	iniciación y alargamiento de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Streptomyces avermitilis</i>
FabF	beta-cetoacil-ACP-sintasas II NP_823468	2.3.1.179	Expresar o Sobreexpresar	iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Streptomyces avermitilis</i>
FabH A	beta-cetoacil-ACP-sintasas III NP_389015	2.3.1.180	Expresar o Sobreexpresar	iniciación y alargamiento de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Bacillus subtilis</i>
FabH B	beta-cetoacil-ACP-sintasas III NP_388898	2.3.1.180	Expresar o Sobreexpresar	iniciación y alargamiento de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Bacillus subtilis</i>
ACP	proteína transportadora de acilo NP_389474	NINGUNO	Expresar o Sobreexpresar	iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Bacillus subtilis</i>
FabF	beta-cetoacil-ACP-sintasas II NP_389016	2.3.1.179	Expresar o Sobreexpresar	iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Bacillus subtilis</i>
SmallDRAFT_08	beta-cetoacil-ACP-sintasas III ZP_01643059	2.3.1.180	Expresar o Sobreexpresar	iniciación y alargamiento de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SmallDRAFT_08	proteína transportadora de acilo ZP_01643063	NINGUNO	Expresar o Sobreexpresar	alargamiento de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SmallDRAFT_08	beta-cetoacil-ACP-sintasas II ZP_01643064	2.3.1.179	Expresar o Sobreexpresar	iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
FabH	beta-cetoacil-ACP-sintasas III YP_123672	23.1.180	Expresar o Sobreexpresar	iniciación y alargamiento de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Legionella pneumophila</i>
ACP	proteína transportadora de acilo YP_123675	NINGUNO	Expresar o Sobreexpresar	iniciación y alargamiento de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Legionella pneumophila</i>
FabF	beta-cetoacil-ACP-sintasas II YP_123676	2.3.1.179	Expresar o Sobreexpresar	alargamiento de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Legionella pneumophila</i>
FabH	beta-cetoacil-ACP-sintasas III NP_415609	2.3.1.180	Delecionar o reducir	iniciación y alargamiento de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Escherichia coli</i>

FabF Para producir ácidos grasos cíclicos											
	beta-cetoacil-ACP sintasa II	<u>NP_415613</u>	2.3.1.179	Delecionar o reducir Expresar o Sobrexpresar	alargamiento de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada	<i>Escherichia coli</i> <i>Streptomyces</i> <i>collinus</i>					
AnsJ	deshidatasa (supuesta)	no disponible	no disponible	Sobrexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces</i> <i>collinus</i>					
AnsK	CoA ligasa (supuesta)	no disponible	no disponible	Expresar o Sobrexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces</i> <i>collinus</i>					
AnsL	deshidrogenasa (supuesta)	no disponible	no disponible	Expresar o Sobrexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces</i> <i>collinus</i>					
CheA	enoil-CoA Reductasa	U72144	El.3.1.34	Sobrexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces</i> <i>collinus</i>					
AnsM	oxidorreductasa (supuesta)	no disponible	no disponible	Expresar o Sobrexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces</i> <i>collinus</i>					
PimJ	deshidatasa (supuesta)-	<u>AA084158</u>	no disponible	Sobrexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>sp.</i> <i>HK803</i> <i>Streptomyces</i>					
PimK	CoA ligasa (supuesta)	<u>AA084158</u>	no disponible	Expresar o Sobrexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>sp.</i> <i>HK803</i> <i>Streptomyces</i>					
PimL	deshidrogenasa (supuesta)	<u>AA084159</u>	no disponible	Expresar o Sobrexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>sp.</i> <i>HK803</i> <i>Streptomyces</i>					
CheA	enoil-CoA reductasa	<u>AA084160</u>	El.3.1.34	Expresar o Sobrexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>sp.</i> <i>HK803</i> <i>Streptomyces</i>					
PimM	oxidorreductasa (supuesta)	<u>AA084161</u>	no disponible	Expresar o Sobrexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>sp.</i> <i>HK803</i> <i>Streptomyces</i>					
CheB	enoil-CoA isomerasa	AF268489	no disponible	Expresar o Sobrexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces</i> <i>collinus</i>					
CheB/CaiD	enoil-CoA isomerasa	NP_629292	4.2.1.-	Expresar o Sobrexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces</i> <i>coelicolor</i>					
CheB/CaiD	enoil-CoA isomerasa	NP_824296	4.2.1.-	Expresar o Sobrexpresar	biosíntesis de ciclohexilcarbonil-CoA	<i>Streptomyces</i> <i>avermitilis</i>					
2C. Control del nivel de saturación											
Sfa											
véase también FabA en la sec. 1											
GnsA	Supresor de FabA supresores de la mutación nula secG	AA079592, AAC44390 ABD18647.1	No encontrado NINGUNO	Sobrexpresar Sobrexpresar	aumento de ácidos grasos monoinsaturados produce ácidos grasos insaturados aumento de ésteres de ácidos grasos insaturados	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i>					

GnsB véase también la sección 2A – los artículos con :0 son insaturados (sin dobles enlaces) y con :1 están saturados (1 doble enlace) fabB fabK	supresores de la mutación nula secG	AAC74076.1 NINGUNO	Sobreexpresar	aumento de ésteres de ácidos grasos insaturados	<i>E. coli</i>
	3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] sintasa I	BAA116180	Sobreexpresar	modula la producción de ácidos grasos insaturados	<i>Escherichia coli</i>
	trans-2-enoil-ACP reductasa II	AAF98273	Expresar	modula la producción de ácidos grasos insaturados	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	enoil-(proteína transportadora de acilo) reductasa	AAU39821	Expresar	modula la producción de ácidos grasos insaturados	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13
	trans-2, cis-3-decenoil-ACP isomerasa	DAA05501	Sobreexpresar	modula la producción de ácidos grasos insaturados	<i>Streptococcus mutans</i>
3. Salida del producto final 3A. Salida de cera AT3G51970	Alcohol de cadena larga O-acil graso transferasa fioesterasa (véase la sección de longitud de cadena)	NP_190765	Expresar	producción de cera	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	acil-CoA formadora de alcohol graso	1.1.1.*	Expresar	aumento de la producción de ácido graso	
	acil-CoA reductasa (ACR1)	YP_047869	Expresar	convierte acil-coa en alcohol graso Convierte acil-CoA en alcohol graso	<i>Acinetobacter sp.</i> ADPI
	alcohol deshidrogenasa	AP_003562	Expresar	Aumenta	<i>E. coli</i> W3110
	ácido graso elongasa	BAD98251	Expresar	produce ácidos grasos de cadena muy larga	<i>Pichia angusta</i>
	aciltransferasa	AAA16514	Expresar		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
DAGAT	diacilglicerol aciltransferasa	AAF19262	Expresar	producción de cera	<i>Arabidopsis thaliana</i>

hWS	acil-CoA cera alcohol aciltransferasa	AAX48018	No encontrado	Expresar	producción de cera	<i>Homo sapiens</i>
atfl	Éster de cera sintasa Bifuncional/acil CoA: diacilglicerol aciltransferasa	AA017391	23.1.20	Expresar	producción de cera	<i>Acinetobacter sp ADPI</i>
mWS	éster de cera sintasa (<i>simmondsia</i>)	AAD38041	23.1.75	Expresar	producción de cera	<i>Simmondsia chinensis</i>
<u>3B. Salida de alcoholes grasos</u>	varias toesterasas (en referencia a la sec.2A)		3.1.2.14	Expresar	produce	
actl	acil-CoA reductasa	YP_047869	1.2.1.50	Expresar	produce	<i>Acinetobacter sp. ADPI</i>
yqhd	alcohol deshidrogenasa	AP_003562	1.1.1.1	Expresar	produce	<i>Escherichia coli W3110</i>
BmFAR	FAR (acil-CoA reductasa formadora de alcohol graso)	BAC79425	1.1.1.*	Expresar	reduce acil graso-CoA a alcohol graso	<i>Bombyx mori</i>
Akrla4	aldehído reductasa microsómica de mamífero	NP_067448	1.1.1.21	Expresar	produce	<i>Mus musculus</i>
GTNG 1865	aldehído deshidrogenasa de cadena larga	YP_001125970	1.2.1.48	Expresar	produce	<i>Geobacillus thermodenitrificans NG80-2</i>
FadD	acil-CoA sintetasa	NP_416319	CE 6.2.1.3	Expresar	produce más	<i>E. Coli K12</i>
<i>Para preparar butanol</i>						
atoB	acetil-CoA acetiltransferasa	YP_049388	2.3.1.9	Expresar	produce	<i>Erwinia carotovora</i>
hbd	Beta-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa	BAD51424	1.1.1.157	Expresar	produce	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
CPE0095	crotonasa	BAB79801	4.2.1.17	Expresar	produce	<i>Clostridium perfringens</i>
bcd	butiril-CoA deshidrogenasa	AAM14583	No encontrado	Expresar	produce	<i>Clostridium beijerinckii</i>
ALDH	CoA acilante deshidrogenasa	AAT66436	No encontrado	Expresar	produce	<i>Clostridium beijerinckii</i>
AdhE	aldehído-alcohol deshidrogenasa	AAN80172	1.2.1.10	Expresar	produce	<i>Escherichia coli CFT073</i>

<u>3C. Salida de ésteres de ácidos grasos</u>									
tiosterasa	véase la sección de control de la longitud de cadena acil-CoA reductasa								
acrl		YP_047869	3.1.2.14	Expresar	produce				
yqhD	alcohol deshidrogenasa	AP_003562	1.2.1.50	Expresar	produce				<i>Acinetobacter sp.</i> <i>ADPI</i> <i>E. Coli K12</i>
AAT	alcohol O-acetiltransferasa	AAG13130	1.1.1.1	Expresar	produce				<i>Fragaria x ananassa</i>
<u>4. Exportación</u>									
Exportador de éster de cera (familia FATP, proteína transportadora de ácidos grasos (cadena larga)		NP_524723	NINGUNO	Expresar	exporta cera				<i>Drosophila melanogaster</i>
Transportador ABC	Supuesto transportador de alcanos	AAN73268	NINGUNO	Expresar	exporta productos				<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>
CER5	transportador de cera	AHg51500, AY734542, A13g21090, AHg51460	NINGUNO	Expresar	exporta productos				<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtMRP5	asociado a resistencia a múltiples fármacos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_171908	NINGUNO	Expresar	exporta productos				<i>Arabidopsis thaliana</i>
AmiS2	transportador ABC AmiS2	JC5491	No encontrado	Expresar	exporta productos				<i>Rhodococcus sp.</i>
AtPGPI	GLUCOPROTEÍNAI DE ARABIDOPSIS THALIANA P	NP_181228	NINGUNO	Expresar	exporta productos				<i>Arabidopsis thaliana</i>
AcrA	proteína acra supuesta de transporte de flujo de salida de múltiples fármacos	CAF23274	NINGUNO	Expresar	exporta productos				<i>Candidatus Protochlamydia amoebophila UIWE25</i>
AcrB	probable proteína transporte de flujo de salida de múltiples fármacos, acrB	CAF23275	NINGUNO	Expresar	exporta productos				<i>Candidatus Protochlamydia amoebophila UIWE25</i>
ToIC	proteína de la membrana externa [envoltura celular], biogénesis	ABD59001	NINGUNO	Expresar	exporta productos				<i>Francisella tularensis subsp. novicida</i>

AcrE	proteína transmembrana que afecta a la formación del septo y a la permeabilidad de la membrana celular	YP_312213 P24181	NINGUNO	Expresar	exporta productos	<i>Shigella sonnei</i> Ss046
AcrF	Proteína F de resistencia A acriflavina	P24181	NINGUNO	Expresar	exporta productos	<i>Escherichia coli</i>
ttl1618	transportador de flujo de salida de múltiples fármacos	NP_682408.1		Expresar	exporta productos	<i>Thermosynechococcus elongatus BP-1</i>
ttl1619	transportador de flujo de salida de múltiples fármacos	NP_682409.1		Expresar	exporta productos	<i>Thermosynechococcus elongatus BP-1</i>
ttl0139	transportador de flujo de salida de múltiples fármacos	NP_680930.1		Expresar	exporta productos	<i>Thermosynechococcus elongatus BP-1</i>
<u>5. Fermentación</u>						
Genes de punto de control de la replicación						
unuD	ADN polimerasa V, subunidad	YP_310132	3.4.21.-	Sobreexpresar	aumentan la eficacia de la salida	<i>Shigella sonnei</i> Ss046
unuC	ADN polimerasa V, subunidad	ABC42261	3.4.21.-	Sobreexpresar	aumenta la eficacia de la salida	<i>Escherichia coli</i>
NADH:NADPH transhidrogenasa (subunidades alfa y beta)						
		P07001 <u>P0AB70</u>	1.6.1.1. 1.6.1.2	Expresar	aumenta la eficacia de la salida	<i>Shigella flexneri</i>

****FIN DE LA TABLA****