

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 565**

51 Int. Cl.:

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2009 E 09717082 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2285948**

54 Título: **Microorganismos fijadores de CO₂ obtenidos por ingeniería genética que producen productos basados en carbono de interés**

30 Prioridad:

03.03.2008 US 33411 P	03.03.2008 US 33402 P
11.04.2008 US 44419 P	29.05.2008 US 56999 P
02.06.2008 US 58182 P	02.07.2008 US 77698 P
10.07.2008 US 79687 P	10.07.2008 US 79688 P
10.07.2008 US 79656 P	10.07.2008 US 79665 P
10.07.2008 US 79667 P	10.07.2008 US 79673 P
10.07.2008 US 79676 P	10.07.2008 US 79707 P
10.07.2008 US 79699 P	10.07.2008 US 79692 P
05.08.2008 US 86291 P	05.08.2008 US 86288 P
05.08.2008 US 86283 P	05.08.2008 US 86285 P
05.08.2008 US 86417 P	05.08.2008 US 86418 P
05.08.2008 US 86296 P	05.08.2008 US 86300 P
05.08.2008 US 86407 P	05.08.2008 US 86410 P
05.08.2008 US 86412 P	05.08.2008 US 86414 P
26.09.2008 US 100656 P	26.09.2008 US 100665 P
26.09.2008 US 100667 P	26.09.2008 US 100660 P
26.09.2008 US 100663 P	17.10.2008 US 106543 P
10.12.2008 US 121532 P	

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2014

73 Titular/es:

JOULE UNLIMITED TECHNOLOGIES, INC.
(100.0%)
18 Crosby Drive
Bedford, MA 01730, US

72 Inventor/es:

BERRY, DAVID A.;
ROBERTSON, DAN E.;
SKRALY, FRANK A.;
GREEN, BRIAN D.;
RIDLEY, CHRISTIAN P.;
KOSURI, SRIRAM;
REPPAS, NIKOS B.;
SHOLL, MARTHA y
AFEYAN, NOUBAR B.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 446 565 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

Microorganismos fijadores de CO₂ obtenidos por ingeniería genética que producen productos basados en carbono de interés

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud provisional de Estados Unidos N° 61/033.411 presentada el 3 de marzo 2008; la Solicitud provisional de Estados Unidos N° 61/033.402, presentada el 3 de marzo 2008; la Solicitud provisional de Estados Unidos N° 61/044.419 presentada el 11 de abril 2008; la Solicitud provisional de Estados Unidos N° 61/106.543 presentada el 17 de octubre 2008; y la Solicitud provisional de Estados Unidos N° 61/121.532 presentada el 10 de diciembre 2008.

Campo

La presente divulgación se refiere a mecanismos para conferir producción de productos basados en carbono a un organismo fotoautotrófico de modo que convierta eficazmente dióxido de carbono y luz en diversos productos basados en carbono, y en particular al uso de dichos organismos para la producción comercial de diversos productos basados en carbono de interés.

Antecedentes

La fotosíntesis es un procedimiento por el que entidades biológicas utilizan la luz del sol y CO₂ para producir azúcares para energía. La fotosíntesis, como ha evolucionado de forma natural, es un sistema extremadamente complejo con numerosos y poco entendidos bucles de retroalimentación, mecanismos de control e ineficacias del proceso. Este complicado sistema presenta obstáculos probablemente insuperables para enfoques de optimización de un factor cada vez o globales [Nedbal *et al.*, Photosynth Res., 93 (1-3): 223-34 (2007); Salvucci *et al.*, Physiol Plant. 120 (2):179-186 (2004); Greene *et al.*, Biochem J., 404 (3):517-24 (2007)].

Los organismos fotoautotróficos existentes (es decir, plantas, algas y bacterias fotosintéticas) son poco adecuados para el bioprocesamiento industrial y por lo tanto no han demostrado viabilidad comercial para este fin. Dichos organismos tienen tiempo de duplicación lento (3-72 horas) en comparación con organismos heterotróficos industrializados tales como *Escherichia coli* (20 minutos), lo que refleja productividades totales bajas. Además, las técnicas para manipulación genética (anulación, sobre-expresión de transgenes mediante integración o propagación plasmídica episómica) son ineficaces, consumen tiempo, son trabajosas o no existen.

Sumario

Se describen en el presente documento rutas y mecanismos para conferir capacidad de producción de productos basados en carbono directa a organismos fotoautotróficos. Los fotoautótrofos productores de productos basados en carbono modificados por ingeniería genética resultantes permiten excepcionalmente la producción eficaz de productos basados en carbono directamente a partir de dióxido de carbono y luz, eliminando las etapas de procesamiento largas y caras que se requieren actualmente para generar biocombustibles y productos bioquímicos a partir de fuentes de biomasa incluyendo maíz, caña de azúcar, miscanthus, celulosa y otros. La invención proporciona una célula hospedadora microbiana fotosintética modificada genéticamente que produce etanol, donde la célula hospedadora está modificada genéticamente para comprender un ácido nucleico modificado por ingeniería genética exógeno que codifica una actividad alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH. La invención también proporciona uso de la célula de la invención para producir etanol y un método para producir etanol, que comprende cultivar la célula de la invención y después aislar el etanol de dicha célula o medio de cultivo.

En algunos aspectos, la producción de etanol se optimiza canalizando el carbono lejos del glucógeno y hacia piruvato, etc. durante su exposición a la luz. Normalmente se forma glucógeno a la luz y se consume para reducir la energía en la oscuridad. En una realización, se atenúan o anulan genes de síntesis de glucógeno y en otras realizaciones, los genes glucolíticos se hacen constitutivos. En otros aspectos, se eliminan ciertas rutas de fermentación, tales como las que conducen a acetato, lactato, succinato, etc., si están presentes.

En otros aspectos más, si debe implementarse un ciclo de luz-oscuridad, la producción de glucógeno se optimiza durante la exposición a la luz (a diferencia de la biomasa, etc.) y se aumenta el % de peso de células secas que puede ser glucógeno (es decir, la célula se modifica por ingeniería genética para contrarrestar cualquier limitación que evite que las células se hinchen llenas de glucógeno). Después, durante la oscuridad, se permite que se realice síntesis de etanol a partir de glucógeno acumulado, habiendo atenuado o anulado las otras rutas de fermentación. Además, se desvela usar un ciclo de luz-oscuridad que coincide con las tasas de síntesis/catabolismo de glucógeno de modo que se pierda el tiempo mínimo (el glucógeno no se agota y las células se mantienen de forma no productiva en oscuridad, o hay demasiado glucógeno para consumir completamente durante el periodo de oscuridad).

El ácido nucleico modificado por ingeniería genética comprendido por la célula de la invención codifica una actividad alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH. En una realización, la actividad alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH es *adhA* de *Moorella* sp. HUC22-1. La secuencia codificante de alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH puede ser al menos 77,1 % idéntica a SEC ID N° 1. La alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH puede ser al menos 72 % idéntica a SEC ID N° 2.

En otra realización, la célula de la invención también codifica una actividad piruvato descarboxilasa. En una realización relacionada, la actividad piruvato descarboxilasa se selecciona de la actividad *pdc* de *Z. palmae* y *Z. mobilis*. La secuencia codificante de alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH y/o la secuencia codificante de piruvato descarboxilasa pueden estar bajo el control de un promotor inducible.

En ciertas realizaciones, la célula de la invención, en cultivo, es capaz de producir etanol en un rendimiento de al menos aproximadamente 249 mg/l de medio de cultivo en 72 horas. En ciertas otras realizaciones, el rendimiento es de al menos aproximadamente 296 mg/l de etanol durante 72 horas. En otras realizaciones más, el rendimiento de etanol es de 2,5 a 5 g/l de medio de cultivo por hora. En otras realizaciones, el nivel de acetaldehído en dicho cultivo después de 72 horas es menor de aproximadamente 14 mg/l. En otras realizaciones, la célula en cultivo produce al menos aproximadamente 36 mg/l de etanol por DO, o al menos aproximadamente 47 mg/l de etanol por DO.

En realizaciones adicionales, la célula modificada genéticamente proporcionada por la invención comprende una célula selecciona de algas, cianobacterias, bacterias verdes del azufre, bacterias verdes no del azufre, bacterias púrpuras del azufre, bacterias púrpuras no del azufre, extremófilos, levaduras, hongos, organismos modificados por ingeniería genética de los mismos y organismos sintéticos. La célula es fotosintética. La célula de la invención puede ser un organismo de alga y/o cianobacteria seleccionado del grupo que consiste en *Acanthoceras*, *Acanthococcus*, *Acaryochloris*, *Achnanthes*, *Achnanthidium*, *Actinastrum*, *Actinochloris*, *Actinocyclus*, *Actinotaenium*, *Amphichrysis*, *Amphidinium*, *Amphikrikos*, *Amphipleura*, *Amphiprora*, *Amphithrix*, *Amphora*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aneumastus*, *Ankistrodesmus*, *Ankyra*, *Anomoeoneis*, *Apatococcus*, *Aphanizomenon*, *Aphanocapsa*, *Aphanochaete*, *Aphanothece*, *Apiocystis*, *Apistonema*, *Arthrodesmus*, *Artherospira*, *Ascochloris*, *Asterionella*, *Asterococcus*, *Audouinella*, *Aulacoseira*, *Bacillaria*, *Balbiana*, *Bambusina*, *Bangia*, *Basichlamys*, *Batrachospermum*, *Binuclearia*, *Bitrichia*, *Blidingia*, *Botriopsis*, *Botrydium*, *Botryococcus*, *Botryosphaerella*, *Brachiomonas*, *Brachysira*, *Brachytrichia*, *Brebissonia*, *Bulbochaete*, *Bumilleria*, *Bumilleriopsis*, *Caloneis*, *Calothrix*, *Campylodiscus*, *Capsosiphon*, *Carteria*, *Catena*, *Cavinula*, *Centritractus*, *Centronella*, *Ceratium*, *Chaetoceros*, *Chaetochloris*, *Chaetomorpha*, *Chaetonella*, *Chaetonema*, *Chaetopeltis*, *Chaetophora*, *Chaetosphaeridium*, *Chamaesiphon*, *Chara*, *Characiochloris*, *Characiopsis*, *Characium*, *Charales*, *Chilomonas*, *Chlainomonas*, *Chlamydothrix*, *Chlamydocapsa*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonopsis*, *Chlamydomyxa*, *Chlamydonephris*, *Chlorangiella*, *Chlorangiopsis*, *Chlorella*, *Chlorobotrys*, *Chlorobrachis*, *Chlorochytrium*, *Chlorococcum*, *Chlorogloea*, *Chlorogloeopsis*, *Chlorogonium*, *Chlorolobion*, *Chloromonas*, *Chlorophysemia*, *Chlorophyta*, *Chlorosaccus*, *Chlorosarcina*, *Chlorocystis*, *Chromophyton*, *Chromulina*, *Chroococcidiopsis*, *Chroococcus*, *Chroodactylon*, *Chroomonas*, *Chrootheca*, *Chrysamoeba*, *Chrysopsis*, *Chrysidiastrium*, *Chrysocapsa*, *Chrysocapsella*, *Chrysochaete*, *Chrysochromulina*, *Chrysococcus*, *Chrysocrinus*, *Chrysosphaerella*, *Chrysosaccus*, *Chrysosphaerella*, *Chrysostephanosphaera*, *Cladophora*, *Clastidium*, *Closteriopsis*, *Closterium*, *Coccomyxa*, *Cocconeis*, *Coelastrum*, *Coelosphaerium*, *Coenochloris*, *Coenococcus*, *Coenocystis*, *Colacium*, *Coleochaete*, *Collodictyon*, *Compsogonopsis*, *Compsopogon*, *Conjugatophyta*, *Conochaete*, *Coronastrum*, *Cosmarium*, *Cosmioneis*, *Cosmolobium*, *Crateriportula*, *Craticula*, *Crinalium*, *Crucigenia*, *Crucigeniella*, *Cryptocaulax*, *Cryptomonas*, *Cryptophyta*, *Ctenophora*, *Cyanodictyon*, *Cyanonephron*, *Cyanophora*, *Cyanophyta*, *Cyanotheca*, *Cyanomonas*, *Cyclonexis*, *Cyclotella*, *Cylindrocapsa*, *Cylindrocystis*, *Cylindrospermum*, *Cylindrotheca*, *Cymatopleura*, *Cymbella*, *Cymbellonitzschia*, *Cystodinium*, *Dactylococcopsis*, *Debarya*, *Denticula*, *Dermatochrysis*, *Denticarpha*, *Dermocarpella*, *Desmatractum*, *Desmidium*, *Desmococcus*, *Desmonema*, *Desmosiphon*, *Diacanthos*, *Diacronema*, *Diademesmis*, *Diatoma*, *Diatomella*, *Dicellula*, *Dichothrix*, *Dichotomococcus*, *Dicranochaete*, *Dictyochloris*, *Dictyococcus*, *Dictyosphaerium*, *Didymocystis*, *Didymogenes*, *Didymosphenia*, *Dilabifilum*, *Dimorphococcus*, *Dinobryon*, *Dinococcus*, *Diplochloris*, *Diploneis*, *Diplostauron*, *Distironella*, *Dodidium*, *Draparnaldia*, *Dunaliella*, *Dysmorphococcus*, *Ecbalocystis*, *Elakatothrix*, *Ellerbeckia*, *Encyonema*, *Enteromorpha*, *Entocladia*, *Entomoneis*, *Entophysalis*, *Epichrysis*, *Epipyxis*, *Epithemia*, *Eremosphaera*, *Euastris*, *Euastrum*, *Eucapsis*, *Eucocconeis*, *Eudorina*, *Euglena*, *Euglenophyta*, *Eunotia*, *Eustigmatophyta*, *Eutreptia*, *Fallacia*, *Fischerella*, *Fragilaria*, *Fragilariforma*, *Franceia*, *Frustulia*, *Curcilla*, *Geminella*, *Genicularia*, *Glaucocystis*, *Glaucophyta*, *Glenodiniopsis*, *Glenodinium*, *Gloeocapsa*, *Gloeochaete*, *Gloeochrysis*, *Gloeococcus*, *Gloeocystis*, *Gloeodendron*, *Gloeomonas*, *Gloeoplax*, *Gloeotheca*, *Gloeotila*, *Gloeotrichia*, *Gloiodictyon*, *Golenkinia*, *Golenkiniopsis*, *Gomontia*, *Gomphocymbella*, *Gomphonema*, *Gomphosphaeria*, *Gonatocygon*, *Gongrosia*, *Gongrosira*, *Goniocloris*, *Gonium*, *Gonyostomum*, *Granulocloris*, *Granulocystopsis*, *Groenbladia*, *Gymnodinium*, *Gymnozyga*, *Gyrosigma*, *Haematococcus*, *Hafniomonas*, *Hallassia*, *Hammatoidea*, *Hannaea*, *Hantzschia*, *Hapalosiphon*, *Haplotaenium*, *Haptophyta*, *Haslea*, *Hemidinium*, *Hemitoma*, *Heribaudiella*, *Heteromastix*, *Heterothrix*, *Hibberdia*, *Hildenbrandia*, *Hillea*, *Holopedium*, *Homoeothrix*, *Hormanthionema*, *Hormotila*, *Hyalobrachion*, *Hyalocardium*, *Hyalodiscus*, *Hyalogonium*, *Hyalotheca*, *Hydrionum*, *Hydrococcus*, *Hydrocoleum*, *Hydrocoryne*, *Hydrodictyon*, *Hydrosera*, *Hydrurus*, *Hyella*, *Hymenomonas*, *Isthmochloron*, *Johannesbaptistia*, *Juranyiella*, *Karayevia*, *Kathablepharis*, *Katodinium*, *Kephyrion*, *Keratococcus*, *Kirchneriella*, *Klebsormidium*, *Kolbesia*, *Koliella*, *Komarekia*, *Korshikovella*, *Kraskella*, *Lagerheimia*, *Lagynion*, *Lamprothamnium*, *Lemanea*, *Lepocinclis*, *Leptosira*, *Lobococcus*, *Lobocystis*, *Lobomonas*, *Luticola*, *Lyngbya*, *Malleochloris*, *Mallomonas*, *Mantoniella*, *Marssoniella*, *Martyana*, *Mastigocoleus*,

Gastrogloia, Melosira, Merismopedia, Mesostigma, Mesotaenium, Microactinium, Micrasterias, Microchaete, Microcoleus, Microcystis, Microglana, Micromonas, Microspora, Microthamnion, Mischochococcus, Monochrysis, Monodus, Monomastix, Monoraphidium, Monostroma, Mougeotia, Mougeotiopsis, Myochloris, Myromecia, Myxosarcina, Naegeliella, Nannochloris, Nautococcus, Navicula, Neglectella, Neidium, Nephroclamys, Nephrocystium, Nephrodiella, Nephroselmis, Natrium, Nitella, Nitellopsis, Nitzschia, Nodularia, Nostoc, Ochromonas, Oedogonium, Oligochaetophora, Onychonema, Oocardium, Oocystis, Opephora, Ophiocystium, Orthoseira, Oscillatoria, Oxysella, Pachycladella, Palmella, Palmodyctyon, Pnadorina, Pannus, Paralia, Pascherina, Paulschulzia, Pediatrum, Pedinella, Pedinomonas, Pedinopera, Pelagodyctyon, Penium, Peranema, Peridiniopsis, Peridinium, Peronia, Petroneis, Phacotus, Phacus, Phaeaster, Phaeodermatium, Phaeophyta, Phaeosphaera, Phaeothamnion, Phormidium, Phycopeltis, Phyllariochloris, Phyllocladus, Phyllomitis, Pinnularia, Pitophora, Placoneis, Planctonema, Planktosphaeria, Planothidium, Plectonema, Pleodorina, Pleurastrum, Pleurocapsa, Pleurocladia, Pleurodiscus, Pleurosigma, Pleurosira, Pleurotaenium, Pocillononas, Podohedra, Polyblepharides, Polychaetophora, Polyedriella, Polyedriopsis, Polygoniochloris, Polyepidomonas, Polytaenia, Polytoma, Polytomella, Porphyridium, Posteriocromonas, Prasinocloris, Prasinocladus, Prasinococcus, Prasinophyta, Prasiola, Prochlorophyta, Prochlorothrix, Protoderma, Protosiphon, Provasoliella, Prymnesium, Psammodictyon, Psammothidium, Pseudanabaena, Pseudonoclonium, Psuedocarteria, Pseudochate, Pseudocharacium, Pseudococcomyxa, Pseudodictyosphaerium, Pseudokephyrion, Pseudoncobyrsa, Pseudoquadrigula, Pseudosphaerocystis, Pseudostaurastrum, Pseudostaurasira, Pseudotetrastrum, Pteromonas, Punctastruata, Pyramichlamys, Pyramimonas, Pyrrophyta, Quadrichloris, Quadricoccus, Quadrigula, Radiococcus, Radiofilum, Raphidiopsis, Raphidocelis, Raphidonema, Raphidophyta, Peimeria, Rhabdoderma, Rhabdomonas, Rhizoclonium, Rhodomonas, Rhodophyta, Rhodocyclonema, Rhodolodina, Rivularia, Rosenvingiella, Rossithidium, Roya, Scenedesmus, Scherffelia, Schizochlamydia, Schizochlamys, Schizomeris, Schizothrix, Schroederia, Scolioneis, Scotiella, Scotiellopsis, Scourfieldia, Scytonema, Selenastrum, Selenochloris, Sellaphora, Semiorbis, Siderocelis, Siderocystopsis, Dimonsenia, Siphononema, Sirocladium, Sirogonium, Skeletonema, Sorastrum, Spermatozopsis, Sphaerelloccystis, Sphaerellopsis, Sphaerodinium, Sphaeroplea, Sphaerosoma, Spiniferomonas, Spirogyra, Spirotaenia, Spirulina, Spondylomorom, Spondylosium, Sporotetras, Spumella, Staurastrum, Staurerodesmus, Stauroneis, Staurasira, Staurisirella, Stenopterobia, Stephanocostis, Stephanodiscus, Stephanoporus, Stephanosphaera, Stichococcus, Stichogloea, Stigeoclonium, Stigonema, Stipitococcus, Stokesiella, Strombomonas, Stylochrysalis, Stylodinium, Styloxyis, Stylosphaeridium, Surirella, Sykidion, Symploca, Synechococcus, Synechocystis, Synedra, Synochromonas, Synura, Tabellaria, Tabularia, Teilingia, Temnogametum, Tetmemorus, Tetrachlorella, Tetracyclus, Tetradismus, Tetraedriella, Tetraedron, Tetraselmis, Tetrastroma, Tetrastrum, Thalassiosira, Thamniochaete, Thermosynechococcus, Thorakochloris, Thorea, Tolypella, Tolypothrix, Trachelomonas, Trachydiscus, Trebouxia, Trentepohlia, Treubaria, Tribonema, Trichodesmium, Trichodiscus, Trichodiscus, Trichiscia, Tryblionella, Ulothrix, Uroglena, Uronema, Urosolenia, Urospora, Uva, Vacuolaria, Vaucheria, Volvox, Volvulina, Westella, Woloszyńska, Xanthidium, Xanthophyta, Xenococcus, Zygnema, Zygnemopsis y Zygonium. La célula proporcionada por la invención puede derivar de una célula de Chloroflexus, Chloronema, Oscillochloris, Heliothrix, Herpetosiphon, Roseiflexus, y Thermomicrobium; una bacteria verde del azufre seleccionada de: Chlorobium, Clathrochloris, y Prosthecochloris; una bacteria púrpura del azufre seleccionada de: Allochromatium, Chromatium, Halochromatium, Isochromatium, Marichromatium, Rhodovulum, Thermochromatium, Thiocapsa, Thiorhodococcus, y Thiocystis; una bacteria púrpura no del azufre seleccionada de: Phaeospirillum, Rhodobaca, Rhodobacter, Rhodomicrobium, Rhodopila, Rhodopseudomonas, Rhodothalassium, Rhodospirillum, Rodovibrio y Roseospira; una bacteria quimiolitotrófica aerobia seleccionada de: bacterias nitrificantes, Nitrobacteraceae sp., Nitrobacter sp., Nitrospina sp., Nitrococcus sp., Nitrospira sp., Nitrosomonas sp., Nitrosococcus sp., Nitrosospira sp., Nitrosolobus sp., Nitrosovibrio sp.; bacterias incoloras del azufre tales como Thiovulum sp., Thiobacillus sp., Thiomicrospira sp., Thiosphaera sp., Thermothrix sp.; bacterias del hidrógeno obligatoriamente quimiolitotróficas Hydrogenobacter sp., bacterias oxidantes y/o depositantes de hierro y manganeso, Siderococcus sp., y bacterias magnetotácticas, Aquaspirillum sp.; una arqueobacteria seleccionada de: arqueobacterias metanogénicas, Methanobacterium sp., Methanobrevibacter sp., Methanothermobacter sp., Methanococcus sp., Methanomicrobium sp., Methanospirillum sp., Methanogenium sp., Methanosarcina sp., Methanolobus sp., Methanothermobacter sp., Methanococcoides sp., Methanoplanus sp., metabolizadores de azufre extremadamente termófilos tales como Thermoproteus sp., Pyrodicticum sp., Sulfolobus sp., Acidianus sp., Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae, Streptomyces sp., Ralstonia sp., Rhodococcus sp., Corynebacteria sp., Brevibacteria sp., Mycobacteria sp., y levadura oleaginosas; y extremófilos seleccionados de Pyrolobus fumarii, Synechococcus lividis, mesófilos, psicrófilos, Psychrobacter, insectos, Deinococcus radiodurans, piezófilos, barófilos, organismos tolerantes a hipergavedad, organismos tolerantes a hipogavedad, organismos tolerantes al vacío, tardígrados, insectos, semillas de microbios, organismos anhidrobióticos tolerantes a desecación; xerófilos, Artemia salina, nemátodos, microbios, hongos, líquenes, organismos tolerantes a la salinidad, halófilos, halobacteriaceas, Dunaliella salina, organismos tolerantes a pH, alcalófilos, Natronobacterium, Bacillus firmus OF4, Spirulina spp., acidófilos, Cyanidium caldarium, Ferroplasma sp., anaerobios, que no pueden tolerar el O₂, Methanococcus jannaschii, microaerófilos, que toleran algo de O₂, Clostridium, aerobios, que requieren O₂, organismos tolerantes a gas, que toleran CO₂ puro, Cyanidium caldarium, organismos tolerantes a metales, metalotolerantes, Ferroplasma acidarmanus Ralstonia sp. CH34.

En otras realizaciones más, la célula modificada genéticamente proporcionada por la invención deriva de *Botryococcus braunii*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Dunaliella salina* (algas), *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (cianobacterias). *Chlorobium tepidum* (bacterias verdes del azufre). *Chloroflexus auranticus* (bacterias verdes no del

azufre), *Chromatium tepidum* y *Chromatium vinosum* (bacterias púrpuras del azufre), *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodopseudomonas palustris* (bacterias púrpuras no del azufre).

En otras realizaciones más, la célula modificada genéticamente proporcionada por la invención es una célula de *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium thermocellum*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pseudomonas fluorescens* o *Zymomonas mobilis*.

En el método de la invención, la célula puede cultivarse en un fotobiorreactor.

10 Breve descripción de las figuras

La **Figura 1 (AO)** proporciona diversos genes identificados que pueden expresarse, regularse positivamente, atenuarse o anularse en la obtención por ingeniería genética de microorganismos fijadores de dióxido de carbono en la producción de productos basados en carbono de interés.

La **Figura 2** proporciona un ejemplo de rutas para producir etanol, succinato y otros derivados.

La **Figura 3** muestra el cromatograma de GC/FID de la cepa de *Synechococcus* 7002 de control.

La **Figura 4** muestra el cromatograma de GC/FID de la cepa recombinante 7002/efe_rs.

La **Figura 5** ilustra gráficamente la densidad óptica de etanológenos seleccionados a lo largo del tiempo.

La **Figura 6** ilustra gráficamente las concentraciones de etanol de cultivos en el sobrenadante a lo largo del tiempo.

La **Figura 7** ilustra gráficamente las concentraciones de acetaldehído de cultivos en el sobrenadante a lo largo del tiempo.

La **Figura 8** ilustra gráficamente las relaciones de etanol y acetaldehído de cultivos en el sobrenadante a lo largo del tiempo.

La **Figura 9** ilustra gráficamente las relaciones de concentración de etanol y DO (730 nm) de cultivos en el sobrenadante a lo largo del tiempo.

Descripción detallada

30 Abreviaturas y Términos

Las siguientes explicaciones de términos y métodos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para guiar a los expertos en la materia en la práctica de la presente divulgación. Como se usa en el presente documento, “que comprende” significa “que incluye” y las formas singulares “un” o “el” incluyen referencias plurales a no ser que el contexto claramente dicte 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 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 único elemento de elementos alternativos indicados o una combinación de dos o más elementos, a no ser que el contexto claramente indique otra cosa.

A no ser que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente divulgación, se describen posteriormente métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes. Otras características de la divulgación resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Números de referencia: Los números de referencia a lo largo de la presente descripción derivan de la base de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) mantenida por el Instituto Nacional de Salud, Estados Unidos. Los números de referencia son como se proporcionan en la base de datos del 1 de febrero de 2008.

Números de clasificación de enzimas (EC): Los números de EC proporcionados a lo largo de la presente descripción derivan de la base de datos de ligandos KEGG, mantenida por la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics, patrocinada en parte por la Universidad de Tokio. Los números de EC son como se proporcionan en la base de datos del 1 de febrero de 2008.

Aminoácido: Los tripletes de nucleótidos, denominados codones, en moléculas de ADN codifican un aminoácido en un péptido. El término codón también se usa para las secuencias correspondientes (y complementarias) de tres nucleótidos en el ARNm en las que se transcribe la secuencia de ADN.

Atenuar: El término como se usa en el presente documento generalmente se refiere a una delección funcional, incluyendo una mutación, delección parcial o completa, inserción u otra variación realizada a una secuencia génica o una secuencia que controla la transcripción de una secuencia génica, que reduce o inhibe la producción del producto génico, o hace al producto génico no funcional. En algunos casos se describe una delección funcional como una

mutación de anulación. La atenuación también incluye cambio de secuencia de aminoácidos alterando la secuencia de ácido nucleico, colocando el gen bajo el control de un promotor menos activo, mediante regulación negativa, expresando ARN de interferencia, ribozimas o secuencias antisentido que se dirigen al gen de interés, o mediante cualquier otra técnica conocida en este campo. En un ejemplo, la sensibilidad de una enzima particular para retroalimentar la inhibición o la inhibición provocada por una composición que no es un producto o un reactivo (retroalimentación específica no de ruta) se reduce de modo que la actividad enzimática no se vea afectada por la presencia de un compuesto. En otros casos, una enzima que se ha alterado para ser menos activa puede denominarse atenuada.

“Productos basados en carbono de interés” incluye alcoholes tales como etanol, propanol, isopropanol, butanol, alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, ésteres de cera; hidrocarburos y alcanos tales como propano, octano, gasóleo, propulsor de chorro 8, polímeros tales como tereftalato, 1,3-propanodiol, 1,4-butanodiol, polioles, polihidroxialcanoatos (PHA), polihidroxibutiratos (PHB), acrilato, ácido adípico, ϵ -caprolactona, isopreno, caprolactama, goma; productos químicos de consumo tales como lactato, ácido docosaheptaenoico (DHA), 3-hidroxipropionato, γ -valerolactona, lisina, serina, aspartato, ácido aspártico, sorbitol, ascorbato, ácido ascórbico, isopentenol, lanosterol, DHA omega-3, licopeno, itaconato, 1,3-butadieno, etileno, propileno, succinato, citrato, ácido cítrico, glutamato, malato, ácido 3-hidroxipirónico (HPA), ácido láctico, THF, gamma butirólactona, pirrolidonas, hidroxibutirato, ácido glutámico, ácido levulínico, ácido acrílico, ácido malónico; productos químicos de especialidad tales como carotenoides, isoprenoides, ácido itacónico; productos farmacéuticos e intermedios farmacéuticos tales como ácido 7-aminodesacetoxicefalosporónico, cefalosporina, eritromicina, policétidos, estatinas, paclitaxel, docetaxel, terpenos, péptidos, esteroides, ácidos grasos omega y otros productos de interés adecuados de este tipo. Dichos productos son útiles en el contexto de biocombustibles, productos químicos industriales y de especialidad, como intermedios usados para realizar productos adicionales, tales como complementos nutricionales, nutracéuticos, polímeros, reemplazos de parafina, productos de cuidados personales y productos farmacéuticos.

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

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 repetidas en polímeros de ADN son cuatro nucleótidos diferentes, cada uno de los cuales incluye una de las cuatro bases, adenina, guanina, citosina y timina unida con un azúcar desoxirribosa al que se une un grupo fosfato.

Endógeno: Como se usa en el presente documento con referencia a una molécula de ácido nucleico y una célula o microorganismo particular se refiere a una secuencia de ácido nucleico o péptido que está en la célula y no se ha introducido en la célula (o sus progenitores) usando técnicas de ingeniería recombinante. Por ejemplo, un gen que estaba presente en la célula cuando la célula se aisló originalmente de la naturaleza. Un gen aún se considera endógeno si las secuencias de control, tales como una secuencia promotora o potenciadora que activa la transcripción o traducción se ha alterado mediante técnicas recombinantes.

“Una actividad enzimática”: Como se usa en el presente documento, la expresión “una actividad enzimática” significa que la enzima indicada (por ejemplo, “una actividad alcohol deshidrogenasa”) tiene atributos medibles con respecto a, por ejemplo, actividad específica de sustrato, pH y temperatura óptimos, y otras medidas convencionales de actividad enzimática como la actividad codificada por una enzima de referencia (por ejemplo, alcohol deshidrogenasa). Además, la enzima es al menos 90 % idéntica al nivel nucleico o de aminoácidos a la secuencia de la enzima de referencia como se mide por una búsqueda de BLAST.

Exógeno: Como se usa en el presente documento con respecto a una molécula de ácido nucleico y una célula o microorganismo particular se refiere a una secuencia de ácido nucleico o péptido que no estaba presente en la célula cuando la célula se aisló originalmente de la naturaleza. Por ejemplo, un ácido nucleico que se originó en un microorganismo diferente y se introdujo por ingeniería genética en una célula alternativa usando técnicas de ADN recombinante u otros métodos para suministrar dicho ácido nucleico es exógeno.

Expresión: El proceso por el que la información codificada por 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 a ARNm y después se traducen en proteína y los que se transcriben a ARN pero no se traducen en proteína (por ejemplo, ARN de transferencia y ribosómico).

Secuencia de control de la expresión: Como se usa en el presente documento se refiere a secuencias polinucleotídicas que son necesarias para afectar a la expresión de secuencias codificantes con las que están unidas de forma operativa. Las secuencias de control de la expresión son secuencias que controlan la transcripción, acontecimientos post-transcripcionales y la traducción de secuencias de ácido nucleico. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias de inicio de la transcripción, terminación, promotoras y potenciadoras apropiadas; señales de procesamiento del ARN eficaces tales como señales de corte y empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficacia de traducción (por ejemplo, sitios de unión a ribosoma); secuencias que potencian la estabilidad proteica; y cuando se desee, secuencias que

potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedador; en procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen promotor, sitio de unión a ribosoma y secuencia de terminación de la transcripción. Se pretende que la expresión “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión, y también pueden incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias compañeras de fusión.

Sobreexpresión: Cuando se hace que un gen se transcriba a una tasa elevada en comparación con la tasa de transcripción endógena para ese gen. En algunos ejemplos, la sobreexpresión incluye adicionalmente una tasa elevada de traducción del gen en comparación con la tasa de traducción endógena para ese gen. Se conocen bien en la técnica métodos para ensayar con respecto a sobreexpresión, por ejemplo pueden evaluarse los niveles de ARN transcrito usando reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR) y pueden evaluarse los niveles de proteína usando análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Además, se considera que un gen que está sobreexpresado cuando muestra actividad elevada en comparación con su actividad endógena, que puede aparecer, por ejemplo, mediante reducción de la concentración o actividad de su inhibidor, o mediante expresión de la versión mutante con actividad elevada. En realizaciones preferidas, cuando la célula hospedadora codifica un gen endógeno con una actividad bioquímica deseada, es útil sobreexpresar un gen exógeno, que permite un control regulador más explícito en la fermentación y un medio para mitigar potencialmente los efectos de la regulación del metabolismo central, que se centra de forma explícita en torno a los genes nativos.

Regulación negativa: Cuando se provoca que un gen se transcriba a una tasa reducida en comparación con la tasa de transcripción génica endógena para ese gen. En algunos ejemplos, la regulación negativa incluye adicionalmente un nivel reducido de traducción del gen en comparación con la tasa de traducción endógena para ese gen. Se conocen bien por los expertos en la materia métodos para ensayar con respecto a regulación negativa. Por ejemplo, los niveles de ARN transcrito pueden evaluarse usando RT-PCR, y los niveles de proteína pueden evaluarse usando análisis de SDS-PAGE.

Anulación: Un gen cuyo nivel de expresión o actividad se ha reducido a cero. En algunos ejemplos, un gen se anula mediante delección de parte de o toda su secuencia codificante. En otros ejemplos, un gen se anula mediante introducción de uno o más nucleótidos en su fase abierta de lectura, que da como resultado traducción de un producto proteico sin sentido o de otro modo no funcional.

Autótrofo: Los autótrofos (u organismos autotróficos) son organismos que producen compuestos orgánicos complejos a partir de moléculas inorgánicas sencillas y una fuente de energía externa, tal como luz (fotoautótrofos) o reacciones químicas de compuestos inorgánicos.

Hidrocarburo: El término se refiere en general a un compuesto químico que consiste en los elementos carbono (C), hidrógeno (H) y opcionalmente oxígeno (O). Hay esencialmente tres tipos de hidrocarburos, por ejemplo, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos saturados e hidrocarburos insaturados tales como alquenos, alquinos y dienos. El término también incluye combustibles, biocombustibles, plásticos, ceras, disolventes y aceites. Los hidrocarburos abarcan biocombustibles, así como plásticos, ceras, disolventes y aceites.

“Inmiscible” o “inmiscibilidad” se refiere a la incapacidad relativa de un compuesto para disolverse en agua y se define por el coeficiente de partición de los compuestos. El coeficiente de partición, P, se define como la concentración en equilibrio de compuesto en una fase orgánica (en un sistema bifásico la fase orgánica es habitualmente la fase formada por el derivado de ácido graso durante el procedimiento de producción, sin embargo, en algunos ejemplos puede proporcionarse una fase orgánica (tal como una capa de octano para facilitar la separación de productos) dividida por la concentración en el equilibrio en una fase acuosa (es decir, caldo de fermentación). Cuando se describe un sistema de dos fases la P habitualmente se analiza con respecto a logP. Un compuesto con logP de 10 se dividiría 10:1 con la fase orgánica, mientras que un compuesto de logP de 0,1 se dividiría 10:1 con la fase acuosa.

Ruta biosintética: También denominada “ruta metabólica”, se refiere a un conjunto de reacciones bioquímicas anabólicas o catabólicas para convertir (transmutar) una especie química en otra. Por ejemplo, una ruta biosintética de hidrocarburos se refiere al conjunto de reacciones bioquímicas que convierten aportaciones y/o metabolitos en intermedios de tipo producto de hidrocarburo y después en hidrocarburos o productos de hidrocarburo. Las rutas anabólicas implican construir una molécula mayor a partir de moléculas más pequeñas, un proceso que requiere energía. Las rutas catabólicas implican degradar moléculas mayores, con frecuencia liberando energía.

Celulosa: La celulosa $[(C_6H_{10}O_5)_n]$ es un carbohidrato de polisacárido polimérico de cadena larga, de beta-glucosa. Forma el componente estructural primario de plantas y no es digerible por seres humanos. La celulosa es un material común en paredes celulares vegetales y se observó por primera vez como tal en 1838. Aparece de forma natural en forma casi pura solamente en la fibra de algodón; en combinación con lignina y cualquier hemicelulosa, se encuentra en todo el material vegetal.

Biocombustible: Un biocombustible es cualquier combustible que derive de una fuente biológica. El biocombustible hace referencia a uno o más hidrocarburos, uno o más alcoholes, uno o más ésteres grasos o una mezcla de los mismos. Preferentemente, se usan hidrocarburos líquidos.

- 5 **“Componente de combustible”** es cualquier compuesto o una mezcla de compuestos que se usen para formular una composición de combustible. Hay “componentes de combustible mayores” y “componentes de combustible menores”. Un componente de combustible mayor está presente en una composición de combustible en al menos 50 % en volumen; y un componente de combustible menor está presente en una composición de combustible en menos del 50 %. Los aditivos de combustible son componentes de combustible menores. Los compuestos de isoprenoide
10 desvelados en el presente documento pueden ser un componente mayor o un componente menor, por sí solos o en una mezcla con otros componentes de combustible.

Como se usa en el presente documento, una composición que es un compuesto **“sustancialmente puro”** está sustancialmente sin uno o más compuestos adicionales, es decir, la composición contiene más del 80 % en volumen, más del 90 % en volumen, más del 95 % en volumen, más del 96 % en volumen, más del 97 % en volumen, más del 98 % en volumen, más del 99 % en volumen, más del 99,5 % en volumen, más del 99,6 % en volumen, más del 99,7 % en volumen, más del 99,8 % en volumen o más del 99,9 % en volumen del compuesto; o de del 20 % en volumen, menos del 10 % en volumen, menos del 5 % en volumen, menos del 3 % en volumen, menos del 1 % en volumen, menos del 0,5 % en volumen, menos del 0,1 % en volumen o menos del 0,01 % en volumen del o los compuestos adicionales, basándose en el volumen total de la composición.
20

Molécula de ácido nucleico: La expresión abarca moléculas tanto de ARN como de ADN incluyendo, sin limitación, ADNc, ADN genómico y ARNm y también incluye moléculas de ácido nucleico sintéticas, tales como las que se sintetizan químicamente o se producen de forma recombinante. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, circular o lineal. Si es monocatenaria, la molécula de ácido nucleico puede ser la cadena con sentido o la cadena antisentido.
25

Ácido nucleico modificado por ingeniería genética: Un “ácido nucleico modificado por ingeniería genética” es una molécula de ácido nucleico que incluye al menos una diferencia con respecto a una molécula de ácido nucleico de origen natural. Un ácido nucleico modificado por ingeniería genética incluye todas las secuencias heterólogas no modificadas y modificadas exógenas (es decir, secuencias derivadas de un organismo o célula distinto del que alberga el ácido nucleico modificado por ingeniería genética) así como genes endógenos, operones, secuencias codificantes o secuencias no codificantes, que se han modificado, mutado o que incluyen delecciones o inserciones en comparación con una secuencia de origen natural. Los ácidos nucleicos modificados por ingeniería genética también incluyen todas las secuencias, independientemente del origen, que están unidas con un promotor inducible o con otra secuencia de control con la que no están asociados de forma natural.
30
35

Condiciones de fermentación adecuadas. La expresión generalmente se refiere a medios de fermentación y condiciones ajustables con pH, temperatura, niveles de aireación, etc., preferentemente condiciones óptimas que permiten que los microorganismos produzcan productos basados en carbono de interés. Para determinar si las condiciones de cultivo permiten la producción del producto, el microorganismo puede cultivarse durante aproximadamente 24 horas hasta una semana después de la inoculación y puede obtenerse y analizarse una muestra. Las células en la muestra o el medio en el que las células se cultivan se ensayan con respecto a la presencia del producto deseado.
40
45

Aislado: Un ácido nucleico o polinucleótido “aislado” (por ejemplo, un ARN, ADN o un polímero mixto) es uno que está separado sustancialmente de otros componentes celulares que acompañan de forma natural al polinucleótido nativo en su célula hospedadora natural, por ejemplo, ribosomas, polimerasas y secuencias genómicas con las que se asocia de forma natural. El término abarca un ácido nucleico o polinucleótido que (1) se ha retirado de su ambiente de origen natural, (2) no está asociado con todo o una parte de un polinucleótido en el que el “polinucleótido aislado” se encuentra en la naturaleza, (3) está unido operativamente con un polinucleótido con el que no está unido en la naturaleza, o (4) no aparece en la naturaleza. La expresión “aislado” o “sustancialmente puro” también puede usarse en referencia a aislados de ADN recombinantes o clonados, análogos polinucleotídicos sintetizados químicamente o análogos polinucleotídicos que se sintetizan biológicamente por sistemas heterólogos. Sin embargo, “aislado” no requiere necesariamente que el ácido nucleico o polinucleótido descrito así se haya retirado en sí mismo físicamente de su ambiente nativo. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico endógena en el genoma de un organismo se considera “aislada” en el presente documento si se coloca una secuencia heteróloga (es decir, una secuencia que no está adyacente de forma natural a esta secuencia de ácido nucleico endógena) adyacente a la secuencia de ácido nucleico endógena, de modo que la expresión de esta secuencia de ácido nucleico endógena se altere. Como ejemplo, una secuencia promotora no nativa puede sustituir (por ejemplo, por recombinación homóloga) al promotor nativo de un gen en el genoma de una célula humana, de modo que este gen tenga un patrón de expresión alterado. Este gen estaría ahora “aislado” porque está separado de al menos algunas de las secuencias que lo flanquean de forma natural. Un ácido nucleico también se considera “aislado” si contiene cualquier modificación que no aparezca de forma natural en el ácido nucleico correspondiente en un genoma. Por ejemplo, una secuencia codificante endógena se considera “aislada” si contiene una inserción, delección o una mutación puntual introducida de forma artificial, por ejemplo, mediante intervención humana. Un “ácido nucleico
50
55
60
65

aislado” también incluye un ácido nucleico integrado en un cromosoma de célula hospedadora en un sitio heterólogo, así como una construcción de ácido nucleico presente como un episoma. Además, un “ácido nucleico aislado” puede estar sustancialmente sin otro material celular, o sustancialmente sin medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente sin precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. La expresión también abarca moléculas de ácido nucleico y proteínas preparadas por expresión recombinante en una célula hospedadora así como moléculas de ácido nucleico y proteínas sintetizadas químicamente.

Unido operativamente: Una primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico está colocada en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente con una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, en la misma fase de lectura. Las configuraciones de genes separados que se transcriben en tándem como un único ARN mensajero se indican como operones. Por lo tanto colocar genes en proximidad estrecha, por ejemplo en un vector plasmídico, bajo la regulación transcripcional de un único promotor, constituye un operón sintético.

Purificado: El término purificado no requiere absoluta pureza: en su lugar, se entiende como un término relativo. Por lo tanto, por ejemplo, una preparación de producto purificado es una en la que el producto está más concentrado de lo que está el producto en su ambiente dentro de una célula. Por ejemplo, una cera purificada es una que está sustancialmente separada de componentes celulares (ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y otros péptidos) que pueden acompañarla. En otro ejemplo, una preparación de cera purificada es una en la que la cera está sustancialmente sin contaminantes, tales como los que pueden estar presentes después de fermentación.

Detectable: Capaz de determinarse su existencia o presencia usando diversos métodos analíticos como se describe a lo largo de la descripción o conocidos de otro modo por un experto en la materia.

Recombinante: Una molécula de ácido nucleico o proteína recombinante es una que tiene una secuencia que no es de origen natural, tiene una secuencia que se ha realizado por una combinación artificial de dos segmentos de secuencia de otro modo separados, o ambas. Esta combinación artificial puede conseguirse, por ejemplo, por síntesis química o por la manipulación artificial de segmentos aislados de moléculas de ácido nucleico o proteínas, tales como técnicas de ingeniería genética. Recombinante también se usa para describir moléculas de ácido nucleico que se han manipulado de forma artificial, pero contienen las mismas secuencias reguladoras y regiones codificantes que se encuentran en el organismo del que se aisló el ácido nucleico.

La expresión “**célula hospedadora recombinante**” (“**célula hospedadora de expresión**”, “**sistema hospedador de expresión**”, “**sistema de expresión**”, o simplemente “**célula hospedadora**”), como se usa en el presente documento, se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector recombinante, por ejemplo, un vector que comprende acil-CoA sintasa. Debería entenderse que se pretende que dichos términos se refieran no solamente a la célula objeto particular sino a la descendencia de dicha célula. Debido a que pueden aparecer ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero estar aún incluida dentro del alcance de la expresión “célula hospedadora” como se usa en el presente documento. Una célula hospedadora recombinante puede ser una célula aislada o línea celular cultivada en cultivo o puede ser una célula que reside en un tejido u organismo vivo.

Liberación: El movimiento de un compuesto desde el interior de una célula (intracelular) al exterior de una célula (extracelular). El movimiento puede ser activo o pasivo. Cuando la liberación es activa puede facilitarse por uno o más péptidos transportadores y en algunos ejemplos puede consumir energía. Cuando la liberación es pasiva, puede ser mediante difusión a través de la membrana y puede facilitarse por la recogida continuada del compuesto deseado del ambiente extracelular, promoviendo de este modo difusión adicional. La liberación de un compuesto también puede conseguirse lisando una célula.

Tensioactivos: Sustancias capaces de reducir la tensión superficial de un líquido en el que se disuelven. Típicamente están compuestos 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 usan en una diversidad de productos, incluyendo detergentes y productos de limpieza, y también se usan como adyuvantes para textiles, cuero y papel, en procesos químicos, en productos cosméticos y farmacéuticos, en la industria alimentaria y en la agricultura. Además, pueden usarse para ayudar en la extracción y el aislamiento de aceites crudos que se encuentran en ambientes de difícil acceso o como emulsiones en agua.

Hay cuatro tipos de tensioactivos caracterizados por diversos 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 se usan con frecuencia para tratar proteínas y polímeros sintéticos o son componentes de suavizantes para tela y acondicionadores para el pelo. Los tensioactivos anfotéricos también contienen hidrocarburos de cadena larga y se usan típicamente en champús. Los tensioactivos no iónicos se usan

generalmente en productos de limpieza.

Vector: El término “vector” como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico con el que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otros vectores incluyen cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y cromosomas artificiales de levadura (YAC). Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral (analizado con más detalle posteriormente). Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores que tienen un origen de replicación que actúa en la célula hospedadora). Otros vectores pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora, y se replican de este modo junto con el genoma hospedador. Además, ciertos vectores preferidos son capaces de dirigir la expresión de genes con los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión recombinante” (o simplemente, “vectores de expresión”). Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica.

Cera: Una variedad de ésteres de ácido graso que forma sustancias sólidas o flexibles en un conjunto identificado de condiciones físicas. Los ésteres de ácidos grasos que se denominan ceras generalmente tienen cadenas de carbono más largas que los ésteres de ácido graso que no son ceras. Por ejemplo, una cera generalmente forma una sustancia flexible a temperatura ambiente.

Éster graso: Incluye cualquier éster compuesto de un ácido graso. Las cadenas de carbono en 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 pueden modificarse por ingeniería genética para que sea corta o larga. Puede usarse cualquier alcohol para formar ésteres de ácido graso, por ejemplo alcoholes derivados de la ruta biosintética de ácidos grasos, alcoholes producidos por el hospedador de producción mediante rutas biosintéticas de ácidos no grasos, y alcoholes que se proporcionan en el caldo de fermentación.

Ácido graso: Incluye productos o derivados de los mismos realizados en parte a partir de la ruta biosintética de ácidos grasos del organismo hospedador. La ruta biosintética de ácidos grasos incluye enzimas ácido graso sintasas que pueden modificarse por ingeniería genética 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 tengan características de cadena de carbono deseadas. Los derivados de ácidos grasos ejemplares incluyen, por ejemplo, alcoholes de cadena corta y larga, hidrocarburos y ésteres de ácidos grasos incluyendo ceras.

Métodos generales para modificar por ingeniería genética microorganismos para producir productos basados en carbono

Los métodos para modificar por ingeniería genética microorganismos para producir productos basados en carbono se basan en principios de ingeniería metabólica, y usos, por ejemplo, rutas modificadas por ingeniería genética como se describen en, por ejemplo, los documentos WO 2007/136762 y WO 2007/139925 para realizar productos a partir de energía capturada por organismos fotoautotróficos. Generalmente, se producen productos basados en carbono de interés expresando un gen o conjunto de genes como se describe en la **Figura 1** en un microorganismo fotoautotrófico, por ejemplo, cianobacteria, como se describe en el presente documento. Se construyen plásmidos para expresar diversas proteínas que son útiles en la producción de productos basados en carbono, como se describe en los Ejemplos del presente documento, por ejemplo, **Ejemplo 1**. Las construcciones pueden realizarse sintéticamente o realizarse usando métodos de biología molecular convencionales y todos los genes clonados se ponen bajo el control de promotores constitutivos o promotores inducibles. Los plásmidos que contienen los genes de interés se transforman en el hospedador y se seleccionan transformantes correspondientes en placa LB complementada con antibióticos tales como espectinomicina, carbenicilina, etc. Usando técnicas de biología molecular convencionales, se transforman células en las que se ha introducido una molécula de ácido nucleico para expresar o sobreexpresar genes deseados mientras que otras moléculas de ácido nucleico se atenúan o se anulan funcionalmente. Las técnicas de transformación por las que puede introducirse una molécula de ácido nucleico en dicha célula, incluyen, pero sin limitación, transfección con vectores virales, conjugación, transformación con vectores plasmídicos e introducción de ADN desnudo por electroporación, lipofección y aceleración por pistola de partículas. Los transformantes se inoculan en un medio adecuado. Las muestras que contienen los transformantes se cultivan a temperaturas adecuadas en un agitador hasta que alcanzan una cierta DO. Después las células se sedimentan por centrifugación y se suspenden los sedimentos celulares. Las técnicas de separación permiten que la muestra se someta a análisis de GC/MS. Se determina el rendimiento total.

Microorganismos seleccionados o modificados por ingeniería genética para la producción de productos basados en carbono de interés

Microorganismo: Incluye especies microbianas procariotas y eucariotas de los dominios Archaea, Bacteria y

Eucarya, incluyendo esta última levadura y hongos filamentosos, protozoos, algas o Protistas superiores. Las expresiones “células microbianas” y “microbios” se usan de forma intercambiable con el término microorganismo.

Puede transformarse una diversidad de organismos hospedadores para producir un producto de interés. Los organismos fotoautotróficos incluyen algas, así como cianobacterias procarióticas, bacterias verdes del azufre, bacterias verdes no del azufre, bacterias púrpura del azufre y bacterias púrpuras no del azufre.

Los organismos adecuados incluyen extremófilos que soportan diversos parámetros ambientales tales como temperatura, radiación, presión, gravedad, vacío, desecación, salinidad, pH, tensión de oxígeno y productos químicos. Incluyen hipertermófilos, que crecen a o por encima de 80 °C tales como *Pyrolobus fumarii*; termófilos, que crecen entre 60-80 °C tales como *Synechococcus lividis*; mesófilos, que crecen entre 15-60 °C y psicrófilos, que crecen a o por debajo de 15 °C tales como *Psychrobacter* y algunos insectos. Los organismos tolerantes a radiación incluyen *Deinococcus radiodurans*. Los organismos tolerantes a presión incluyen piezófilos o barófilos que toleran presión de 130 MPa. También se contemplan organismos tolerantes a hipergravedad (por ejemplo, > 1 g) e hipogravedad (por ejemplo, < 1 g). Los organismos tolerantes al vacío incluyen tardígrados, insectos, microbios y semillas. Los organismos tolerantes a desecación y anhidrobióticos incluyen xerófilos tales como *Artemia salina*, nemátodos, microbios, hongos y líquenes. Los organismos tolerantes a salinidad incluyen los halófilos (por ejemplo, NaCl 2-5 M) *Halobacteriaceae* y *Dunaliella salina*. Los organismos tolerantes a pH incluyen alcalófilos tales como *Natronobacterium*, *Bacillus firmus* OF4, *Spirulina* spp. (por ejemplo, pH > 9) y acidófilos tales como *Cyanidium caldarium*, *Ferroplasma* sp. (por ejemplo, pH bajo). También se contemplan anaerobios, que no pueden tolerar O₂ tales como *Methanococcus jannaschii*; microaerófilos, que toleran algo de O₂ tales como *Clostridium* y aerobios, que requieren O₂. Los organismos tolerantes a gas, que toleran CO₂ puro incluyen *Cyanidium caldarium* y los organismos tolerantes a metales incluyen metalotolerantes tales como *Ferroplasma acidarmanus* (por ejemplo, Cu, As, Cd, Zn), *Ralstonia* sp. CH34 (por ejemplo, Zn, Co, Cd, Hg, Pb). Gross, Michael. Life on the Edge: Amazing Creatures Thriving in Extreme Environments. Nueva York: Plenum (1998) y Seckbach, J. “Search for Life in the Universe with Terrestrial Microbes Which Thrive Under Extreme Conditions” en Cristiano Batalli Cosmovici, Stuart Bowyer, y Dan Wertheimer, eds., Astronomical and Biochemical Origins and the Search for Life in the Universe, pág. 511. Milán: Editrice Compositori (1997).

Las algas y cianobacterias incluyen, pero sin limitación los siguientes géneros:

Acanthoceras, *Acanthococcus*, *Acaryochloris*, *Achnanthes*, *Achnanthidium*, *Actinastrum*, *Actinochloris*, *Actinocyclus*, *Actinotaenium*, *Amphichrysis*, *Amphidinium*, *Amphikrikos*, *Amphipleura*, *Amphiprora*, *Amphithrix*, *Amphora*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aneumastus*, *Ankistrodesmus*, *Ankyra*, *Anomoeoneis*, *Apatococcus*, *Aphanizomenon*, *Aphanocapsa*, *Aphanochaete*, *Aphanothece*, *Apiocystis*, *Apistonema*, *Arthrodesmus*, *Artherospira*, *Ascochloris*, *Asterionella*, *Asterococcus*, *Audouinella*, *Aulacoseira*, *Bacillaria*, *Balbiana*, *Bambusina*, *Bangia*, *Basichlamys*, *Batrachospermum*, *Binuclearia*, *Bitrichia*, *Blidingia*, *Botridiopsis*, *Botrydium*, *Botryococcus*, *Botryosphaerella*, *Brachiomonas*, *Brachysira*, *Brachytrichia*, *Brebissonia*, *Bulbochaete*, *Bumilleria*, *Bumilleriopsis*, *Caloneis*, *Calothrix*, *Campylodiscus*, *Capsosiphon*, *Carteria*, *Catena*, *Cavinula*, *Centritractus*, *Centronella*, *Ceratium*, *Chaetoceros*, *Chaetochloris*, *Chaetomorpha*, *Chaetonella*, *Chaetonema*, *Chaetopeltis*, *Chaetophora*, *Chaetosphaeridium*, *Chamaesiphon*, *Chara*, *Characiochloris*, *Characiopsis*, *Characium*, *Charales*, *Chilomonas*, *Chlainomonas*, *Chlamydolepharis*, *Chlamydocapsa*, *Chlamydomonas*, *Chlamydomonopsis*, *Chlamydomyxa*, *Chlamydonephris*, *Chlorangiella*, *Chlorangiopsis*, *Chlorella*, *Chlorobotrys*, *Chlorobrachis*, *Chlorochytrium*, *Chlorococcum*, *Chlorogloea*, *Chlorogloeopsis*, *Chlorogonium*, *Chlorolobion*, *Chloromonas*, *Chlorophysema*, *Chlorophyta*, *Chlorosaccus*, *Chlorosarcina*, *Choricystis*, *Chromophyton*, *Chromulina*, *Chroococcidiopsis*, *Chroococcus*, *Chroodactylon*, *Chroomonas*, *Chroothece*, *Chrysamoeba*, *Chrysapsis*, *Chrysidiastrium*, *Chrysocapsa*, *Chrysocapsella*, *Chrysochaete*, *Chrysochromulina*, *Chrysococcus*, *Chrysocrinus*, *Chrysolepidomonas*, *Chrysolykos*, *Chrysonebula*, *Chrysophyta*, *Chrysopyxis*, *Chrysosaccus*, *Chrysosphaerella*, *Chrysostephanosphaera*, *Clodophora*, *Clastidium*, *Closteriopsis*, *Closterium*, *Coccomyxa*, *Cocconeis*, *Coelastrella*, *Coelastrum*, *Coelosphaerium*, *Coenochloris*, *Coenococcus*, *Coenocystis*, *Colacium*, *Coleochaete*, *Collodictyon*, *Compsogonopsis*, *Compsopogon*, *Conjugatophyta*, *Conochaete*, *Coronastrum*, *Cosmarium*, *Cosmioneis*, *Cosmocladium*, *Crateriportula*, *Craticula*, *Crinallium*, *Crucigenia*, *Crucigeniella*, *Cryptoaulax*, *Cryptomonas*, *Cryptophyta*, *Ctenophora*, *Cyanodictyon*, *Cyanonephron*, *Cyanophora*, *Cyanophyta*, *Cyanothece*, *Cyanothomonas*, *Cyclonexis*, *Cyclostephanos*, *Cyclotella*, *Cylindrocapsa*, *Cylindrocystis*, *Cylindrospermum*, *Cylindrotheca*, *Cymatopleura*, *Cymbella*, *Cymbellonitzschia*, *Cystodinium*, *Dactylococcopsis*, *Debarya*, *Denticula*, *Dermatochrysis*, *Dermocarpa*, *Dermocarpella*, *Desmatractum*, *Desmidium*, *Desmococcus*, *Desmonema*, *Desmosiphon*, *Diacanthos*, *Diacronema*, *Diadesmis*, *Diatoma*, *Diatomella*, *Dicellula*, *Dichothrix*, *Dichotomococcus*, *Dicranochaete*, *Dictyochloris*, *Dictyococcus*, *Dictyosphaerium*, *Didymocystis*, *Didymogenes*, *Didymosphenia*, *Dilabifilum*, *Dimorphococcus*, *Dinobryon*, *Dinococcus*, *Diplochlois*, *Diploneis*, *Diplostauron*, *Distronella*, *Docidium*, *Draparnaldia*, *Dunaliella*, *Dysmorphococcus*, *Eccalocystis*, *Elakatothrix*, *Ellerbeckia*, *Encyonema*, *Enteromorpha*, *Entocladia*, *Entomoneis*, *Entophysalis*, *Epichrysis*, *Epipyxis*, *Epithemia*, *Eremosphaera*, *Euastropsis*, *Euastrum*, *Eucapsis*, *Eucocconeis*, *Eudorina*, *Euglena*, *Euglenophyta*, *Eunotia*, *Eustigmatophyta*, *Eutrepia*, *Fallacia*, *Fischerella*, *Fragilaria*, *Fragilariforma*, *Francia*, *Frustulia*, *Curcilla*, *Geminella*, *Genicularia*, *Glaucocystis*, *Glaucophyta*, *Glenodiniopsis*, *Glenodinium*, *Gloeocapsa*, *Gloeochaete*, *Gloeochrysis*, *Gloeococcus*, *Gloeocystis*, *Gloeodendron*, *Gloeomonas*, *Gloeoplax*, *Gloeothece*, *Gloeotila*, *Gloeotrichia*, *Gloiodictyon*, *Golenkinia*, *Golenkiniopsis*, *Gomontia*, *Gomphocymbella*, *Gomphonema*, *Gomphosphaeria*, *Gonatozygon*, *Gongrosia*, *Gongrosira*, *Goniochloris*, *Gonium*, *Gonyostomum*, *Granulochloris*, *Granulocystopsis*, *Groenbladia*, *Gymnodinium*,

Gymnozyga, Gyrosigma, Haematococcus, Hafniomonas, Hallassia, Hammatoidea, Hannaea, Hantzschia, Hapalosiphon, Haplotaenium, Haptophyta, Haslea, Hemidinium, Hemitoma, Heribaudiella, Heteromastix, Heterothrix, Hibberdia, Hildenbrandia, Hillea, Holopedium, Homoeothrix, Hormanthonema, Hormotila, Hyalobrachion, Hyalocardium, Hyalodiscus, Hyalogonium, Hyalotheca, Hydrium, Hydrococcus, Hydrocoleum, Hydrocoryne, Hydrodictyon, Hydrosera, Hydrurus, Hyella, Hymenomonas, Isthmochloron, Johannesbaptistia, Juranyiella, Karayevia, Kathablepharis, Katodinium, Kephyrion, Keratococcus, Kirchneriella, Klebsormidium, Kolbesia, Koliella, Komarekia, Korshikoviella, Kraskella, Lagerheimia, Lagynion, Lamprothamnium, Lemanea, Lepocinclis, Leptosira, Lobococcus, Lobocystis, Lobomonas, Luticola, Lyngbya, Malleochloris, Mallomonas, Mantoniella, Marssoniella, Martyana, Mastigocoleus, Gastogloia, Melosira, Merismopedia, Mesostigma, Mesotaenium, Micractinium, Micrasterias, Microchaete, Microcoleus, Microcystis, Microglana, Micromonas, Microspora, Microthamnion, Mischochlorella, Monochrysis, Monodus, Monomastix, Monoraphidium, Monostroma, Mougeotia, Mougeotiopsis, Myochloris, Myrmeconia, Myxosarcina, Naegeliella, Nannochloris, Nautococcus, Navicula, Neglectella, Neidium, Nephrocladus, Nephrocystis, Nephrodiella, Nephroselmis, Netrium, Nitella, Nitellopsis, Nitzschia, Nodularia, Nostoc, Ochromonas, Oedogonium, Oligochaetophora, Onychonema, Oocardium, Oocystis, Opephora, Ophiocystium, Orthosira, Oscillatoria, Oxyneis, Pachycladella, Palmella, Palmodyctyon, Phadodina, Pannus, Paralia, Pascherella, Paulschulzia, Pediculus, Pedinella, Pedinomonas, Pedinopera, Pelagodyctyon, Penium, Peranema, Peridiniopsis, Peridinium, Peronia, Petroneis, Phacotus, Phacus, Phaeaster, Phaeodermatium, Phaeophyta, Phaeosphaera, Phaeothamnion, Phormidium, Phycopeltis, Phyllariochloris, Phyllocladus, Phyllomitis, Pinnularia, Pitophora, Placoneis, Planctonema, Planktosphaeria, Planorbulina, Plectonema, Pleodorina, Pleurastrum, Pleurocapsa, Pleurocladia, Pleurodiscus, Pleurosira, Pleurotaenium, Pseudomonas, Podocladus, Polyblepharides, Polychaetophora, Polyedriella, Polyedriopsis, Polygoniobryon, Polyepidomonas, Polytaenia, Polytoma, Polytomella, Porphyridium, Posterochloromonas, Prasinocladus, Prasinocladus, Prasinophyta, Prasiola, Prochlorophyta, Prochlorothrix, Protoderma, Protosiphon, Provasoliella, Prymnesium, Psammodyctyon, Psammothidium, Pseudanabaena, Pseudonocardium, Pseudocarteria, Pseudochate, Pseudocharacium, Pseudococcomyxa, Pseudodictyosphaerium, Pseudokephyrion, Pseudonocardia, Pseudoquadrigula, Pseudosphaerocystis, Pseudostaurastrum, Pseudostaurastrum, Pseudotetrastrium, Pteromonas, Punctastrum, Pyramichlamys, Pyramimonas, Pyrrophyta, Quadricoccus, Quadrigula, Radiococcus, Radiophilum, Raphidiopsis, Raphidocelis, Raphidonema, Raphidophyta, Peimeria, Rhabdoderma, Rhabdomonas, Rhizoclonium, Rhodomonas, Rhodophyta, Rhoicosphenia, Rhopalodia, Rivularia, Rosenvingiella, Rossithidium, Roya, Scenedesmus, Scherffelia, Schizochlamydia, Schizochlamys, Schizomeris, Schizothrix, Schroederia, Scolioneis, Scotiella, Scotiellopsis, Scourfieldia, Scytonema, Selenastrum, Selenochloris, Sellaphora, Semiorbis, Siderocelis, Diderocystopsis, Dimonsenia, Siphononema, Sirocladium, Sirogonium, Skeletonema, Sorastrum, Spermatozopsis, Sphaerellopsis, Sphaerellopsis, Sphaerodinium, Sphaeroplea, Sphaerzosma, Spiniferomonas, Spirogyra, Spirotaenia, Spirulina, Spondylomorpha, Spondylosium, Sporotetras, Spumella, Staurastrum, Staurerodesmus, Stauroneis, Staurorsira, Staurorsirella, Stenopterobia, Stephanocostis, Stephanodiscus, Stephanoporos, Stephanosphaera, Stichococcus, Stichogloia, Stigeoclonium, Stigonema, Stipitococcus, Stokesiella, Strombomonas, Stylochrysalis, Stylodinium, Styloxyis, Stylosphaeridium, Surirella, Sykidion, Symploca, Synechococcus, Synechocystis, Synedra, Synochromonas, Synura, Tabellaria, Tabularia, Teilingia, Temnogametum, Tetmemorus, Tetrachlorella, Tetracyclus, Tetradismus, Tetradella, Tetradion, Tetraselmis, Tetraspora, Tetrastrum, Thalassiosira, Thamniochaete, Thorakochloris, Thorea, Tolypella, Tolypothrix, Trachelomonas, Trachydiscus, Trebouxia, Trentepohlia, Treubaria, Tribonema, Trichodesmium, Trichodiscus, Trochiscia, Tryblionella, Ulothrix, Uroglena, Uronema, Urosolenia, Urospora, Uva, Vacuolaria, Vaucheria, Volvox, Volvulina, Westella, Wołoszynskia, Xanthidium, Xanthophyta, Xenococcus, Zygnema, Zygnemopsis y Zygonium.

45 Las bacterias verdes no del azufre incluyen pero sin limitación los siguientes géneros: *Chloroflexus*, *Chloronema*, *Oscillochloris*, *Heliobacter*, *Herpetosiphon*, *Roseiflexus* y *Thermomicrobium*.

Las bacterias verdes del azufre incluyen pero sin limitación los siguientes géneros: *Chlorobium*, *Clathrochloris*, y *Prosthecochloris*.

50 Las bacterias púrpuras del azufre incluyen pero sin limitación los siguientes géneros: *Allochrocatium*, *Chromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Rhodovulum*, *Thermochromatium*, *Thiocapsa*, *Thiorhodococcus*, y *Thiocystis*.

55 Las bacterias púrpuras no del azufre incluyen pero sin limitación los siguientes géneros: *Phaeosporillum*, *Rhodobaca*, *Rhodobacter*, *Rhodomicrobium*, *Rhodopila*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodothalassium*, *Rhodospirillum*, *Rhodovibrio* y *Roseospora*.

60 Las bacterias quimiolitotróficas aerobias incluyen pero sin limitación bacterias nitrificantes tales como *Nitrobacteraceae* sp., *Nitrobacter* sp., *Nitrospina* sp., *Nitrococcus* sp., *Nitrospira* sp., *Nitrosomonas* sp., *Nitrosococcus* sp., *Nitrosospora* sp., *Nitrosolobus* sp., *Nitrososphaera* sp.; bacterias incoloras del azufre tales como, *Thiovulum* sp., *Thiobacillus* sp., *Thiomicrospira* sp., *Thiosphaera* sp., *Thermothrix* sp.; bacterias del hidrógeno quimiolitotróficas obligatorias tales como *Hydrogenobacter* sp., bacterias oxidantes y/o depositantes de hierro y manganeso tales como *Siderococcus* sp., y bacterias magnetotáticas tales como *Aquaspirillum* sp.

65

Las arqueobacterias incluyen pero sin limitación arqueobacterias metanogénicas tales como *Methanobacterium* sp., *Methanobrevibacter* sp., *Methanothermus* sp., *Methanococcus* sp., *Methanomicrobium* sp., *Methanospirillum* sp., *Methanogenium* sp., *Methanosarcina* sp., *Methanolobus* sp., *Methanotherix* sp., *Methanococcoides* sp., *Methanoplanus* sp.; metabolizadores del azufre extremadamente termófilos tales como *Thermoproteus* sp., *Pyrodictium* sp., *Sulfolobus* sp., *Acidianus* sp. y otros microorganismos tales como, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces* sp., *Ralstonia* sp., *Rhodococcus* sp., *Corynebacteria* sp., *Brevibacteria* sp., *Mycobacteria* sp. y levadura oleaginosas.

La conversión hiperfotosintética requiere modificación genética extensiva; por lo tanto, en realizaciones preferidas el organismo fotoautotrófico parental puede transformarse con ADN exógeno.

Los organismos preferidos para conversión hiperfotosintética incluyen: *Botryococcus braunii*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Dunaliella salina* (algas), *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (cianobacterias), *Chlorobium tepidum* (bacterias verdes del azufre), *Chloroflexus auranticus* (bacterias verdes no del azufre), *Chromatium tepidum* y *Chromatium vinosum* (bacterias púrpuras del azufre), *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodopseudomonas palustris* (bacterias púrpuras no del azufre).

Otros organismos adecuados más incluyen células sintéticas o células producidas por genomas sintéticos como se describen en Venter *et al.* Patente de Estados Unidos publicada N ° 2007/0264688, y sistemas de tipo celular o células sintéticas como se describen en Glass *et al.* Patente de Estados Unidos publicada N° 2007/0269862.

Otros organismos adecuados más incluyen microorganismos que pueden modificarse por ingeniería genética para fijar dióxido de carbono, bacterias tales como *Escherichia coli*, *Acetobacter acetii*, *Bacillus subtilis*, levadura y hongos tales como *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium thermocellum*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pseudomonas fluorescens* o *Zymomonas mobilis*.

Un tema común en la selección o modificación por ingeniería genética de un organismo adecuado es la fijación autotrófica del carbono, tal como CO₂ a productos. Esto abarcaría fotosíntesis y metanogénesis. También se abarca la acetogénesis, que abarca los tres tipos de fijación de CO₂; ciclo de Calvin, ruta de acetil CoA y ruta de TCA reductora. La capacidad para usar dióxido de carbono como la única fuente de carbono celular (autotrofia) se encuentra en casi todas las grupos principales de procariotas. Las rutas de fijación de CO₂ difieren entre grupos, y no hay un claro patrón de distribución de las cuatro rutas autotróficas conocidas en la actualidad. Fuchs, G. 1989. Alternative pathways of autotrophic CO₂ fixation, pág. 365-382. En HG Schlegel, y B. Bowien (ed.), Autotrophic bacteria Springer-Verlag, Berlín, Alemania. El ciclo reductor de pentosa fosfato (ciclo de Calvin-Bassham-Benson) representa la ruta de fijación de CO₂ en casi todas las bacterias autotróficas aerobias, por ejemplo, las cianobacterias.

Propagación de microorganismos seleccionados

Se conocen bien por los expertos en la materia métodos para el cultivo de organismos fotosintéticos en medio líquido y en placas que contienen agarosa (véase, por ejemplo, sitios web asociados con ATCC, y con el Instituto Pasteur). Por ejemplo, las células de *Synechococcus* sp. PCC 7002 (disponible de la Colección de Cultivo Pasteur de cianobacterias) se cultivan en medio BG-11 (NaNO₃ 17,65 mM, K₂HPO₄ 0,18 mM, MgSO₄ 0,3 mM, CaCl₂ 0,25 mM, ácido cítrico 0,03 mM, citrato férrico de amonio 0,03 mM, EDTA 0,003 mM, Na₂CO₃ 0,19 mM, H₃BO₃ 2,86 mg/l, MnCl₂ 1,8 mg/l, ZnSO₄ 0,222 mg/l, Na₂MoO₄ 0,390 mg/l, CuSO₄ 0,079 mg/l y Co(NO₃)₂ 0,049 mg/l, pH 7,4) complementado con biotina 16 µg/l, MgSO₄ 20 mM, KCl 8 mM y NaCl 300 mM (véase, por ejemplo, un sitio web asociado con el Instituto Pasteur y Price GD, Woodger FJ, Badger MR, Howitt SM, Tucker L. "Identification of a SulP-type bicarbonate transporter in marine cyanobacteria." Proc Natl. Acad. Sci. USA (2004) 101 (52):18228-33). Típicamente, los cultivos se mantienen a 28 °C y se burbujan continuamente con CO₂ al 5 % bajo una intensidad de luz de 120 µmol de fotones/m²/s. Como alternativa, como se describe en el **Ejemplo 1**, las células de *Synechococcus* sp. PCC 7002 se cultivan en medio A⁺ como se ha descrito previamente [Frigaard NU *et al.* (2004) "Gene inactivation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 and the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* using in vitro-made DNA constructs and natural transformation" Methods Mol. Biol., 274:325-340].

Thermosynechococcus elongatus BP-1 (disponible del Kazusa DNA Research Institute, Japón) se propaga en medio BG11 complementado con TES-KOH 20 mM (pH 8,2) como se ha descrito previamente [Iwai M, Katoh H, Katayama M, Ikeuchi M. "Improved genetic transformation of the thermophilic cyanobacterium, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1" Plant Cell Physiol (2004). 45 (2):171-175]. Típicamente, los cultivos se mantienen a 50 °C y se burbujan continuamente con CO₂ 5 % bajo una intensidad de luz de 38 µmol de fotones/m²/s. *T. elongatus* BP-1 puede cultivarse en medio A⁺ también como se describe en el **Ejemplo 2**.

Chlamydomonas reinhardtii (disponible de la colección de cultivo del centro de *Chlamydomonas* mantenido por la Universidad de Duke, Durham, Carolina del Norte) se cultivan en medio salino mínimo consistente en K₂HPO₄ 143 mg/l, KH₂PO₄ 73 mg/l, NH₄NO₃ 400 mg/l, MgSO₄ 100 mg/l, CaCl₂-2H₂O 50 mg/l, reserva de oligoelementos 1 ml/l y MOPS 2,0 M 10 ml/l valorado con base de Tris a pH 7,6 como se ha descrito (Geraghty AM, Anderson JC,

Spalding MH. "A 36 kilodalton limiting-CO₂ induced polypeptide of *Chlamydomonas* is distinct from the 37 kilodalton periplasmic anhydrase" *Plant Physiol* (1990);93:116-121). Típicamente, los cultivos se mantienen a 24 °C y se burbujan con CO₂ al 5 % en aire, bajo una intensidad de luz de 60 µmol de fotones/m²/s.

- 5 Lo anterior define las condiciones de propagación típicas. Según sea apropiado, se realizan incubaciones usando composiciones de gas o medios alternativas, temperaturas (5 - 75 °C) y/o flujos de luz (0-5500 µmol de fotones/m²/s) alternativos.

- 10 La luz se suministra a través de una diversidad de mecanismos, incluyendo iluminación natural (luz solar), bombillas convencionales incandescentes, fluorescentes o halógenas, o mediante propagación en cámaras de cultivo iluminadas diseñadas especialmente (por ejemplo la Cámara de Cultivo Iluminada Modelo LI15 (Sheldon Manufacturing, Inc. Cornelius, OR). Para experimentos que requieran longitudes de onda y/o intensidades específicas, la luz se distribuye mediante diodos emisores de luz (LED), en los que los espectros de longitud de onda y la intensidad pueden controlarse cuidadosamente (Philips).

- 15 Se proporciona dióxido de carbono mediante inclusión de complementos de medios sólidos (es decir, bicarbonato sódico) o como un gas mediante su distribución al incubador medio de cultivo. La mayoría de los experimentos se realizan usando gas de dióxido de carbono concentrado, a concentraciones entre 1 y 30 %, que se burbujea directamente en el medio de crecimiento a velocidades suficientes para proporcionar mezcla para los organismos.
- 20 Cuando se utiliza gas de dióxido de carbono concentrado, el gas se origina en forma pura a partir de cilindros disponibles en el mercado, o preferentemente a partir de fuentes concentradas incluyendo descarga gaseosa o gas de escape de plantas de carbón, refinerías, instalaciones de producción de cemento, instalaciones de gas natural, fábricas de cerveza y similares.

25 **Transformación de microorganismos seleccionados**

- Se transforman células de *Synechococcus* sp. PCC 7002 de acuerdo con el protocolo optimizado previamente descrito [Essich ES, Stevens Jr E, Porter RD "Chromosomal Transformation in the Cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*". *J Bacteriol* (1990). 172 (4):1916-1922]. Las células se cultivan en medio A (NaCl 18 g/l, MgSO₄ 5 g/l Na₂EDTA 30 mg/l, KCl 600 mg/l, CaCl₂·2 H₂O 370 mg/l, NaNO₃ 1 g/l, KH₂PO₄ 50 mg/l, base de Trizma 1 g/l pH 8,2, vitamina B12 4 µg/l, FeCl₃·6 H₂O 3,89 mg/l, H₃BO₃ 34,3 mg/l, MnCl₂·4H₂O 4,3 mg/l, ZnCl₂ 315 µg/l, MoO₃ 30 µg/l, CuSO₄·5H₂O 3 µg/l, CoCl₂·6H₂O 13,2 µg/l) [Stevens SE, Patterson COP, y Myers J. "The production of hydrogen peroxide by green algae: a survey" *J. Phycology* (1973). 9:427-430] más 5 g/l de NaNO₃ a aproximadamente 108 células/ml. Se mezclan nueve volúmenes de células con 1 volumen de ADN 1-10 µg/ml en NaCl 0,15 M/Na₃ citrato 0,015 M y se incuban a 27-30 °C durante 3 horas antes de la adición de 1 volumen de DNase a una concentración final de 10 µg/ml. Las células se siembran en 2,5 ml de agar con superposición de medio A 0,6 % que se atemperó a 45 °C y se incubó. Las células se expusieron a antibiótico poniendo por debajo 2,0 ml de agar de medio A 0,6 % que contenía concentración apropiada de antibiótico con una pipeta Pasteur estéril. Los transformantes se seleccionaron 3-4 después. Las selecciones se realizan típicamente usando kanamicina 200 µg/ml, cloranfenicol 8 µg/ml, espectinomomicina 10 µg/ml en medio sólido, mientras que se emplean kanamicina 150 µg/ml, cloranfenicol 7 µg/ml y espectinomomicina 5 µg/ml en medio líquido.

- Se transforman células *T. elongatus* BP-1 de acuerdo con el protocolo optimizado previamente descrito (Iwai M, Katoh H, Katayama H, e Ikeuchi).

- Se transforman *E. coli* usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, incluyendo choque térmico de células químicamente competentes y electroporación [Berger y Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology* volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, California.; Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2ª ed.) Vol 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY.; y *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel *et al.*, Eds., Current Protocols, una empresa en participación entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (hasta e incluyendo el Suplemento de 1997)].

- Las rutas biosintéticas como se describen en el presente documento se ensayan en primer lugar y se optimizan usando plásmidos episódicos descritos anteriormente. Las optimizaciones no limitantes incluyen intercambio de promotor y ajuste, manipulación del sitio de unión a ribosomas, alteración del orden génico (por ejemplo, gen ABC frente a BAC, CBA, CAB, BCA), co-expresión de chaperonas moleculares, mutagénesis aleatoria o dirigida de secuencias génicas para aumentar o reducir la actividad, plegamiento o regulación alostérica, expresión de secuencias génicas de especies alternativas, manipulación codónica, adición o retirada de secuencias de dirección intracelular tales como secuencias señal, y similares.

- Cada gen o ácido nucleico modificado por ingeniería genética se optimiza de forma individual o, como alternativa, en paralelo. Se integran posteriormente secuencias promotoras y génicas funcionales en el cromosoma de *E. coli* para permitir la propagación estable en ausencia de presión selectiva (es decir, inclusión de antibióticos) usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia.

La **Figura 1** enumera genes implicados en la producción de productos basados en carbono de interés, relacionados con rutas asociadas, Números de la Comisión de Enzimas (EC), nombres de genes ejemplares, organismo fuente, números de referencia de GenBank, y homólogos de fuentes alternativas. Cuando el organismo parental codifica un gen con la actividad enzimática indicada, es útil sobreexpresar estos componentes o al menos atenuar estos componentes como se indica. En algunas circunstancias, la secuencia de la enzima nativa puede sobreexpresarse o atenuarse. En otras circunstancias, es útil sobreexpresar o atenuar un gen exógeno, que permite un control regulador más explícito en el proceso biológico y un medio para mitigar potencialmente los efectos de la regulación del metabolismo central, que se centra en torno a los genes nativos de forma explícita.

10 Producción de Etanol

La **Figura 2** proporciona una ruta para producir etanol, succinato y derivados de los mismos.

Hasta la fecha, los rendimientos actuales de etanol producidos en cianobacterias no son adecuados para producción comercial a 1,3 mM por DO₇₃₀ por día, como se desvela en el documento WO 2007/084477, o 1,7 μmol de etanol por mg de clorofila por hora, como se muestra en la Patente de Estados Unidos N° 6.699.696.

La presente invención, por lo tanto, proporciona una célula hospedadora capaz de fijar CO₂ que produce etanol a un nivel comercial, por ejemplo, entre aproximadamente 50 y 150 g/l en un período de aproximadamente 48 horas. En ciertas realizaciones, la velocidad de productividad de etanol está en el intervalo de aproximadamente 2,5 g/l-h a aproximadamente 5 g/l-h. En una realización, se modifica por ingeniería genética una célula hospedadora capaz de fijar CO₂ tal como una cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7002 para expresar genes tales como *pdh* y/o *adh* como se desvela. Dicho microorganismo recombinante codifica actividad PDC que convierte ácido pirúvico en acetaldehído y/o actividad ADH que convierte acetaldehído en etanol. La capacidad del microorganismo transformado para fijar CO₂ evita la necesidad de complementar con azúcares o biomasa. En consecuencia, los microorganismos de la presente invención son alternativas atractivas para producir biocombustibles. La presente invención proporciona el p/v de etanol para que sea de al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 125 o al menos 150 g/l o producido de otro modo a escala comercial.

30 Selección de enzimas y enzimas óptimas

En la actualidad, los productos de fermentación tales como etanol, butanol, ácido láctico, formiato, acetato producido en organismos biológicos emplean un procedimiento dependiente de NADH. Se usa NAD para degradar la glucosa u otras fuentes de azúcares para formar NADH. El NADH se recicla durante la fermentación a NAD⁺ para permitir degradación de azúcares adicional, que da como resultado productos secundarios de fermentación. Durante la fotosíntesis, sin embargo, la célula forma NADPH, que se usa principalmente para operaciones biosintéticas en organismos biológicos, por ejemplo, célula para cultivo, división y para acumular almacenes químicos tales como glucógeno, sacarosa y otras macromoléculas. Se producen productos de fermentación a la luz, pero en cantidades pequeñas.

Usar enzimas naturales o modificadas por ingeniería genética que utilizan NADPH como una fuente para reducir la energía en lugar de NADH permitiría el uso directo de energía reductora fotosintética para la formación de productos secundarios normalmente fermentativos. En consecuencia, la presente invención proporciona un método para producir etanol que comprende cultivar una célula hospedadora que está modificada genéticamente para comprender un ácido nucleico modificado por ingeniería genética exógeno que codifica una actividad alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH. Esta es una mejora con respecto a métodos previos de uso de organismos tales como algas para acumular almacenes de productos químicos, que posteriormente se usan para realizar productos de fermentación por la noche o el uso externo de organismos separados. En efecto, los productos fermentativos se forman a mayores eficacias directamente a la luz durante la fotosíntesis. Además, la producción obligatoria de macromoléculas a alta concentración se alivia durante el día, produciendo dichos productos directamente durante el día.

Las enzimas dependientes de NADPH que producen normalmente productos fermentados son poco habituales en la naturaleza. En consecuencia, en ciertos aspectos de la invención, se produce etanol en organismos que expresan o modificados para expresar HUC22-1 de *Moorella* sp. o un homólogo del mismo que incluye al menos tres alcohol deshidrogenasas tales como AdhA (referencia de NCBI YP_430754). Se ha demostrado previamente que esta enzima usa preferentemente NADP como un cofactor a diferencia de NAD y produce etanol a tasas altas a partir de acetaldehído ["Characterization of enzymes involved in the ethanol production of *Moorella* sp. HUC22-1"]. Co-expresando este gen en organismos seleccionados, tales como cianobacterias, el NADPH₂ formado durante la fotosíntesis puede usarse directamente para formar etanol en estos organismos. Como alternativa, las enzimas que usan de forma natural NADH pueden modificarse por ingeniería genética usando técnicas de ingeniería proteica establecidas para requerir NADPH₂ en lugar de NADH.

En ciertas realizaciones, AdhA dependiente de NADPH de *Moorella* se co-expresa con piruvato descarboxilasa de *Zymomonas mobilis* en cianobacterias para derivar un proceso eficaz para la producción de etanol dependiente de NADPH como un cofactor en lugar del NADH tradicional. Dichos organismos transgénicos son capaces de realizar

etanol usando procesos dependientes de NADPH.

Polinucleótidos aislados

5 Se describen en el presente documento moléculas de ácido nucleico aisladas para el gen *adHA* y variantes del mismo. La secuencia de ácido nucleico de longitud completa para este gen, que codifica la enzima alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP, EC. 1.1.1.2, se ha identificado y secuenciado. La SEC ID N° 1 representa la secuencia codificante optimizada para expresión y codón para el gen *adhAZ* de *Moorella* sp. HUC22-1.

10 La célula de la presente invención puede comprender una molécula de ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia que es una versión optimizada para expresión y codón del gen *adHA* de tipo silvestre. En una realización adicional, la célula de la presente invención puede comprender una molécula de ácido nucleico y homólogos, variantes y derivados de SEC ID N° 1 que comprenden o consisten en una secuencia que es una variante del gen *adHA* que tiene al menos 77,1 % de identidad con SEC ID N° 1. La secuencia de ácido nucleico
15 puede ser preferentemente, 78 %, 79 %, 80 %, 81 % - 85 %, 90 % - 95 %, 96 % - 98 %, 99 %, 99,9 % o aún mayor identidad con SEC ID N° 1.

En otra realización, la célula de la invención comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2.

20 Las moléculas de ácido nucleico pueden hibridar en condiciones rigurosas con las moléculas de ácido nucleico anteriormente descritas. Como se ha definido anteriormente, y como se conoce bien en la técnica, se realizan hibridaciones rigurosas a aproximadamente 25 °C por debajo del punto de fusión térmico (T_m) para el híbrido de ADN específico en un conjunto de condiciones particulares, en las que la T_m es la temperatura a la que el 50 % de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente coincidente. Se realiza lavado riguroso a temperaturas
25 aproximadamente 5 °C más bajas que la T_m para el híbrido de ADN específico en un conjunto particular de condiciones.

30 También se describen moléculas de ácido nucleico que comprenden un fragmento de una cualquiera de las secuencias de ácido nucleico anteriormente descritas. Estos fragmentos preferentemente contienen al menos 20 nucleótidos contiguos. Más preferentemente, los fragmentos de las secuencias de ácido nucleico contienen al menos 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o aún más nucleótidos contiguos.

35 Los fragmentos de secuencia de ácido nucleico presentan utilidad en una diversidad de sistemas y métodos. Por ejemplo, los fragmentos pueden usarse como sondas en diversas técnicas de hibridación. Dependiendo del método, las secuencias de ácido nucleico diana pueden ser ADN o ARN. Las secuencias de ácido nucleico diana pueden fraccionarse (por ejemplo, por electroforesis en gel) antes de la hibridación, o la hibridación puede realizarse en muestras *in situ*. Un experto en la materia apreciará que las sondas de ácido nucleico de secuencia conocida encuentran utilidad en la determinación de la estructura cromosómica (por ejemplo, por transferencia de Southern) y
40 en la medición de la expresión génica (por ejemplo, por transferencia de Northern). En dichos experimentos, los fragmentos de secuencia se marcan preferentemente de forma detectable, de modo que su hibridación específica con secuencias diana puede detectarse y opcionalmente cuantificarse. Un experto en la materia apreciará que los fragmentos de ácido nucleico pueden usarse en una amplia diversidad de técnicas de transferencia no descritas específicamente en el presente documento.

45 También debería apreciarse que los fragmentos de secuencia de ácido nucleico desvelados en el presente documento también encuentran utilidad como sondas cuando se inmovilizan en micromatrices. Se conocen bien en la técnica métodos para crear micromatrices por deposición y fijación de ácidos nucleicos en sustratos de soporte. Revisado en DNA Microarrays: A Practical Approach (Practical Approach Series), Schena (ed.), Oxford University Press (1999) (ISBN: 0199637768); Nature Genet. 21(1) (supl):1-60 (1999); Microarray Biochip: Tools and Technology, Schena (ed.), Eaton Publishing Company/BioTechniques Books Division (2000) (ISBN: 1881299376). El análisis de, por ejemplo, la expresión génica usando micromatrices que comprenden fragmentos de secuencia de ácido nucleico, tales como los fragmentos de secuencia de ácido nucleico desvelados en el presente documento, es una utilidad bien establecida para fragmentos de secuencia en el campo de la biología celular y molecular. Otros
50 usos para fragmentos de secuencias inmovilizados en micromatrices se describen en Gerhold *et al.*, Trends Biochem. Sci. 24:168-173 (1999) y Zweiger, Trends Biotechnol. 17:429-436 (1999); DNA Microarrays: A Practical Approach (Practical Approach Series), Schena (ed.), Oxford University Press (1999) (ISBN: 0199637768); Nature Genet. 21 (1) (supl):1-60 (1999); Microarray Biochip: Tools and Technology, Schena (ed.), Eaton Publishing Company/BioTechniques Books Division (2000) (ISBN: 1881299376).

60 Se desvelan moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican el polipéptido AdHA dependiente de NADPH que comprende actividad alcohol deshidrogenasa. Como se conoce bien en la técnica, las actividades enzimáticas pueden medirse de diversas maneras. Por ejemplo, la pirofosforólisis de OMP puede seguirse de forma espectroscópica. Grubmeyer *et al.*, J. Biol. Chem. 268:20299-20304 (1993). Como alternativa, la actividad de la enzima puede seguirse usando técnicas cromatográficas, tales como cromatografía líquida de alto rendimiento. Chung y Sloan, J. Chromatogr. 371:71-81 (1986). Como otra alternativa la actividad puede medirse indirectamente
65

determinando los niveles de producto realizado de la actividad enzimática. Estos niveles pueden medirse con técnicas que incluyen extracción de metanol/cloroformo acuoso como se conocen y se describen en la técnica (consúltese M. Kates (1986) *Techniques of Lipidology; Isolation, analysis and identification of Lipids*. Elsevier Science Publishers, Nueva York (ISBN: 0444807322)). Las técnicas más modernas incluyen el uso de cromatografía de gases ligada a espectrometría de masas (Niessen, W. M. A. (2001). *Current practice of gas chromatography—mass spectrometry*. Nueva York, N.Y: Marcel Dekker. (ISBN: 0824704738)). Pueden usarse técnicas modernas adicionales para identificación de actividad proteica recombinante y productos incluyen espectrometría de masas-cromatografía líquida (LCMS), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), electroforesis capilar, espectrometría de masas- desorción e ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS), resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR), viscosimetría (Knothe, G., R. O. Dunn, y M. O. Bagby. 1997. Biodiesel: The use of vegetable oils and their derivatives as alternative diesel fuels, *Am. Chem. Soc. Symp. Serie 666*: 172-208), valoración para determinar ácidos grasos libres (Komers, K., F. Skopal y R. Stloukal. 1997. Determination of the neutralization number for biodiesel fuel production. *Fett/Lipid* 99 (2): 52-54), métodos enzimáticos (Bailer, J., y K. de Hueber. 1991. Determination of saponifiable glycerol in “bio-diesel”. Fresenius J. Anal. Chem. 340 (3): 186), métodos basados en propiedades físicas, métodos químicos húmedos, etc. para analizar los niveles y la identidad del producto producido por los organismos de la presente invención. También pueden ser adecuados otros métodos y técnicas para la medición de la actividad enzimática, como se conocerá por un experto en la materia.

También se describen vectores, incluyendo vectores de expresión, que comprenden las moléculas de ácido nucleico anteriores. Los vectores pueden incluir las moléculas de ácido nucleico anteriormente descritas unidas operativamente con una o más secuencias de control de la expresión. Los vectores pueden por lo tanto usarse para expresar un polipéptido AdHA dependiente de NADPH que comprende actividad alcohol deshidrogenasa.

Polipéptidos aislados

También se describen polipéptidos aislados (incluyendo muteínas, variantes alélicas, fragmentos, derivados y análogos) codificados por las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente. El polipéptido aislado puede comprender la secuencia polipeptídica correspondiente a SEC ID N° 2. El polipéptido aislado puede comprender una secuencia polipeptídica a al menos 71,1 % idéntica a SEC ID N° 2. Preferentemente el polipéptido aislado tiene 72 %, 73 % - 75 %, 76 % - 80 %, 81 % - 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98,1 %, 98,2 %, 98,3 %, 98,4 %, 98,5 %, 98,6 %, 98,7 %, 98,8 %, 98,9 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o aún mayor identidad con SEC ID N° 2.

Se describen polipéptidos aislados que comprenden un fragmento de las secuencias polipeptídicas anteriormente descritas. Estos fragmentos incluyen preferentemente al menos 20 aminoácidos contiguos, más preferentemente al menos 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o aún más aminoácidos contiguos.

Los polipéptidos también incluyen fusiones entre las secuencias polipeptídicas anteriormente descritas y polipéptidos heterólogos. Las secuencias heterólogas pueden, por ejemplo, incluir secuencias diseñadas para facilitar la purificación, por ejemplo, marcadores de histidina y/o visualización de proteínas expresadas de forma recombinante. Otros ejemplos no limitantes de fusiones proteicas incluyen las que permiten la presentación de la proteína codificada en la superficie de un fago o una célula, fusiones con proteínas intrínsecamente fluorescentes, tales como proteína verde fluorescente (GFP) y fusiones con la región Fc de IgG.

Resultados de enzimas óptimas

Se observa nivel aumentado de etanol modificando por ingeniería genética células hospedadoras para que tengan actividad alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH. Los métodos para producir aumento del nivel de etanol comprenden la expresión de dichos genes *adHA* dependientes de NADPH como se describe en el presente documento.

En ciertos aspectos de la invención, se producen niveles aumentados de etanol de al menos aproximadamente 249 mg/l de etanol durante 72 horas. Más preferentemente, se producen al menos aproximadamente 297 mg/l de etanol durante 72 horas (**Figura 6**).

En otros aspectos de la invención, se producen niveles reducidos de acetaldehído. En realizaciones preferidas, se producen menos de aproximadamente 14 mg/l de acetaldehído (**Figura 7**).

Además, en otros aspectos de la invención, se producen métodos para producir mayor cantidad de etanol en relación con DO aumentada. En realizaciones preferidas, se producen al menos aproximadamente 36 mg/l de etanol por DO. Más preferentemente, se producen al menos aproximadamente 47 mg/l de etanol por DO (**Figura 8**).

En consecuencia, se muestra en el presente documento que la expresión de dichas enzimas dependientes de NADPH para generar productos fermentativos tales como etanol aumenta los niveles de etanol, reduce los niveles de acetaldehído y de hecho permite el aumento de la producción de etanol en función de DO.

Independencia de nutrientes

En otro aspecto, además de CO₂ y luz, los organismos fotoautotróficos típicamente requieren fuentes de nutrientes inorgánicos y vitaminas. Los nutrientes requeridos generalmente se usan para complementar el medio de crecimiento durante la propagación a escala experimental de dichos organismos. Sin embargo, dichos nutrientes son prohibitivamente caros en el contexto del bioprocesamiento a escala industrial.

La vitamina B12 es un cofactor vitamínico que facilita la catalización de reacción basada en radicales. Muchos organismos, incluyendo *Synechococcus* sp. PCC 7002, requieren fuentes externas de vitamina B12 para su crecimiento, lo que es prohibitivamente caro en bioprocesamiento industrial a gran escala. En una realización, la necesidad de vitamina B12 se evita modificando por ingeniería genética células fotoautotróficas para que expresen la ruta de biosíntesis de vitamina B12 como se desvela en el documento PCT/US2008/083056, presentado el 10 de noviembre de 2008. Una ruta de biosíntesis ejemplar hallada en *Salmonella typhimurium* se sobreexpresa, incluyendo pero sin limitación los siguientes genes que codifican las secuencias de aminoácidos expuestas en (Uroporfirin-III C-metiltransferasa (CysG), EC 2.1.1.107, locus NP_462380), (Sirohidroclorin cobaltoquelatasa (CbiK), EC 4.99.1.3, locus NP_460970), (Precorrin-2 C20 metiltransferasa (CbiL), EC 2.1.1.130, locus NP_460969), (Precorrin3B metilasa (CbiH), EC 2.1.1.131, locus NP_460972), (CbiG/precorrin metiltransferasa bifuncional (CbiG), locus NP_460973), (Precorrin-4 C11-metiltransferasa (CbiF), EC 2.1.1.133, locus NP_460974), (proteína de biosíntesis de cobalamina (CbiD), locus NP_460977), (precorrin-6A reductasa dependiente de NADPH (CbiJ), EC 1.3.1.54, locus NP_460971), (precorrin-6B C5,15-metiltransferasa (CbiE), EC 2.1.1.132, locus NP_460976), (precorrin-6B C12 descarboxilasa (CbiT), EC 2.1.1.132, locus NP_460975), (precorrin-8X-metilmutasa (CbiC), EC 5.4.1.2, locus NP_460978), (ácido cobirínico A, C-diamida-sintasa (CbiA), EC 6.3.1 -, locus NP_460980), (ácido Cob (I) irínico a,c-diamida adenosiltransferasa (BtuR), EC 2.5.1.17, locus NP_460677), (ácido cobirínico sintasa (CbiP), EC 6.3.5.10, locus NP_460964), (ácido cobirínico descarboxilasa (CobD), EC 4.1.1.81, locus NP_459636), (adenosilcobinamida-fosfato sintasa (CbiB), EC 6.3.1.10, locus NP_460979), (alfa ribazol-5'-P fosfatasa (CobC), EC 3.1.3.73, locus NP_459635), (cobalamina (5'-fosfato)-sintasa (CobS), EC 2.7.8.26, locus NP_460962), (Cobinamida fosfato guanilil transferasa (CobU), EC 2.7.7.62, locus NP_460963) y (nicotinato-nucleótido dimetilbencimidazol-P fosforribosil transferasa (CobT), EC 2.4.2.21, locus NP_460961)].

Además, para permitir la captación de cobalto e incorporación en vitamina B12, los genes que codifican el transportador de cobalto están sobreexpresados. La proteína transportadora de cobalto ejemplar hallada en *Salmonella typhimurium* se sobreexpresa y está codificada por secuencias de aminoácidos expuestas en (sistema de transporte de Co²⁺ de tipo ABC, componente de permeasa (CbiM), locus NP_460968), (sistema de transporte de cobalto de tipo ABC, componente periplásmico (CbiN), locus NP_460967) y (sistema de transporte de cobalto de tipo ABC, componente permeasa (CbiQ), locus NP_461989).

En una realización preferida, se modifican por ingeniería genética organismos fotoautotróficos para sobreexpresar enzimas independientes de vitamina B12 para evitar la necesidad de este cofactor completamente. En la mayoría de los organismos fotoautotróficos, solamente la metionina sintasa (EC 2.1.1.13) y las ribonucleótido reductasas de clase II requieren vitamina B12. Se sobreexpresa por tanto una metionina sintasa independiente de vitamina B12 ejemplar (EC 2.1.1.14) de *Thermotoga maritima*, como se expone en el documento PCT/US2008/083.506 (5-metilteotetrahidropterilglutamato-homocisteína metiltransferasa (MetE), locus NP_229090). Además, se sobreexpresa una ribonucleótido reductasa de clase I ejemplar (nrdAB) de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que codifica las secuencias de aminoácidos expuestas en (ribonucleósido-difosfato reductasa, subunidad alfa (NrdA), locus NP_441654), (ribonucleósido-difosfato reductasa, subunidad beta (NrdB), locus NP_443040).

Modificando por ingeniería genética un organismo con las enzimas enumeradas anteriormente y en la **Figura 1**, se produce un fotoetanolgeno como se describe más específicamente en el **Ejemplo 3**. En consecuencia, la presente invención proporciona una célula hospedadora capaz de fijar CO₂ tal como una cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7002 que se modifica por ingeniería genética para expresar genes tales como *pdg* y/o *adh* para producir etanol, y se modifica por ingeniería genética para ser independiente de nutrientes.

Producción de etanol en iluminación continua

Normalmente, se forman glucógeno en microorganismos a la luz, para consumir para producir la energía en la oscuridad. Con iluminación continua, sin embargo, sería desventajoso acumular cantidades significativas de glucógeno, que alejaría el carbono de la ruta o las rutas deseadas, especialmente debido a que no podía haber período de oscuridad suficientemente largo para utilizar el glucógeno. En ciertas realizaciones para evitar la síntesis de glucógeno durante la iluminación, los genes que codifican actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de glucógeno se atenúan o se eliminan completamente, en la medida en que el organismo continua manteniéndose fácilmente en un estado viable y siendo robusto en condiciones de fermentación. En consecuencia, la célula de la presente invención puede estar al menos atenuada en las actividades enzimáticas incluyendo, sin limitación: glucosa-1-fosfato adeniltransferasa (EC 2.7.7.27), glucógeno sintasa (EC 2.4.1.21 y EC 2.4.1.11), glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (EC 2.7.7.9) y enzima de ramificación de 1,4-alfa-glucano (EC 2.4.1.18).

En ciertos aspectos para la producción de etanol, el carbono que está disponible de la fijación de CO₂ se dirige a piruvato tan eficazmente como sea posible. Las cianobacterias pueden sintetizar algo de piruvato a partir de la fijación de carbono durante la iluminación, usando gliceraldehído-3-fosfato derivado del ciclo de Calvin, debido a que aún deben realizar precursores biosintéticos a partir de él. Sin embargo, lo hacen solamente en la medida en que lo requieran para crecimiento. Para aumentar el flujo a piruvato desde los intermedios del ciclo de Calvin, es deseable expresar de forma constitutiva los genes que codifican enzimas glucolíticas, del hospedador nativo o de un hospedador no nativo. La elección de genes se realiza basándose en si se proyecta que los efectos reguladores alostéricos eviten que ejerciten sus actividades completas en el contexto metabólico esperado del hospedador. La capacidad constitutiva podría conseguirse eliminando la regulación transcripcional donde existe, o expresando las enzimas a partir de promotores constitutivos con los que normalmente no están asociados. En consecuencia, la célula de la presente invención puede comprender actividades enzimáticas adicionales incluyendo, pero sin limitación: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (EC 1.2.1.12 o EC 1.2.1.13), fosfoglicerato quinasa (EC 2.7.2.3), fosfoglicerato mutasa (EC 5.4.2.1), enolasa (EC 4.2.1.11) y piruvato quinasa (EC 2.7.1.40).

La célula de la presente invención también puede comprender actividades enzimáticas adicionales para la conversión de piruvato a etanol. En ciertas realizaciones, dicha conversión puede llevarse a cabo por al menos cuatro rutas distintas: 1) la ruta de la piruvato descarboxilasa, 2) la ruta de la piruvato deshidrogenasa, 3) la ruta de la piruvato oxidasa y 4) la ruta de la piruvato formato-liasa. Las actividades enzimáticas requeridas para la ruta de la piruvato descarboxilasa son: piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1) y alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1 o EC 1.1.1.2). Las actividades enzimáticas requeridas para la ruta de la piruvato deshidrogenasa son: acetaldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.10) y alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1 o EC 1.1.1.2). Las actividades enzimáticas requeridas para la ruta de la piruvato oxidasa son: piruvato oxidasa (EC 1.2.2.2), acetil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.1), acetaldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.10) y alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1 o EC 1.1.1.2). Las actividades enzimáticas requeridas para la ruta de la piruvato formato-liasa son: piruvato formato-liasa (EC 2.3.1.54), formato hidrógeno-liasa (sin número de EC), acetaldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.10), y alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1 o EC 1.1.1.2). Preferentemente, una o más de estas rutas se expresa de forma constitutiva o bajo alguna otra regulación controlada.

Además de proporcionar a genes exógenos o genes endógenos nueva regulación, la optimización de la producción de etanol en microorganismos preferentemente requiere la eliminación o atenuación de ciertas actividades enzimáticas hospedadoras. Estas incluyen, pero sin limitación, piruvato oxidasa (EC 1.2.2.2), D-lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.28), acetato quinasa (EC 2.7.2.1), fosfato acetiltransferasa (EC 2.3.1.8), citrato sintasa (EC 2.3.3.1), fosfoenolpiruvato carboxilasa (EC 4.1.1.31). El grado en que sean necesarias estas manipulaciones se determina por los productos secundarios observados hallados en el biorreactor o matraz de agitación. Por ejemplo, la observación de acetato sugeriría la supresión de actividades enzimáticas piruvato oxidasa, acetato quinasa y/o fosfotransacetilasa. En otro ejemplo, la observación de D-lactato sugeriría la supresión de actividades enzimáticas D-lactato deshidrogenasa, mientras que la observación de succinato, malato, fumarato, oxalacetato o citrato sugeriría la supresión de las actividades enzimáticas citrato sintasa y/o PEP carboxilasa.

Producción de etanol en ciclo de luz-oscuridad

En realizaciones alternativas, la presente invención se adapta de modo que los microorganismos se usen en sistemas que sean adecuados para procesar con un ciclo de luz-oscuridad, en el que varias horas de iluminación constante se siguen de varias horas de oscuridad relativa. Usando dicho ciclo, la eliminación completa de la capacidad de síntesis de glucógeno puede no ser una estrategia viable, debido a que las células requerirán algo de glucógeno para sobrevivir al periodo de oscuridad. En este caso, puede implementarse una de dos estrategias alternativas: 1) atenuación, pero no eliminación, de las enzimas de síntesis de glucógeno, de modo que aún se realice algo de glucógeno durante la fase de luz; o 2) maximización de la producción de glucógeno durante la fase de luz.

En una realización, los microorganismos se atenúan pero no se eliminan en las actividades de enzima de síntesis de glucógeno. Dichos métodos se implementan suprimiendo las actividades del gen o los genes de síntesis de glucógeno nativos y reemplazándolos con análogos que tienen regulación y expresión no nativa a un nivel menor que en el hospedador nativo.

En otra realización, los microorganismos maximizan la producción de glucógeno durante la fase de luz. Dichos métodos se implementan explorando con respecto a cepas con el mayor contenido de glucógeno entre una colección de cepas de tipo silvestre o una biblioteca de mutantes de una cepa particular, después de que dichas cepas se han cultivado hasta una concentración celular adecuada y se han sometido posteriormente a limitación de un nutriente clave tal como nitrógeno, fósforo o potasio. Sería más ventajoso utilizar un ciclo de luz-oscuridad de modo que el glucógeno se sintetice a la máxima cantidad posible con respecto a peso en seco de las células durante el ciclo de luz, después se metaboliza etanol casi completamente según sea posible durante el ciclo de oscuridad.

Durante el ciclo de oscuridad, el glucógeno se convierte en piruvato por enzimas endógenas, pero, como sucede con la iluminación continua, estas enzimas pueden regularse en el hospedador de modo que la conversión global suceda a una tasa subóptima. Para aumentar la tasa de esta conversión, dicha regulación se contrarresta, bien mutando y

explorando cepas con respecto a rápida utilización de glucógeno en oscuridad o bien proporcionando al hospedador las enzimas necesarias a mayores niveles de expresión y/o proporcionando genes exógenos que codifiquen enzimas que estén menos sometidas a la regulación alostérica que las del hospedador. En consecuencia, las actividades enzimáticas preferidas para conseguir este efecto incluyen las enumeradas anteriormente para la conversión de gliceraldehído-3-fosfato en etanol, además de actividades enzimáticas que convierten glucógeno en gliceraldehído-3-fosfato: glucógeno fosforilasa (EC 2.4.1.1), fosfoglucomutasa (EC 5.4.2.2), glucosa-6-fosfato isomerasa (EC 5.3.1.9), fosfofructoquinasa (EC 2.7.1.11), fructosa-6-fosfato aldolasa (EC 4.1.2.13) y triosafosfato isomerasa (EC 5.3.1.1).

En otra realización más, al menos una actividad citocromo oxidasa está atenuada o funcionalmente suprimida. Las citocromo oxidasas actúan para transferir electrones al oxígeno en la oscuridad. Howitt *et al.*, realizaron supresiones de citocromo oxidasas (Ctal, Ctall y Cyd) y fueron capaces de obtener cepas que no respiraran en oscuridad pero que crecieran de forma normal a la luz. (Quinol and Cytochrome Oxidases in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, [Howitt *et al.*, Biochemistry (1998) 37(51):17944-51]). Las cepas que carecían de una oxidasa respiraban a tasas casi de tipo silvestre, mientras que las que carecían tanto de Ctal como de Cyd no respiraban. La incapacidad para respirar en la oscuridad significa más productos fermentativos, incluyendo etanol y quizás también succinato así como 1,4-butanodiol. En consecuencia, la presente invención proporciona un organismo fijador de carbono, por ejemplo, una cianobacteria obtenida por ingeniería genética en la que al menos una actividad citocromo oxidasa está atenuada, que aumenta la producción de etanol, succinato y/o 1,4-butanodiol.

Aumento de la producción de ácidos grasos

La introducción de secuencias de ácido nucleico heterólogas implicadas en una ruta biosintética para la producción de hidrocarburos puede realizarse de forma estable o transitoriamente en diversas células hospedadoras usando técnicas bien conocidas en este campo, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas, conjugación y transducción. Para la transformación estable, una secuencia de ADN puede incluir además un marcador seleccionable, tal como, resistencia a antibióticos, por ejemplo resistencia a neomicina, tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina y genes que complementan las deficiencias auxotróficas.

Las secuencias de control de la expresión adecuadas para uso en células hospedadoras procarióticas incluyen, pero sin limitación, promotores capaces de reconocer las polimerasas T4, T3, SP6 y T7, los promotores PR y P_L del bacteriófago lambda, los promotores trp, recA, de choque térmico y lacZ de *E. coli*, los promotores de alfa-amilasa y los específicos de sigma de *B. subtilis*, los promotores de los bacteriófagos de *Bacillus*, 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. Se revisan promotores procariotas en Glick, J. Ind. Microbiol. 1:277, 1987; Watson *et al*, MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENES 4ª Ed., Benjamin Cummins (1987); y Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente.

Son ejemplos no limitantes de promotores eucariotas adecuados para su uso dentro de un hospedador eucariota los de origen viral e incluyen el promotor del gen de metalotioneína I de ratón (Hamer *et al.*, J. Mol. Appl. Gen. 1 :273, 1982); el promotor TK de 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 de gal4 de levadura (Johnston, *et al*, PNAS (USA) 79:6971, 1982; Silver *et al*, PNAS (USA) 81: 5951, 1984); y el promotor de IgG (Orlandi *et al*, PNAS (USA) 86:3833, 1989).

En algunos ejemplos una célula hospedadora modificada genéticamente se modifica genéticamente con una secuencia de ADN heteróloga que codifica un producto génico de ruta biosintética que está unido operativamente con un promotor constitutivo. Se conocen en la técnica promotores constitutivos adecuados e incluyen el promotor tardío mayor de adenovirus constitutivo, un promotor de MPSV constitutivo y un promotor de CMV constitutivo. Los promotores constitutivos adecuados aplicables para *Synechococcus* sp. PCC 7002 incluyen, por ejemplo, Ptacl, P-EM7, Paph2 y PaadA.

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

Cuando una célula hospedadora está modificada genéticamente con secuencias de ácido nucleico heterólogas que codifican dos o más proteínas implicadas en una ruta de biosíntesis para producir productos basados en carbono de interés, las secuencias de ácido nucleico pueden dirigirse por un único promotor en un único vector o al menos un promotor en vectores de expresión separados.

La concentración intracelular (por ejemplo, la concentración del intermedio en la célula hospedadora modificada genéticamente) del intermedio de ruta biosintética puede aumentarse para potenciar adicionalmente el rendimiento del producto final. Por ejemplo, aumentando la cantidad intracelular de un sustrato (por ejemplo, un sustrato primario) para una enzima que está activa en la ruta biosintética y similares.

5

Modificaciones de cadenas de carbono

La **Figura 1** proporciona una descripción de los diversos genes que pueden modularse para alterar la estructura del producto derivado de ácidos grasos y las enzimas codificadas que pueden usarse solas o en combinación para realizar diversos ácidos grasos e hidrocarburos. Los productos pueden producirse de tal modo que contengan puntos de ramificación, niveles de saturación y longitud de cadena de carbono, haciendo de este modo a estos productos materiales de partida deseables para su uso en muchas aplicaciones. Se describen diversos productos basados en carbono de interés producidos por los microorganismos.

10

La **Figura 1** también enumera enzimas que están implicadas directamente en la síntesis de productos basados en carbono, incluyendo ceras, ésteres de ácidos grasos y/o alcoholes grasos. Para aumentar la producción de ésteres de ácidos grasos/ceras, y alcoholes grasos, puede sobreexpresarse una o más de las enzimas o mutarse para reducir la inhibición de retroalimentación. Adicionalmente, las enzimas que metabolizan los intermedios para realizar productos no basados en ácidos grasos (reacciones secundarias) pueden suprimirse funcionalmente o atenuarse para aumentar el flujo de carbono a través de la ruta biosintética de ácidos grasos. Los ejemplos proporcionados en el presente documento describen cómo modificar por ingeniería genética enzimas en las rutas respectivas de organismos hospedadores para producir organismos modificados por ingeniería genética que producen etanol.

15

20

Foto-fermentación consolidada

25

En un enfoque alternativo para producir directamente producto basado en carbono de interés final como resultado de fotosíntesis, los productos basados en carbono de interés pueden producirse impulsando a otros organismos que son más susceptibles a realizar cualquier producto particular cultivando a la vez el organismo fotosintético para su fuente de carbono. En consecuencia, la fermentación y producción de productos basados en carbono de interés puede realizarse por separado de la producción de fuente de carbono en un fotobiorreactor.

30

Los métodos para producir dichos productos basados en carbono de interés pueden incluir dos etapas. La primera etapa incluye organismos fotosintéticos para convertir dióxido de carbono en productos fotosintéticos tales como glucosa. La segunda etapa es usar los productos fotosintéticos como una fuente de carbono para células que producen productos basados en carbono de interés. El enfoque de dos etapas puede comprender un fotobiorreactor que comprende células fotosintéticas; un segundo reactor que comprende células capaces de fermentación; en el que las células fotosintéticas proporcionan una fuente de carbono tal como glucosa para que células capaces de fermentación produzcan un producto basado en carbono de interés. El segundo reactor puede comprender más de un tipo de microorganismo. Los productos basados en carbono de interés resultantes se separan y/o recogen posteriormente.

35

40

Las dos etapas pueden combinarse en un procedimiento de una única etapa por el que los organismos fotosintéticos modificados por ingeniería genética convierten luz y CO₂ directamente en glucosa y dichos organismos son capaces de producir una diversidad de productos basados en carbono de interés.

45

Ciertos cambios en las condiciones de cultivo de células hospedadoras fotosintéticas, por ejemplo, cianobacterias para la producción de azúcares pueden optimizarse con respecto a crecimiento. Por ejemplo, las condiciones se optimizan con respecto a intensidad de la luz, exposición a la luz, tiempo de exposición, ciclo diurno, adición de complementos, nutrientes, la velocidad de recirculación y caudales que mantienen una relación de luz y oscuridad. Como resultará evidente para los expertos en la materia, las condiciones suficientes para conseguir crecimiento óptimo variarán dependiendo de la localización, clima y otros factores ambientales, tales como el ciclo diurno, intensidad de la luz y tiempo de exposición a la luz. Pueden requerirse otros ajustes, por ejemplo, la capacidad de un organismo para captación de carbono. Puede introducirse carbono aumentado en forma de CO₂ en un biorreactor por rociadores de gas o dispositivos de aireación.

50

55

Las ventajas de la foto-fermentación consolidada incluyen un procedimiento en el que hay separación de los productos finales químicos, por ejemplo, glucosa, separación espacial entre productos finales (membranas) y tiempo. Adicionalmente, a diferencia de la producción tradicional o celulósica de biomasa a biocombustibles, se evitan el pretratamiento, sacarificación y arado de cultivo.

60

El procedimiento de foto-fermentación consolidado produce productos continuos. El procedimiento puede implicar la captura directa de luz a producto a partir de organismos iniciales modificados por ingeniería genética para producir diversos productos sin la necesidad de lisar los organismos. Por ejemplo, los organismos pueden utilizar 3PGAL a la luz para realizar un producto de fermentación deseado, por ejemplo, etanol. Como alternativa, los organismos pueden acumular glucógeno a la luz y metabolizar etanol en oscuridad para realizar más productos de fermentación. Dichos productos finales pueden secretarse fácilmente a diferencia de productos intracelulares tales como aceite y

65

celulosa. Los organismos pueden producir azúcares a la luz, que se secretan al medio y dichos azúcares se usan en oscuridad durante la fermentación con el mismo o diferentes organismos o una combinación de ambos.

Condiciones de fermentación

5

La producción y el aislamiento de productos basados en carbono de interés puede potenciarse empleando técnicas de fermentación específicas. Un método para maximizar la producción reduciendo costes es aumentar el porcentaje del carbono que se convierte en productos de hidrocarburo. Durante ciclos de vida celular normales se usa carbono en funciones celulares incluyendo producción de lípidos, sacáridos, proteínas, ácidos orgánicos y ácidos nucleicos.

10

La reducción de la cantidad de carbono necesaria para actividades relacionadas con el crecimiento puede aumentar la eficacia de la conversión de fuente de carbono a producto. Esto puede conseguirse cultivando en primer lugar microorganismos hasta una densidad deseada, tal como una densidad conseguida en el pico de la fase logarítmica de crecimiento. En dicho punto, pueden aprovecharse los genes de punto de control de replicación para detener el crecimiento de las células. Específicamente, pueden usarse mecanismos de detección de quórum [revisado en Camilli y Bassler, *Science* 311:1113, (2006); Venturi *FEMS Microbio Rev* 30:274-291 (2006); y Reading y Sperandio, *FEMS Microbiol Lett*, 254:1-11, (2006)] para activar genes tales como p53, p21 u otros genes de punto de control.

15

Los genes que pueden activarse para detener la replicación y crecimiento celular en *E. coli* incluyen los genes *umuDC*, cuya sobreexpresión detiene la progresión de fase estacionaria a crecimiento exponencial [Murli *et al*, *J. of Bact.*, 182:1127, (2000)]. *UmuC* es una ADN polimerasa que puede llevar a cabo síntesis de translesión sobre

20

lesiones no codificantes, la base mecánica de la mayoría de las mutagénesis químicas y de UV. Los productos génicos de *umuDC* se usan para el procedimiento de síntesis de translesión y también actúan como un punto de control de daño de ADN. Los productos génicos de *UmuDC* incluyen *UmuC*, *UmuD*, *UmuD'*, *UmuD'2C*, *UmuD'2* y *UmuD'2*. Simultáneamente, se activan los genes productores de producto, minimizando de este modo la necesidad de replicación y rutas de mantenimiento para usar mientras se está realizando el derivado de ácido graso.

25

En un aspecto, el porcentaje de carbonos de entrada convertidos a productos de hidrocarburo es un procedimiento eficaz y económico. Usando dióxido de carbono como la fuente de carbono, el oxígeno se libera en forma de O_2 , lo que conduce a una eficacia metabólica teórica máxima de ~34 % (p/p) (para productos derivados de ácidos grasos).

30

Esta cifra, sin embargo, cambia para otros productos de hidrocarburo y fuentes de carbono. Las eficacias típicas en la bibliografía son ~ < 5 %. Los microorganismos modificados por ingeniería genética que producen productos de hidrocarburo pueden tener más de 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 % de eficacia. En un ejemplo los microorganismos mostrarán una eficacia de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 25 %. En otros ejemplos, dichos microorganismos mostrarán una eficacia de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 30 %, y en otros ejemplos dichos microorganismos mostrarán > 30 % de eficacia.

35

En algunos ejemplos cuando el producto final se libera de la célula, puede emplearse un procedimiento continuo. En este enfoque, un reactor con organismos que producen derivados de ácidos grasos puede ensamblarse de múltiples maneras. En un ejemplo, una parte del medio se retira y se permite que se separe. Los derivados de ácidos grasos se separan de la capa acuosa, que a su vez se devolverá a la cámara de fermentación.

40

En otro ejemplo, la cámara de fermentación incluirá una fermentación que se somete a una reducción continua. En este caso, se creará un ambiente reductor estable. El equilibrio electrónico se mantendría por la liberación de oxígeno. Los intentos de aumentar el equilibrio de NAD/H y NADP/H también pueden facilitar la estabilización del equilibrio electrónico.

45

La disponibilidad de NADPH intracelular también puede potenciarse modificando por ingeniería genética el hospedador de producción para expresar una NADH:NADPH transhidrogenasa. La expresión de una o más NADH:NADPH transhidrogenasas convierte el NADH producido en glucólisis a NADPH que potencia la producción de derivados de ácidos grasos.

50

Para producción de producto a gran escala, los microorganismos modificados por ingeniería genética se cultivan en lotes de 10 l, 100 l o mayores, se fermentan y se inducen para expresar productos deseados basados en los genes específicos codificados en plásmidos según sea apropiado. Se incuban células que albergan ácidos nucleicos modificados por ingeniería genética para sobreexpresar o atenuar productos génicos a partir de un cultivo de siembra de 500 ml para fermentaciones de 10 l (5 l para fermentaciones de 100 l) en medio LB (sin glicerol) a 37 °C agitado a > 200 rpm hasta que los cultivos alcanzan una DO deseada (típicamente 16 horas) incubados con kanamicina, ampicilina o similares. El medio se trata con complemento continuamente para mantener un propionato sódico 25 mM a un pH adecuado de aproximadamente 8,0 para activar los sistemas génicos introducidos por ingeniería genética para la producción así como para detener la proliferación celular. El medio se complementa continuamente con dióxido de carbono. Se retiran alícuotas de no más del 10 % del volumen celular total cada hora y se permite que reposen sin agitación para permitir que el producto de hidrocarburo suba a la superficie y experimente una separación de fase espontánea. El componente de hidrocarburo se recoge después y la fase acuosa se devuelve a la cámara de reacción. La cámara de reacción funciona continuamente. Para la producción de éster de cera, después del aislamiento, los ésteres de cera se lavan brevemente en HCl 1 M para romper el enlace éster y se devuelven a pH 7 con lavado exhaustivo con agua destilada.

65

Procesamiento y separación

Los productos basados en carbono producidos por los organismos fijadores de dióxido de carbono durante la fermentación pueden separarse de los medios de fermentación. Pueden emplearse técnicas conocidas para separar derivados de ácidos grasos de medios acuosos. Un procedimiento de separación ejemplar proporcionado en el presente documento es un procedimiento de separación de dos fases (bifásico). Este procedimiento implica fermentar los huéspedes de producción modificados por ingeniería genética en condiciones suficientes para producir, por ejemplo, un ácido graso, permitiendo que el ácido graso se recoja en una fase orgánica y separando la fase orgánica del medio de fermentación acuoso. Este método puede practicarse en una situación de fermentación tanto discontinua como continua.

La separación bifásica usa la relativa inmiscibilidad del ácido graso para facilitar la separación. Un experto en la materia apreciará que eligiendo un medio de fermentación y la fase orgánica de modo que el derivado de ácido graso que se produzca tenga un valor logP alto, incluso a concentraciones muy bajas el ácido graso se separará en la fase orgánica en el frasco de fermentación.

Cuando se produzcan ácidos grasos por los métodos descritos en el presente documento, dichos productos serán relativamente inmiscibles en el medio de fermentación, así como en el citoplasma. Por lo tanto, el ácido graso se recogerá en una fase orgánica bien intracelularmente o bien extracelularmente. La recogida de los productos en una fase orgánica reducirá el impacto del derivado de ácido graso en la función celular y permite que el hospedador de producción produzca más producto.

Los alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, ceras e hidrocarburos producidos como se describe en el presente documento permiten la producción de compuestos homogéneos con respecto a otros compuestos en los que al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de los alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, ceras e hidrocarburos producidos tienen longitudes de cadena de carbono que varían en menos de 4 carbonos, o menos de 2 carbonos. Estos compuestos también pueden producirse de modo que tengan un grado de saturación relativamente uniforme con respecto a otros compuestos, por ejemplo al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de los alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, hidrocarburos y ceras son mono, di o tri-insaturados.

Detección y análisis

Generalmente, los productos de interés producidos a partir de las "biofábricas solares" descritas en el presente documento pueden analizarse por cualquiera de los métodos analíticos convencionales, por ejemplo, cromatografía de gases (GC), espectrometría de masas (MS), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS), y cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), electroforesis capilar, espectrometría de masas de desorción e ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS), resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR), viscometría [Knothe *et al.*, Am. Chem. Soc. Sump. Series, 666:172-208 (1997)], valoración para determinar ácidos grasos libres [Komers *et al.*, Fett/Lipid 99 (2):52-54 (1997)], métodos enzimáticos [Bailer *et al.*, J Anal. Chem. 340 (3): 186 (1991)], métodos basados en propiedades físicas, métodos químicos húmedos, etc.

Identificación de carbono

Los productos basados en carbono producidos biológicamente, por ejemplo, etanol, ácidos grasos, alcanos, isoprenoides, representan una nueva materia prima para combustibles, tales como alcoholes, gasóleo y gasolina. Dichos biocombustibles no se han producido usando biomasa sino que usan CO₂ como su fuente de carbono. Estos nuevos combustibles pueden distinguirse de combustibles derivados de carbono petroquímico basándose en la identificación isotópica de carbono doble. Dichos productos, derivados y mezclas de los mismos pueden distinguirse completamente de sus homólogos derivados de productos petroquímicos basándose en la identificación isotópica de carbono doble y ¹⁴C (fM), indicando nuevas composiciones de materia.

Hay tres isótopos de origen natural del carbono: ¹²C, ¹³C y ¹⁴C. Estos isótopos aparecen en carbono total sobre el suelo en fracciones de 0,989, 0,011, y 10⁻¹², respectivamente. Los isótopos ¹²C y ¹³C son estables, mientras que el ¹⁴C se degrada de forma natural a ¹⁴N, una partícula beta, y un anti-neutrino en un proceso con una semivida de 5.730 años. El isótopo ¹⁴C se origina en la atmósfera, debido principalmente al bombardeo de neutrones de ¹⁴N provocado en última instancia por la radiación cósmica. Debido a su semivida relativamente corta (en términos geológicos), ¹⁴C aparece a niveles extremadamente bajos en el carbono fósil. Durante el transcurso de 1 millón de años sin exposición a la atmósfera, solamente 1 parte en 10⁵⁰ seguirá siendo ¹⁴C.

La relación de ¹³C:¹²C varía ligeramente pero de forma medible entre fuentes de carbono naturales. Generalmente estas diferencias se expresan como desviaciones de la relación de ¹³C:¹²C en un material convencional. El patrón internacional para el carbono es el Belemnite Pee Dee, una forma de caliza hallada en Carolina del Sur, con una fracción de ¹³C de 0,0112372. Para una fuente de carbono a, la desviación de la relación ¹³C:¹²C de la del Belemnite de Pee Dee se expresa como:

$\delta_a = (R_a/R_s) - 1$, en la que R_a = relación $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ en la fuente natural, y R_s = relación $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ en Belemnite Pee Dee, el patrón.

Por conveniencia, δ_a se expresa en partes por mil, o ‰. Un valor negativo de δ_a muestra una desviación hacia ^{12}C sobre ^{13}C en comparación con el Belemnite Pee Dee. La **Tabla 1** muestra δ_a y la fracción de ^{14}C para varias fuentes de carbono naturales.

Tabla 1:

Variaciones de $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ en fuentes de carbono naturales		
Fuente	$-\delta_a$ (‰)	Referencias
Carbono subterráneo	32,5	Farquhar <i>et al.</i>
Combustibles fósiles	26	Farquhar <i>et al.</i>
DIC* Oceánico	0-1,5	Goericke <i>et al.</i>
		Ivlev
CO2 atmosférico	6-8	Ivlev, Farquhar <i>et al.</i>
DIC* de agua dulce	6-14	Dettman <i>et al.</i>
Belemnite Pee Dee	0	Ivlev

* DIC = carbono inorgánico disuelto

Los procesos biológicos con frecuencia diferencian entre isótopos de carbono. La abundancia natural de ^{14}C es muy pequeña, y por lo tanto la diferenciación a favor o en contra de ^{14}C es difícil de medir. La diferenciación biológica entre ^{13}C y ^{12}C , sin embargo, está bien documentada. Para un producto biológico p, se pueden definir cantidades similares a las anteriores:

$\delta_p = (R_p/R_s) - 1$, en la que R_p = relación $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ en el producto biológico, y R_s = relación $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ en el Belemnite Pee Dee, el patrón.

La **Tabla 2** muestra las desviaciones medidas en la relación de $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ para algunos productos biológicos.

Tabla 2: variaciones $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ en productos biológicos seleccionados

Producto	$-\delta_p$ (‰)	$-D$ (‰)*	Referencias
Azúcar/almidón vegetal de CO ₂ atmosférico	18-28	10-20	Ivlev
Biomasa cianobacteriana de DIC marino	18-31	16,5-31	Goericke <i>et al.</i> , Sakata <i>et al.</i>
Lípido cianobacteriano de DIC marino	39-40	37,5-40	Sakata <i>et al.</i>
Lípido de alga de DIC marino	17-28	15,5-28	Goericke <i>et al.</i> , Abelseon <i>et al.</i>
Biomasa de alga de DIC de agua dulce	17-36	3-30	Marty <i>et al.</i>
Lípido de <i>E. coli</i> de azúcar vegetal	15-27	casi 0	Monson <i>et al.</i>
Lípido cianobacteriano de carbono fósil	63,5-66	37,5-40	-
Biomasa cianobacteriana de carbono fósil	42,5-57	16,5-31	-

* D = diferenciación por un proceso biológico en su utilización de ^{12}C frente a ^{13}C (véase texto)

La **Tabla 2** introduce una nueva cantidad, D . Esta es la diferenciación por un proceso biológico en su utilización de ^{12}C frente a ^{13}C . Los inventores definen D de la siguiente manera: $D = (R_p/R_a) - 1$.

Esta cantidad es muy similar a δ_a y δ_p , excepto que ahora se compara el producto biológico directamente con la fuente de carbono en lugar de con un patrón. Usando D , se pueden combinar los efectos de desviación de una fuente de carbono y un proceso biológico para obtener la desviación del producto biológico en comparación con el patrón. Resolviendo para δ_p , se obtiene: $\delta_p = (D) (\delta_a) + D + \delta_a$, y, debido a que $(D) (\delta_a)$ es generalmente muy pequeño en comparación con los otros términos, $\delta_p \approx \delta_a + D$.

Para un producto biológico que tenga un proceso de producción con una D conocida, se puede estimar por lo tanto δ_p sumando δ_a y D . Se supone que D actúa independientemente de la fuente de carbono.

Esto se ha realizado en la **Tabla 2** para lípido cianobacteriano y biomasa producida a partir de carbono fósil. Como se muestra en las tablas anteriores, los productos cianobacterianos realizados a partir de carbono fósil (en forma de, por ejemplo, gas de escape u otras emisiones) tendrán un δ_p mayor que los de productos biológicos comparables realizados de otras fuentes, distinguiéndolos basándose en la composición de la materia de estos otros productos biológicos. Además, cualquier producto derivado solamente de carbono fósil tendrá una fracción despreciable de ^{14}C , mientras que los productos realizados a partir de carbono sobre el suelo tendrán una fracción de ^{14}C de aproximadamente 10^{-12} .

En consecuencia, pueden caracterizarse diversos productos basados en carbono de interés como $-\delta_p$ (‰) de aproximadamente 63,5 a aproximadamente 66 y $-D$ (‰) de aproximadamente 37,5 a aproximadamente 40.

Referencias

1. Goericke, R., Montoya, J.P., y Fry, B. Physiology of isotopic fractionation in algae and cyanobacteria. Capítulo 9 en "Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science", por K. Lajtha y R. H. Michener, Blackwell Publishing, 1994.
2. Monson, K.D. y Hayes, J.M. Biosynthetic control of the natural abundance of carbon 13 at specific positions within fatty acids in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 255:11435-41 (1980).
3. Abelson, P.H. y Hoering, T.C. Carbon isotope fractionation in formation of amino acids by photosynthetic organisms. Proc. Natl. Acad. Sci. 47:623-32 (1961).
4. Sakata, S., Hayes, J.M., McTaggart, A.R., Evans, R.A., Leckrone, K.J., y Togasaki, R.K. Carbon isotopic fractionation associated with lipid biosynthesis by a cyanobacterium: relevance for interpretation of biomarker records. Geochim. Cosmochim. Acta 61:5379-89 (1997).
5. Ivlev, A.A. Carbon isotope effects ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) in biological systems. Separation Sci. Technol. 36:1819-1914 (20010).
6. Farquhar, G. D., Ehleringer, J. R., y Hubick, K. T. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40:503-37 (1989).
7. Marty, J. y Planas, D. Comparison of methods to determine algal $\delta^{13}\text{C}$ in freshwater. Limnol. Oceanogr.: Methods 6:51-63 (2008).
8. Dettman, D. L., Reische, A. K., y K. C. Lohmann. Controls on the stable isotope composition of seasonal growth bands in aragonitic fresh-water bivalves (unionidae). Geochim. Cosmochim. Acta 63:1049-1057 (1999).

Todas las publicaciones y documentos de patente citados en el presente documento se incorporan por la presente por referencia en su totalidad para todos los fines en el mismo grado que si cada uno se indicara así individualmente.

Ejemplos

Los ejemplos posteriores se proporcionan en el presente documento para fines ilustrativos y no se pretende que sean restrictivos.

EJEMPLO 1

Construcción de plásmidos para *Synechococcus* sp. PCC 7002

Construcción de pJB5: El plásmido base pJB5 se diseñó como un vector de expresión vacío para la recombinación en *Synechococcus* sp. PCC 7002. Se diseñaron dos regiones de homología, la región de homología cadena arriba (UHR) y la región de homología cadena abajo para flanquear la construcción. Estas regiones de 500 pb de homología se corresponden con las posiciones 3301-3800 y 3801-4300 (referencia de Genbank NC_005025) para UHR y DHR respectivamente. El promotor de *aadA*, secuencia génica y terminador se diseñaron para conferir resistencia a estreptomicina y espectinomicina a la construcción integrada. Para expresión, se diseñó pJB5 con el promotor del casete de resistencia a kanamicina *aph2* y el sitio de unión a ribosomas (RBS). Cadena abajo de este promotor y RBS, los inventores diseñaron e insertaron el sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción para *NdeI* y *EcoRI*, así como los sitios para *XhoI*, *BamHI*, *SpeI* y *PacI*. Después del sitio *EcoRI*, se incluyó el terminador natural del gen de la alcohol deshidrogenasa de *Zymomonas mobilis* (*adhII*). Sitios de restricción de *XbaI* flanquean el UHR y el DHR permitiendo la escisión del ADN que se pretende usar para recombinación del resto del vector. Se construyó pJB5 por síntesis contractual de DNA2.0 (Menlo Park, CA).

Construcción de pJB5-PdcAdhII. Los genes de la piruvato descarboxilasa (*pdc*) y alcohol deshidrogenasa (*adhII*) se clonaron en el plásmido pJB5 con el siguiente procedimiento. Los genes *pdc-adhII* de *Zymomonas mobilis* (GenBank: DD161475, M15394) se diseñaron con un sitio *NdeI* reemplazando el inicio de la región codificante de *pdc*. Después del gen *PDC*, los inventores diseñaron dos sitios de endonucleasa de restricción (*XhoI* y *BamHI*). A continuación, se diseñó la secuencia *adhII* completa posterior a los sitios de restricción y finalmente se incluyó también el terminador de *adhII* natural, cadena abajo de un sitio de *EcoRI* insertado. Esta construcción se construyó por síntesis contractual de DNA2.0 (Menlo Park, CA) y se insertó por digestión de restricción con *NdeI* y *EcoRI* (New England Biolabs; Ipswich, MA) tanto en pJB5 como el inserto seguido de ligación con un kit Quick Ligation (New England Biolabs, Ipswich, MA). La construcción ligada se transformó en la *E. coli* competente F'Iq NEB 5-alfa (alta eficacia) (New England Biolabs: Ipswich, MA).

pJB5-PdcAdhII (TS): Los genes de la piruvato descarboxilasa (*pdc*) de *Zymobacter palmae* (GenBank: AF474145) y la alcohol deshidrogenasa TS42 (*adhII*) como se describe en Rellos *et al.* (1998) "Thermostable variants of *Zymomonas mobilis* alcohol dehydrogenase obtained using PCR-mediated random mutagenesis" Protein Expr Purif 12:61-61) se clonaron en el plásmido pJB5 con el siguiente procedimiento. Estos genes se diseñaron con un sitio *NdeI* reemplazando el inicio de la región codificante *pdc*. Después del gen *pdc* y antes del gen *adhII*, está presente

un hueco que incluye sitios *XhoI* y *BamHI* para permitir insertar promotores posteriormente (longitud total del hueco: 39 pb) y el RBS original para *adhII* de *Z. mobilis*. El gen *adhII* (*Z. mobilis*) tiene el terminador original presente después, en el que se ha situado un sitio de *EcoRI* entre el gen *adhII* y el terminador. Después del terminador, estaban presentes sitios *SpeI* y *PacI* para clonación. Esta construcción se construyó por síntesis contractual de

5 DNA2.0 (Menlo Park, CA) y se insertó por digestión de restricción con *NdeI* y *EcoRI* (New England Biolabs; Ipswich, MA) tanto en pJB5 como en el inserto seguido de ligación con un kit Quick Ligation (New England Biolabs, Ipswich, MA). La construcción ligada se transformó en la *E. coli* competente F'Iq NEB 5-alfa (alta eficacia) (New England Biolabs, Ipswich, MA).

10 **pJB5-Pdc:** El gen de la piruvato descarboxilasa (*pdc*) se clonó en el plásmido pJB5 con el siguiente procedimiento. La construcción de pJB5-PdcAdhII del Ejemplo 2 se digirió con *BamHI* y *EcoRI* (New England Biolabs; Ipswich, MA). Los salientes de ADN 5' y 3' incompatibles se retiraron usando el kit Quick Blunting (New England Biolabs, MA), y después se ligaron usando el kit Quick Ligation (New England Biolabs; Ipswich, MA).

15 **pJB5-AdhII:** El gen de la alcohol deshidrogenasa (*adhII*) se clonó en el plásmido pJB5 con el siguiente procedimiento. La construcción de pJB5-PdcAdhII del Ejemplo 2 se digirió con *NdeI* y *BamHI* (New England Biolabs; Ipswich, MA). Los salientes de ADN 5' y 3' incompatibles se retiraron usando el kit Quick Blunting (New England Biolabs, MA) y después se ligaron usando el kit Quick Ligation (New England Biolabs; Ipswich, MA).

20 **pJB5-metE (*E. coli*):** El gen de la metionina sintasa (*metE*) independiente de vitamina B12 de *E. coli* (GenBank: NP_418273.1), se clonó en el plásmido pJB5 por el siguiente procedimiento. Se sintetizó una construcción por síntesis contractual por DNA2.0 (Menlo Park, CA) para incluir un sitio *NdeI* para reemplazar el inicio del gen *metE*, y un sitio *EcoRI* al final del gen. Esta construcción se insertó por digestión de restricción con *NdeI* y *EcoRI* (New England Biolabs; Ipswich, MA) tanto en pJB5 como en el inserto seguido de ligación con un kit Quick Ligation (New England Biolabs; Ipswich, MA). La construcción ligada se transformó en la *E. coli* competente F'Iq NEB 5-alfa (alta

25 eficacia) (New England Biolabs; Ipswich, MA).

pJB5-metE (*T. elongates* BP-1): El gen de la metionina sintasa (*metE*) independiente de vitamina B12 de *Thermosynechococcus elongates* BP-1 (GenBank: NP_681881), se clonó en el plásmido pJB5 por el siguiente

30 procedimiento. Se sintetizó una construcción por síntesis contractual por DNA2.0 (Menlo Park, CA) para incluir un sitio *NdeI* para reemplazar el inicio del gen *metE* y un sitio *EcoRI* al final del gen. Esta construcción se insertó por digestión de restricción con *NdeI* y *EcoRI* (New England Biolabs; Ipswich, MA) tanto en pJB5 como en el inserto seguido de ligación con un kit Quick Ligation (New England Biolabs; Ipswich, MA). La construcción ligada se transformó en la *E. coli* competente F'Iq NEB 5-alfa (alta eficacia) (New England Biolabs; Ipswich, MA).

35

EJEMPLO 2

Construcción de plásmido para *Thermosynechococcus elongatus* BP-1

40 Se seleccionó *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 como otro hospedador de producción fijador de CO₂ ejemplar y se modifica por ácidos nucleicos modificados por ingeniería genética para suprimir funcionalmente ciertos genes y/o para expresar, sobreexpresar ciertos genes.

Se construyeron cuatro plásmidos (pJB518, pJB59, pJB20 y pJB21), todos derivados de pJB5, para permitir la

45 recombinación homóloga en cuatro loci diferentes en el genoma de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. Específicamente, las regiones de 0,5 kb de homología cadena arriba (UH) y homología cadena abajo (DH) usadas para recombinación homóloga de *Synechococcus* sp. PCC 7002 en pJB5 se reemplazaron por las siguientes regiones de aproximadamente 2,5 kb de *T. elongatus* BP-1 (referencia NC_004113): coordenadas 831908-834231 (UH) y 834232-836607 (DH) del genoma para pJB18, 454847-457252 (UH) y 457252-459740 (DH) para pJB19,

50 481310-483712 (UH) y 483709-486109 (DH) para pJB20 y 787356-789654 (UH) y 791080-793494 (DH) para pJB21. Las primeras tres regiones de homología se basan en los sitios de integración TS1, TS3 y TS4 descritos en Onai K. *et al.* (2004). "Natural transformation of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1: a simple and efficient method for gene transfer." *Mol. Gen. Genomics* 271: 50-59. El último se diseña para suprimir completamente la fase abierta de lectura de *glgA*, que codifica la glucógeno sintasa: El fin de esta delección es

55 minimizar el flujo de carbono fijado competitivo a glucógeno una vez que se han integrado los genes productores de etanol en el cromosoma.

Todas las regiones de homología de *T. elongatus* BP-1 se generaron por PCR usando ADN polimerasa de alta fidelidad de arranque en caliente Phusion™ (desarrollada y fabricada por Finnzymes Oy. Distribuida por New England Biolabs, Ipswich, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cebador de PCR directo UH tiene

60 un sitio de restricción *SbfI* 5'-terminal, el cebador de PCR inverso UH, un sitio de restricción *NotI* 5' terminal, el cebador de PCR directo DH, un sitio de restricción *AscI* 5'-terminal y el cebador de PCR inverso DH, un sitio de restricción *FseI* 5'-terminal. Para pJB18, pJB59, pJB20 y pJB21, la región UH se inserta en primer lugar en pJB5 mediante digestión de restricción con *SbfI* y *NotI* (New England Biolabs, Ipswich, MA) del inserto tanto de vector como generado por PCR, seguido de un kit Quick Ligation (New England Biolabs; Ipswich, MA). La construcción

65 ligada se transforma en la *E. coli* competente NEB 5-alfa (alta eficacia) (New England Biolabs; Ipswich, MA). La

secuencia de la región UH en pHB5 se valida por secuenciación contractual con GENEWIZ (South Plainfield, NJ). Para pJB18, pJB19, pJB20 y pJB21, la región DH se inserta después en la construcción de región pJB5-UH exactamente como se ha hecho para la región UH, excepto que se usan las enzimas de restricción *Ascl* y *FseI* (New England Biolabs, Ipswich, MA). Se confirma la secuencia de las regiones DH por secuenciación contractual con GENEWIZ (South Plainfield, NJ).

En cada uno de pJB18, pJB19, pJB20 y pJB21, se clonan dos versiones diferentes de los operones de piruvato descarboxilasa (*pdh*)/alcohol deshidrogenasa (*adhII*), creando un conjunto de ocho plásmidos listos para integración en el genoma de *T. elongatus* BP-1. En cada caso, el marcador seleccionable es el gen *aadA* de pJB5 que codifica resistencia a espectinomicina y estreptomycin. La primera versión del operón comprende los genes *pdh* y *adhII* de *Zymomonas mobilis* (GenBank: DD161475, M15394) y se diseña con un sitio *NdeI* que abarca el codón de partida de la secuencia codificante *pdh*. Después del gen *pdh* en orden están: un sitio de restricción *XhoI*, un sitio de restricción *BamHI*, la secuencia codificante *adhII*, el terminador de *adhII* de *Zymomonas mobilis* natural, y finalmente un sitio de restricción *EcoRI*. La segunda versión del operón, diseñado para codificar versiones relativamente más termoestables de piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa, comprendía el gen *pdh* de *Zymobacter palmae* (GenBank: AF474145) y el mutante de *adhII* TS42 descrito en Rellos *et al.*, Protein Expr. Purif., 12:61-61 (1998), y es idéntico de otro modo a la primera construcción en todo lo demás. Ambas construcciones se realizan por síntesis contractual de DNA2.0 (Menlo Park, CA) y se insertan por digestión de restricción con *NdeI* y *EcoRI* (New England Biolabs; Ipswich, MA) en pJB18, pJB59, pJB20, y pJB21, seguido de ligación con un kit Quick Ligation (New England Biolabs; Ipswich, MA). De esta manera se construyen ocho plásmidos de operones *pdh-adhII*: pJB22, pJB23, pJB24 y pJB25 que contenían la versión 1 del operón, basándose en pJB18, pJB19, pJB20 y pJB21, respectivamente, y pJB26, pJB27, pJB28 y pJB29 que contenía la versión 2 del operón, basándose en pJB18, pJB19, pJB20 y pJB21, respectivamente.

En los plásmidos pJB22, pJB23, pJB24, pJB25, pJB26, pJB27, pJB28 y pJB29, el operón *pdh-adhII* se expresa por el promotor *P_{aphI}* constitutivo, que está flanqueado por sitios de restricción *NotI* y *NdeI* únicos. Estos sitios permiten clonar otros promotores constitutivos, en lugar del promotor *P_{aphI}*, en caso de que ese promotor no proporcione suficiente expresión del operón cuando se integra en el genoma de *T. elongatus* BP-1. Se construyen plásmidos separados (pJB9, pJB10, pJB11, pJB12, pJB13, pJB14, pJB15, pJB16 y pJB17), todos realizados por síntesis contractual, por ejemplo, DNA2.0 (Menlo Park, CA), portando cada uno nueve promotores constitutivos alternativos candidatos flanqueados por sitios *NotI* y *NdeI* de modo que puedan reemplazar el promotor *P_{aphI}* por métodos de clonación convencionales. Siete de esos promotores son promotores de *T. elongatus* BP-1 nativos, correspondientes a la secuencia cadena arriba de los siguientes genes: *cpcC*, *apcA*, *tsr2142*, *psaA*, *rbcL*, *hsp33* y *trnE_{UUC}* y dos son promotores de tipo *E. coli*: *P_{tac}* (como se describe en De Boer *et al.*, Proc Natl Acad USA 80:21-25 (1983)) y el promotor *P_{EM7}* sintético.

EJEMPLO 3

Microorganismos modificados por ingeniería genética que producen etanol

***Synechococcus* sp. PCC 7002 modificado genéticamente:** Cada una de las construcciones como se han descrito en el Ejemplo 1 se integra en el genoma de *Synechococcus* sp. PCC 7002 usando el siguiente protocolo. Se cultivó *Synechococcus* 7002 durante 48 horas a partir de colonias en un matraz de agitación incubado a 30 °C a CO₂ 1 % hasta una DO₇₃₀ de 1 en medio A⁺ descrito en Frigaard NU *et al.* (2004) "Gene inactivation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 and the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* using in vitro-made DNA constructs and natural transformation" Methods Mol Biol 274:325-340. Se añadieron 500 µl de cultivo a un tubo de ensayo con 30 µl de 1-5 µg de ADN preparado a partir de un kit de Miniprep de agitación Qiagen Qiaprep (Valencia, CA) para cada construcción. Las células se incubaron burbujando CO₂ 1 % a aproximadamente 1 burbuja cada 2 segundos durante 4 horas. Se sembraron 200 µl de células en placas de medio A⁺ con agarosa 1,5 % y se cultivaron a 30 °C durante dos días con luz baja. Se aplicó como base 10 µg/ml de espectinomicina en las placas. Las colonias resistentes eran visibles en 7-10 días.

Construcción de cepas y expresión de *AdhA* de *Moorella* sp. HUC22-1: Se ha mostrado que la secuencia para *AdhA* de *Moorella* sp. HUC22-1 es un alcohol deshidrogenasa que utiliza NADP que también es termoestable y preferente para la reducción de acetaldehído [Inokuma *et al.*, Arch. Microbiol., 188:37-45 (2007)]. Aunque la secuencia no se ha publicado, la similitud de aminoácidos con *AdhIV* de *Moorella thermoacetica* (Número de referencia: ABC20211) fue del 100 %. La secuencia de ácido nucleico de *AdhIV* de *Moorella thermoacetica* (Número de referencia: CP000232) tuvo codones optimizados para la expresión y se construyó por DNA 2.0 y se designó SEC ID N° 1 (el aminoácido codificado es SEC ID N°: 2). La secuencia está flanqueada con CTCGAGTTGGATCC en el extremo 5', que codifica los sitios de restricción *XhoI* y *BamHI*, y en el extremo 3' con TTTCAAAACAGGAATTC en el extremo 3' (similar a pJB5-3) que contiene un sitio *EcoRI* para los fines de clonar en vectores de expresión.

El *adhA* de *Moorella* se clonó después cadena abajo de dos genes de piruvato descarboxilasa, uno de *Zymomonas mobilis* (número de referencia: AAV89984) y uno de *Zymobacter palmae* (número de referencia: AAM49566) para formar los plásmidos de expresión pJB136 y pJB133, respectivamente. Como controles, se construyeron plásmidos de expresión para el gen de la piruvato descarboxilasa de *Z. mobilis* con el gen *adhII* de *Z. mobilis* (número de

referencia: YP_163331) y el gen de piruvato descarboxilasa de *Z. palmae* con un *adhII* TS42 termotolerante mejorado [Rellos *et al.*, Protein Expression and Purification, 12:61-66 (1998)] Para formar pJB5-3 y pJB5-4, respectivamente.

- 5 Los plásmidos pJB5-3, pJB5-4, pJB133, pJB136 se clonaron en *Synechococcus* sp. PCC 7002 (JCC1) usando procedimientos convencionales y se designaron JCC136, JCC137, JCC445, JCC446 respectivamente (**Tabla 3**).

Tabla 3

Hospedador	Construcción de integración	Piruvato descarboxilasa	Alcohol deshidrogenasa
JCC136	pJB5-3	<i>Z. mobilis pdc</i>	<i>Z. mobilis adhII</i>
JCC137	pJB5-4	<i>Z. palmae pdc</i>	<i>Z. mobilis adhII TS42</i>
JCC445	pJB133	<i>Z. palmae pdc</i>	<i>Morella adhA</i>
JCC446	pJB136	<i>Z. mobilis pdc</i>	<i>Morella adhA</i>

- 10 JCC1, JCC136, JCC137, JCC445, JCC446 se cultivaron en placas con medio A⁺ (agar 1,5 %) con espectinomicina 100 µg/ml para cepas transgénicas. Se cultivó una única colonia en 10 ml de A⁺ con espectinomicina 100 µg/ml en un tubo de ensayo sumergido en un baño a 37 °C con CO₂ 1 % introducido por burbujeo. Los cultivos se dejaron crecer hasta DO_{730 nm} 5,0 o mayor (Molecular Devices Spectramax M2e; previamente se determinó que una DO_{730 nm} de 1 es igual a ~0,3 g de CDW), y después se sedimentó por centrifugación (21000 RCF, 20 °C, 5 minutos), se suspendió en medio A⁺ nuevo hasta la concentración original, y después se retrodiluyó de forma apropiada hasta DO_{730 nm} 0,2 en 25 ml de A⁺ en un matraz de agitación de 125 ml con deflectores. Se tomó aproximadamente 1 ml de cultivo para cada punto temporal (0, 6, 24, 48, 72 horas después de dilución; el punto temporal de 6 horas no se representa por razones de espaciado temporal), se registró la DO_{730 nm} (diluida de forma apropiada para proporcionar una lectura entre 0,04 y 0,4, que se determinó previamente que era el intervalo más preciso en el Spectramax M2e). Inmediatamente se sedimentaron por centrifugación las muestras a 4 °C durante 10 minutos a 21000 RCF. El sobrenadante se colocó en un nuevo tubo, y se congeló a -80 °C hasta que estuvo listo para su análisis.

- 25 El sobrenadante de cada punto temporal se analizó con respecto a etanol y acetaldehído mediante el uso de un cromatógrafo de gases Agilent 7890 equipado con un analizador de espacio de cabeza y un detector de ionización de llama (Agilent) usando un J & W Scientific DB-ALC1 (número de catálogo: 123-9134; longitud: 30 m, diámetro interno, 0,320 mm, grosor de la película: 1,80 µm). Se sometieron 100 µl de cada muestra a análisis de espacio de cabeza. Se midieron los controles solamente con respecto a A⁺ así como de dilución en serie de patrones para etanol y acetaldehído obtenidos de Sigma para obtener una curva de calibración.

Para medir las densidades ópticas, concentraciones de etanol y acetaldehído, los cultivos se retrodiluyeron de DO_{730 nm} 5 o más a una DO_{730 nm} de partida y se tomaron puntos temporales a 0, 24, 48 y 72 horas después de la dilución.

- 35 Se muestran las densidades ópticas de cultivos de *Synechococcus* sp. de tipo silvestre y diversos transgénicos (**Figura 5**). La gráfica muestra representaciones de mediciones de DO_{730nm} en cada punto temporal. Las mediciones de DO resultantes se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4

DO (730 nm)				
Tiempo	0	24	48	72
JCC1	0,257	2,19	5,7	10,1
JCC136	0,259	2,26	5,06	7,6
JCC137	0,263	2,265	5,02	8
JCC445	0,246	1,52	4,16	6,35
JCC446	0,227	1,71	4,52	6,95

- 40 Las concentraciones de etanol de cultivos en el sobrenadante se representan mostrando concentraciones de etanol aumentadas con respecto al tiempo en diversos cultivos de especies de *Synechococcus* transgénicas (**Figura 6**). Notablemente, se midió mayor concentración de etanol en JCC445, la cepa transformada con *adhA* de *Morella* a las 72 horas (**Tabla 5**).

45

Tabla 5

	EtOH (mg/l)			
	0	24	48	72
JCC1	0	0	1,704728	5,880188
JCC136	0	63,00976	140,7334	252,8226
JCC137	0	72,02925	137,0422	256,4378
JCC445	0	14,03474	153,5205	296,761
JCC446	0	16,06255	125,6418	249,6592

Adicionalmente, se observaron concentraciones de acetaldehído reducidas en diversos puntos temporales en las cepas transformadas con *adhA* de *Moorella* (Figura 7 y Tabla 6).

5

Tabla 6

	Acetaldehído (mg/l)			
	0	24	48	72
JCC1	0	0	0,411352	0,362828
JCC136	0	14,20144	34,95365	36,49536
JCC137	0	19,80197	36,05125	35,83849
JCC445	0	9,455919	10,82248	13,57957
JCC446	0	8,368128	9,070718	12,32025

En puntos temporales posteriores, las cepas transformadas con *adhA* de *Moorella* (JCC445 y JCC446) muestran aumentos notables en la relación de etanol y acetaldehído en comparación con las alcohol deshidrogenasas basadas en *Z. mobilis* como se muestra en los cultivos a lo largo del tiempo (Figura 8 y Tabla 7).

10

Tabla 7

	EtOH/Acetaldehído			
	0	24	48	72
JCC1	N/D	N/D	4,144204	16,20655
JCC136	N/D	4,436856	4,026287	6,927526
JCC137	N/D	3,637479	3,801316	7,155373
JCC445	N/D	1,484228	14,18532	21,85348
JCC446	N/D	1,919491	13,85137	20,26414

La Figura 9 representa relaciones de etanol y DO_{730nm} de los cultivos a lo largo del tiempo. Se representan las relaciones de concentración de etanol y DO_{730nm} en el sobrenadante en cada punto temporal. La relación de las cepas transformadas con *adh* de *Z. mobilis* (JCC 136 y JCC 137) llega rápidamente a un estado estacionario mientras que la relación de las cepas transformadas con construcciones de *adhA* de *Moorella* (JCC445 y JCC446) aumenta a lo largo del tiempo (Tabla 8).

15

20

Tabla 8

	EtOH/DO (mg/l/DO)			
	0	24	48	72
JCC1	0	0	0,299075	0,582197
JCC136	0	27,88043	27,81293	33,26613
JCC137	0	31,80099	27,29924	32,05472
JCC445	0	9,233379	36,90395	46,73402
JCC446	0	9,393303	27,79687	35,92218

***Thermosynechococcus elongatus* BP-1 modificado genéticamente:** del Ejemplo 2, se integran pJB22, pJB23, pJB24, pJB25, pJB26, pJB27, pJB28 y pJB29 en el cromosoma de *T. elongatus* BP-1 por recombinación homóloga usando el método de transformación detallado en Onai K. *et al* (2004). "Natural transformation of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1: a simple and efficient method for gene transfer." Mol. Gen. Genomics 271: 50-59. Los antibióticos de selección usados son espectinomycinina más estreptomycinina.

Lista Informal de secuencias

SEC ID N°: 1

10 Gen *adhA* de *Moorella* con codones optimizados

ATGTGGGAACTAAGATTAATATCAACGAAGTCCGTGAGATCCGCGCGAAAACCACCGTTTACTTT
GGTGTGGTGCTATCAAGAAAATTGATGATATCGCTCGCGAGTTCAAAGAAAAAGGTTACGATCG
CATCATCGTGATCACCGGTAAAGGCGCTTACAAAGCGACCGGTGCATGGGAATACATCGTGCCTG
CTCTGAACAAAAACCAGATTACGTATATCCATTATGATCAGGTGACCCCGAACCCGACCGTAGATC
AGGTTGACGAAGCGACCAAACAGGGCCCGTGAATTGCGCGCTCGCGCAGTACTGGCTATTGGTGGC
GGTCCCGGATCGACGCAGCCAAATCTGTGGCGGTGCTGCTGTCTTATCCGGACAAAAACGCTCGT
CAGCTGTACCAGCTGGAGTTTACCCCGGTAAAAGCAGCGCCGATCATCGCCATCAACCTGACCCAC
GGTACGGGCACCGAAGCGGACCGCTTCGCGGTTGTATCTATCCCGGAGAAGGCCTACAAACCGGC
TATCGCTTACGATTGCATCTACCCGCTGTACTCTATTGACGACCCGGCTCTGATGGTTAAACTGCCG
AGCGACCAGACGGCGTACGTTAGCGTGGATGCCCTGAACCATGTTGTTGAAGCTGCGACCTCCAA
AGTTGCATCTCCGTACACTATTATCCTGGCAAAAGAAACGGTCCGTCTCATCGCACGCTACCTGCC
TCAGGCCCTGTCTCACCCTGCAGACCTGACCGCGCGTTATTACCTCCTGTATGCCCTCTCTGATCGCC
GGTATTGCGTTTGATAACGGCCTGCTGCATTTACCCACGCACTGGAACACCCGCTGTCTGCCGTG
AAACCTGAACTGGCTCATGGCCTGGGTCTGGGTATGCTCCTGCCTGCGGTAGTTAAACAAATTTAT
CCGGCTACCCCGGAGGTACTGGCGGAAATCCTGGAACCAATCGTACCGGATCTGAAAGCGGTTCC
GGGCGAGGCTGAGAAAGCGGCGTCTGGCGTGGCGAAATGGCTGGCTGGTGCAGGCATCACTATGA
AACTGAAAGACGCGGGTTTCCAGGCTGAAGATATCGCGCGTCTGACCGACCTGGCCTTCACCACTC
CATCCCTGGAACCTCCTGCTGTCTATGGCACCAGTAACTGCTGATCGTGAGCGTGTGAAAGCAATTT
ACCAGGACGCATTTTGA

SEC ID N°: 2

15 Secuencia de aminoácidos de *Moorella* sp. HUC22-1 y *Moorella thermoacetica*

MWETKININEVREIRAKTTVYFGVGAIKKIDDIAREFKEKGYDRIIVITGKGAYKATGAWEYIVPALNK
NQITYIHVDQVTPNPTVDQVDEATKQAREFGARAVLAIGGGSPIDAAKSVAVLLSYDPKNARQLYQLE
FTPVKAAPHIAINLTHGTGTEADRFVVSIPKAYKPAIAYDCIYPLYSIDDPALMVKLPSDQATAYVSVD
ALNHVVEAATSKVASPYTHLAKETVRLIARYLPQALSHPADLTARYYLLYASLIAGIAFDNGLLHFTHA
LEHPLSAVKPELAHGLGLGMLLPVVKQIYPATPEVLAIEPIVPDLKGVPGAEKAASGVAKWLAG
AGITMKLKDAGFQAEDIARLTDLAFTTPSLELLLSMAPVTADRERVKAIYQDAF

REIVINDICACIONES

1. Una célula hospedadora microbiana fotosintética modificada genéticamente que produce etanol, donde la célula hospedadora está modificada genéticamente para comprender un ácido nucleico modificado por ingeniería genética exógeno que codifica una actividad alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH.
2. La célula de la reivindicación 1, donde la actividad alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH es *adhA* de *Moorella* sp. HUC22-1.
3. La célula de la reivindicación 1 o 2, que también codifica una actividad piruvato descarboxilasa.
4. La célula de la reivindicación 3, donde la actividad piruvato descarboxilasa se selecciona de actividad *pdc* de *Z. palmae* y *Z. Mobilis*.
5. La célula de la reivindicación 1, donde la secuencia codificante de alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH es al menos 77,1 % idéntica a SEC ID N° 1.
6. La célula de la reivindicación 1, donde la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH es al menos 72 % idéntica a SEC ID N° 2.
7. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la secuencia codificante de alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH y/o la secuencia codificante de piruvato descarboxilasa está bajo el control de un promotor inducible.
8. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la célula en cultivo es capaz de producir etanol en un rendimiento de al menos aproximadamente 249 mg/l de medio de cultivo en 72 horas, preferentemente donde
 - (i) el rendimiento es de al menos aproximadamente 296 mg/l de etanol durante 72 horas;
 - (ii) el rendimiento es de 2,5 a 5 g/l de medio de cultivo por hora;
 - (iii) el nivel de acetaldehído en dicho cultivo después de 72 horas es de menos de aproximadamente 14 mg/l;
 - (iv) la célula en el cultivo produce al menos aproximadamente 36 mg/l de etanol por DO; o
 - (v) la célula en cultivo produce al menos aproximadamente 47 mg/l de etanol por DO.
9. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es una cianobacteria.
10. La célula de la reivindicación 9, que es *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803 o *Thermosynechococcus elongatus* BP-1.
11. Uso de la célula de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para producir etanol.
12. Un método para producir etanol, que comprende cultivar la célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y después aislar el etanol de dicha célula o medio de cultivo.
13. El método de la reivindicación 12, donde la célula se cultiva en un fotobiorreactor.

Genes ejemplares para obtener por ingeniería genética microorganismos productores de productos basados en carbono, fijadores de CO₂

Producto	Gen	Enzima	Organismo ejemplar	EC Nº	Reacción
Etanol	<i>pdC</i>	piruvato descarboxilasa	<i>Zymomonas mobilis</i>	4.1.1.1	piruvato = acetaldehído + CO ₂
	<i>adhB</i>	alcohol deshidrogenasa	<i>Zymomonas mobilis</i>	1.1.1.1	acetaldehído + NADH = etanol
Butanol	<i>phaA</i>	beta-cetotiolasa	<i>Ralstonia eutropha</i>	2.3.1.16	2 acetil-CoA = acetoacetil-CoA + CoA
	<i>phaB</i>	acetoacetil-CoA reductasa	<i>Ralstonia eutropha</i>	1.1.1.36	acetoacetil-CoA + NADPH = 3-hidroxiacil-CoA
	<i>maoC</i>	enol-CoA hidratasa	<i>Escherichia coli</i>	4.2.1.17,55	3-hidroxiacil-CoA = crotonil-CoA
	<i>bcd</i>	butiril-CoA deshidrogenasa	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	1.3.99.2	crotonil-CoA = butiril-CoA + NAD(P)H
	<i>pct</i>	butirato CoA-transferasa	<i>Ralstonia eutropha</i>	2.8.3.1	butiril-CoA + acetato = butirato + acetil-CoA
	<i>adhE</i>	aldehído deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i>	1.2.1.3,4	butirato + NADH = butanal
Octano	<i>adhE</i>	alcohol deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.1,2	butanal + {NADH, NADPH} = 1-butanol
	<i>fabH</i>	acetil-CoA:ACP transacilasa	<i>Escherichia coli</i>	2.3.1.38	acetil-CoA + ACP = acetil-ACP + CoA,
	<i>accBCAD</i>	acetil-CoA carboxilasa	<i>Escherichia coli</i>	6.4.1.2	acetil-CoA + ATP + CO ₂ = malonil-CoA
	<i>fabD</i>	malonil-CoA:ACP transacilasa	<i>Escherichia coli</i>	2.3.1.39	malonil-CoA + ACP = malonil-ACP + CoA
	<i>fabB</i>	3-cetoacil-ACP sintasa	<i>Escherichia coli</i>	2.3.1.41	acil-ACP + malonil-ACP = CO ₂ + 3-cetoacil-ACP
	<i>fabG</i>	3-cetoacil-ACP reductasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.100	3-cetoacil-ACP + NADPH = 3-hidroxiacil-ACP
	<i>fabA</i>	3-hidroxiacil-ACP deshidratasa	<i>Escherichia coli</i>	4.2.1.60	3-hidroxiacil-ACP = enoil-ACP
	<i>fabI</i>	enoil-ACP reductasa	<i>Escherichia coli</i>	1.3.1.9,10	enoil-ACP + {NADH, NADPH} = acil-ACP
	<i>FAS1</i>	acil-ACP hidrolasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.1.2.14	acil-ACP = ácido graso + ACP

FIGURA 1-A

Producto.	Gen	Enzima	Organismo ejemplar	EC N°	Reacción
	(varios)	aldehído deshidrogenasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.2.1.{3,4}	octanoato + {NADH, NADPH} = octanal
	<i>ADH I</i>	alcohol deshidrogenasa	<i>Zymomonas mobilis</i>	1.1.1.{1,2}	octanal + {NADH, NADPH} = 1-octanol
	<i>alkB</i>	alcano 1-monooxigenasa	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1.14.15.3	1-octanol = n-octano + NAD(P)H + O ₂
Tereftalato	<i>aroF</i>	2-deshidro-3- desoxifosfoheptonato aldolasa	<i>Escherichia coli</i>	2.5.1.54	PEP + D-eritrosa-4-P = 3-desoxi-D-arabino- heptulosonato-7-P
	<i>aroB</i>	3-deshidroquinato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	4.2.3.4	3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-P = 3- deshidroquinato
	<i>aroD</i>	3-deshidroquinato deshidratasa	<i>Escherichia coli</i>	4.2.1.10	3-deshidroquinato = 3-deshidro-siquimato
	<i>quiC</i>	3-deshidrosiquimato deshidratasa	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	4.2.1.n	3-deshidro-siquimato = protocatecuato
	<i>pcaF</i>	β -cetoaladipil-CoA sintasa	<i>Rhodococcus sp. RHA1</i>	2.3.1.174	acetil-CoA + succinil-CoA = β -cetoaladipil-CoA + CoA
	<i>pcaJ</i>	β -cetoaladipato CoA- transferasa	<i>Pseudomonas putida</i>	2.8.3.6	β -cetoaladipil-CoA + succinato = β -cetoaladipato + succinil-CoA
	<i>pcaL</i>	3-oxoaladipato enol-lactona hidrolasa	<i>Rhodococcus sp. RHA1</i>	3.1.1.24	β -cetoaladipato = β -cetoaladipato enol lactona
	<i>pcaL</i>	4-carboximuoconolactona descarboxilasa	<i>Rhodococcus sp. RHA1</i>	4.1.1.44	β -cetoaladipato enol lactona + CO ₂ = γ -carboxi- muconolactona
	<i>pcaB</i>	γ -carboxi-cis,cis-muconato cicloisomerasa	<i>Rhodococcus sp. RHA1</i>	5.5.1.2	γ -carboxi-muconolactona = β -carboxi-cis,cis- muconato
	<i>pcaGH</i>	protocatecuato 3,4- dioxigenasa	<i>Rhodococcus sp. RHA1</i>	1.13.11.3	β -carboxi-cis,cis-muconato = protocatecuato
	<i>tpaC</i>	protocatecuato 1,2-cis- dihidrodiol deshidrogenasa	<i>Rhodococcus sp. RHA1</i>	1.3.1.n	protocatecuato + CO ₂ + NADPH = DDT

FIGURA 1-B

Producto	Gen	Enzima:	Organismo ejemplar	EC N°	Reacción
	<i>tpaAB</i>	tereftalato 1,2-dioxigenasa	<i>Rhodococcus</i> <i>sp. RHA1</i>	1.14.12.15	DDT = tereftalato + NADH + O ₂
1,3-propanodiol	<i>DAR1</i>	sn-glicerol-3-P deshidrogenasa	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	1.1.1.{8,94}	dihidroxiacetona-P + {NADH, NADPH} = sn- glicerol-3-P
	<i>GPP2</i>	sn-glicerol-3-fosfatasa	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	3.1.3.21	sn-glicerol-3-P = glicerol
	<i>dhaB1-3</i>	glicerol deshidratasa	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i>	4.2.1.30	glicerol = 3-hidroxiopropanal
	<i>dhaT</i>	1,3-propanodiol oxidoreductasa.	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i>	1.1.1.202	3-hidroxiopropanal + NADH = 1,3-propanodiol
1,4-butanodiol	<i>sucD</i>	succinil-CoA deshidrogenasa	<i>Clostridium</i> <i>kluveri</i>	1.2.1.n	succinil-CoA + NADPH = semialdehído succínico + CoA
	<i>GHBDH</i>	4-hidroxi butirato deshidrogenasa	<i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>	1.1.1.2	semialdehído succínico + NADPH = 4- hidroxi butirato
	<i>gdhA</i>	glutamato deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i> .	1.4.1.4	α-cetoglutarato + NH ₃ + NADPH = glutamato
	<i>gadA</i>	glutamato descarboxilasa	<i>Escherichia coli</i>	4.1.1.15	glutamato = 4-aminobutirato + CO ₂
	<i>gabT</i>	4-aminobutirato transaminasa	<i>Escherichia coli</i>	2.6.1.19	4-aminobutirato + α-cetoglutarato = glutamato + semialdehído succínico
	<i>aldH</i>	aldehído deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.n	4-hidroxi butirato + NADH = 4-hidroxi butanal
	<i>dhaT</i>	1,3-propanodiol oxidoreductasa	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i>	1.1.1.202	4-hidroxi butanal + NADH = 1,4-butanodiol
PHB	<i>phaA</i>	beta-cetotiolasa	<i>Ralstonia</i> <i>eutropha</i>	2.3.1.16	2 acetil-CoA = acetoacetil-CoA + CoA
	<i>phaB</i>	acetoacetil-CoA reductasa	<i>Ralstonia</i> <i>eutropha</i>	1.1.1.36	acetoacetil-CoA + NADPH = 3-hidroxi butiril- CoA
	<i>phaC</i>	PHA sintasa	<i>Ralstonia</i> <i>eutropha</i>	ninguno:	3-hidroxi butiril-CoA = PHB+ CoA
acrilato	<i>paaF</i>	enoil-CoA hidratasa	<i>Escherichia coli</i>	4.2.1.17	3-hidroxi propionil-CoA = acrilil-CoA
	<i>pct</i>	acrilato CoA-transferasa	<i>Ralstonia</i> <i>eutropha</i>	2.8.3.n	acrilil-CoA + acetato = acrilato + acetil-CoA

FIGURA 1-C

Producto	Gen	Enzima.	Organismo ejemplar	EC N°	Reacción
ε-caprolactona	<i>fabH</i>	acetil-CoA:ACP transacilasa	<i>Escherichia coli</i>	2.3.1.38	acetil-CoA + ACP = acetil-ACP + CoA
	<i>accBCAD</i>	acetil-CoA carboxilasa	<i>Escherichia coli</i>	6.4.1.2	acetil-CoA + ATP + CO ₂ = malonil-CoA
	<i>fabD</i>	malonil-CoA:ACP transacilasa	<i>Escherichia coli</i>	2.3.1.39	malonil-CoA + ACP = malonil-ACP + CoA
	<i>fabB</i>	3-cetoacil-ACP sintasa	<i>Escherichia coli</i>	2.3.1.41	acil-ACP + malonil-ACP = CO ₂ + 3-cetoacil-ACP
	<i>fabG</i>	3-cetoacil-ACP reductasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.100	3-cetoacil-ACP + NADPH = 3-hidroxiacil-ACP
	<i>fabA</i>	3-hidroxiacil-ACP deshidratasa	<i>Escherichia coli</i>	4.2.1.60	3-hidroxiacil-ACP = enoil-ACP
	<i>fabI</i>	enoil-ACP reductasa	<i>Escherichia coli</i>	1.3.1.[9,10]	enoil-ACP + (NADH, NADPH) = acil-ACP
	<i>FAS1</i>	acil-ACP hidrolasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.1.2.14	acil-ACP = ácido graso + ACP
	<i>alkB</i>	monooxigenasa de ácidos grasos	<i>Pseudomonas aerovorans</i>	1.14.15.3	ácido graso + NADPH + O ₂ = ω- hidroxialcanoato
		1,6-lactonasa		3.1.1.n	6-hidroxihexanoato = ε-caprolactona
isopreno	<i>dxs</i>	1-desoxi-D-xilulosa-5- fosfato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	2.2.1.7	piruvato + D-gliceraldehído-3-P = 1-desoxi-D- xilulosa-5-P + CO ₂
	<i>dxr</i>	1-desoxi-D-xilulosa-5- fosfato reductoisomerasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.267	1-desoxi-D-xilulosa-5-P + NADPH = 2-C-metil- D-eritritol-4-P
	<i>ispD</i>	2-C-metil-D-eritritol 4- fosfato citidililtransferasa	<i>Escherichia coli</i>	2.7.7.60	CTP + 2-C-metil-D-eritritol-4-P = 4-(citidina-5'- PP)-2-C-metil-D-eritritol
	<i>ispE</i>	4-(citidina 5'-difosfo)-2-C- metil-D-eritritol quinasa	<i>Escherichia coli</i>	2.7.1.148	ATP + 4-(citidina-5'-PP)-2-C-metil-D-eritritol = 2-P-4-(citidina 5'-PP)-2-C-metil-D-eritritol
	<i>ispF</i>	2-C-metil-D-eritritol 2,4- ciclodifosfato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	4.6.1.12	2-P-4-(citidina 5' PP)-2-C-metil-D-eritritol = 2- C-metil-D-eritritol-2,4-ciclo-PP + CMP

FIGURA 1D

Producto	Gen	Enzima	Organismo ejemplar	EC N°	Reacción
	<i>ispG</i>	4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	1.17.4.3	2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclo-PP = (E)-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il-PP
	<i>lspH</i>	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa	<i>Escherichia coli</i>	1.17.1.2	(E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il-PP + NADPH = isopentenil-PP + NADP
	<i>lspH</i>	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa	<i>Escherichia coli</i>	1.17.1.2	(E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il-PP + NADPH = dimetilalil-PP + NADP
	<i>idi</i>	isopentenil-difosfato Δ-isomerasa	<i>Escherichia coli</i>	5.3.3.2	dimetilalil-PP = isopentenil-PP
goma	(<i>nc</i>)	cis-poliprenilcistransferasa de goma	<i>Hevea brasiliensis</i>	2.5.1.20	isopentenil-PP = goma
lactato	<i>ldhA</i>	lactato deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.28	D-lactato = NADH + piruvato
DHA	<i>dhaK</i>	DHA quinasa	<i>Citrobacter freundii</i>	2.7.1.29	dihidroxiacetona-P = dihidroxiacetona + ATP
3-hidroxi-3-hidroxi-3-propionato	<i>accBCAD</i>	acetil-CoA carboxilasa	<i>Escherichia coli</i>	6.4.1.2	acetil-CoA + ATP + CO ₂ = malonil-CoA
	(<i>nc</i>).	malonil-CoA reductasa bifuncional	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	1.2.1.13, 1.1.1.59	malonil-CoA + 2 NADPH = 3-hidroxi-3-propionato + CoA
γ-valerolactona	(<i>nc</i>).	2-oxobutirato sintasa	<i>Clostridium pasteurianum</i>	1.2.7.2	propionil-CoA + CO ₂ + 2 F ₄ red = 2-oxobutanoato + CoA + 2 F ₄ ox
	(<i>nc</i>).	2-etilmalato sintasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.3.3.6	2-oxobutanoato + acetil-CoA = (R)-2-etilmalato + CoA
		análogo de aconitasa			(R)-2-etilmalato = 3-carboxi-4-hidroxi-3-pentanoato
		análogo de isocitrato deshidrogenasa			3-carboxi-4-hidroxi-3-pentanoato = levulinato
	<i>ler</i>	análogo de acetatoacetil-CoA reductasa	<i>Ralstonia eutropha</i>		levulinato + NAD(P)H = 4-hidroxi-3-pentanoato

FIGURA 1-E

Producto	Gen	Enzima	Organismo ejemplar	EC N°	Reacción
	(nc)	1,4-lactonasa	<i>Rattus norvegicus</i>	3.1.1.25	4-hidroxipentanoato = γ -valerolactona
	accBCAD (nc)	acetil-CoA carboxilasa	<i>Escherichia coli</i>	6.4.1.2	acetil-CoA + ATP + CO ₂ = malonil-CoA
		malonil-CoA reductasa bifuncional	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	1.2.1.18. 1.1.1.59	malonil-CoA + 2 NADPH = 3- hidroxipropionato + CoA
	paaF At3G06810	enol-CoA hidratasa	<i>Escherichia coli</i>	4.2.1.17	3-hidroxipropionil-CoA = acrilil-CoA
		acil-CoA deshidrogenasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.3.99.3	acrilil-CoA + FADH ₂ = propionil-CoA
	bktB	beta-cetotiolasa	<i>Ralstonia eutropha</i>	2.3.1.16	propionil-CoA + acetil-CoA = 3-cetovaleril-CoA + CoA
	phaB	acetoacetil-CoA reductasa	<i>Ralstonia eutropha</i>	1.1.1.36	3-cetovaleril-CoA + NADPH = (R)-3- hidroxivaleril-CoA
	crt	3-hidroxiubutiril-CoA deshidratasa	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	4.2.1.55	(R)-3-hidroxivaleril-CoA = 3-pentenil-CoA
	abtD	vinilacetil-CoA Δ - isomerasa	<i>Clostridium difficile</i>	5.3.3.3	3-pentenil-CoA = 4-hidroxipentanoil-CoA
	orfZ	4-hidroxiubutiril-CoA transferasa	<i>Clostridium kluveri</i>	2.8.3.n	4-hidroxipentanoil-CoA + acetato = acetil-CoA + 4-hidroxipentanoato
	(nc).	1,4-lactonasa	<i>Rattus norvegicus</i>	3.1.1.25	4-hidroxipentanoato = γ -vaterolactona
lisina-	aspC	aspartato aminotransferasa	<i>Escherichia coli</i>	2.6.1.1	Oxalacetato + L-glutamato = L-aspartato + α - cetoglutarato
	lysC	aspartato quinasa	<i>Escherichia coli</i>	2.3.3.14	L-aspartato + ATP = L-aspartil-4-P
	asd	aspartato semialdehido deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i>	1.2.1.11	L-aspartato-semialdehido = NADPH + L- aspartil-4-fosfato
	dapA	dihidrodipicolinato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	4.2.1.52	piruvato + L-aspartato-semialdehido = L-2,3- dihidrodipicolinato
	dapB	dihidrodipicolinato reductasa	<i>Escherichia can</i>	1.3.1.26	L-2,3- dihidrodipicolinato + NADPH = tetrahidrodipicolinato
	dapD	tetrahidrodipicolinato succinilasa.	<i>Escherichia coli</i>	2.3.1.117	tetrahidrodipicolinato + succinil-CoA = N- succinil-2-amino-6-cetopimelato + CoA

FIGURA 1-F

Producto	Gen	Enzima	Organismo ejemplar	EC N°	Reacción
	<i>argD</i>	N-succinildiaminopimelato-aminotransferasa	<i>Escherichia coli</i>	2.6.1.17	L-glutamato + N-succinil-2-amino-6-cetopimelato = α -cetoglutaratato + N-succinil-L,L-2,6-diaminopimelato
	<i>dapE</i>	N-succinil-L-diaminopimelato desuccinilasa	<i>Escherichia coli</i>	3.5.1.18	N-succinil-L,L-2,6-diaminopimelato = L,L-diaminopimelato + succinato
	<i>dapF</i>	diaminopimelato epimerasa	<i>Escherichia coli</i>	5.1.1.7	L,L-diaminopimelato = meso-diaminopimelato
	<i>lysA</i>	diaminopimelato. descarboxilasa	<i>Escherichia coli</i>	4.1.1.20	meso-diaminopimelato = L-lisina + CO ₂
	<i>At4g33680</i>	LL-diaminopimelato aminotransferasa.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2.6.1.83	tetrahidrodipicolinato + α -cetoglutaratato = L,L-diaminopimelato + L-glutamato (reemplaza 2.3.1.117-2.6.1.17-3.5.1.18)
	<i>LYS21</i>	homocitrato sintasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.3.3.14	acetil-CoA + α -cetoglutaratato = homocitrato + CoA
	<i>LYS4, LYS3</i>	homoaconitasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4.2.1.36	homocitrato = homo-cis-aconitato = homoisocitrato
	<i>LYS12, LYS11, LYS10</i>	homoisocitrato deshidrogenasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.1.1.87	homoisocitrato = 2-oxoadipato + CO ₂ + NADH
	<i>ARO8</i>	2-aminoadipato transaminasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.6.1.39	2-oxoadipato + L-glutamato = L-2-aminoadipato + α -cetoglutaratato
	<i>LYS2, LYS5</i>	2-aminoadipato reductasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.2.1.31	L-2-aminoadipato + NAD(P)H = L-2-aminoadipato 6-semialdehído
	<i>LYS9, LYS13</i>	aminoadipato semialdehído-glutamato reductasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.5.1.10	L-glutamato + L-2-aminoadipato 6-semialdehído + NADPH = N6-(L-1,3-dicarboxipropil)-L-lisina + NADP
	<i>LYS1</i>	lisina-2-oxoglutaratato reductasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.5.1.7	N6-(L-1,3-dicarboxipropil)-L-lisina = L-lisina + α -cetoglutaratato + NADH

FIGURA 1-G

Producto	Gen'	Enzima	Organismo ejemplar	EC N ^o	Reacción
serina	<i>serA</i>	fosfoglicerato deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.95	3-P-D-glicerato = 3-fosfonooxipiruvato + NADH
	<i>serC</i>	fosfoserina transaminasa	<i>Escherichia coli</i>	2.6.1.52	orto-P-L-serina + α -cetoglutarato = 3-fosfonooxipiruvato + L-glutamato
	<i>serB</i>	fosfoserina fosfatasa	<i>Escherichia coli</i>	3.1.3.3	orto-P-L-serina = L-serina
aspartato	<i>aspC</i>	aspartato aminotransferasa	<i>Escherichia coli</i>	2.6.1.1	oxaloacetato + L-glutamato = L-aspartato + α -cetoglutarato
sorbitol	<i>galM</i>	aldosa-1-epimerasa	<i>Escherichia coli</i>	5.1.3.3	D- β -glucosa = D- α -glucosa
	<i>GRE3</i>	poliol deshidrogenasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.1.1.21	D- α -glucosa + NADPH = D-sorbitol
ascorbato	<i>PGI1</i>	alfa-D-glucosa-6-fosfato cetol-isomerasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5.3.1.9	D- α -glucosa-6-P = β -D-fructosa-6-P
	<i>DIN9</i>	D-manosa-6-fosfato cetol- isomerasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5.3.1.8	β -D-fructosa-6-P = D-manosa-6-P
	<i>ATPMM</i>	D-manosa 6-fosfato 1,6- fosfomutasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5.4.2.8	D-manosa-6-P = D-manosa-1-P
	<i>CYT1</i>	manosa-1-fosfato guanililtransferasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2.7.7.22	D-manosa-1-P = GDP-manosa-
	<i>GME</i>	GDP-manosa 3,5- epimerasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5.1.3.18	GDP-manosa = GDP-L-galactosa
	<i>VTC2</i>	galactosa-1-fosfato guanililtransferasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2.7.n.n.	GDP-L-galactosa = L-galactosa-1-P
	<i>VTC4</i>	L-galactosa 1-fosfato fosfatasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3.1.3.n	L-galactosa-1-P = L-galactosa
	<i>At4G33670</i>	L-galactosa deshidrogenasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.1.1.122	L-galactosa = L-1,4-galactonolactona + NADH
	<i>ATGLDH</i>	L-galactonolactona oxidasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.3.3.12	L-1,4-galactonolactona + O ₂ = ascorbato + H ₂ O ₂
	<i>katE</i>	catalasa	<i>Escherichia coli</i>	1.11.1.6	2 H ₂ O ₂ = O ₂

FIGURA 1-H

Producto	Gen	Enzima	Organismo ejemplar	EC N°	Reacción
cefalosporina	<i>LYS21</i>	homocitrato sintasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.3.3.14	acetil-CoA + α -cetoglutarato = homocitrato + CoA
	<i>LYS4, LYS3</i>	homoaconitasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4.2.1.36	homocitrato = homo-cis-aconitato = homoisocitrato
	<i>LYS12, LYS11, LYS10</i>	homoisocitrato deshidrogenasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.1.1.87	homoisocitrato = 2-oxoadipato + CO ₂ + NADH
	<i>ARO8</i>	2-aminoadipato transaminasa.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.6.1.39	2-oxoadipato + L-glutamato = L-2-aminoadipato + α -cetoglutarato
	<i>serA</i>	fosfoglicerato deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.95	3-P-D-glicerato = 3-fosfonooxipiruvato + NADH
	<i>serC</i>	fosfoserina transaminasa	<i>Escherichia coli</i>	2.6.1.52	orto-P-L-serina + α -cetoglutarato = 3-fosfonooxipiruvato + L-glutamato
	<i>serB</i>	fosfoserina fosfatasa	<i>Escherichia coli</i>	3.1.3.3	orto-P-L-serina = L-serina.
	<i>AtSerat2:1</i>	serina O-acetiltransferasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2.3.1.30	acetil-CoA + L-serina = CoA + O-acetil-L-serina
	<i>At1G55880</i>	cisteína-sintasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2.5.1.47	O-acetil-L-serina = L-cisteína + acetato
	<i>ilvN, ilvB</i>	acetolactato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	2.2.1.6	piruvato = CO ₂ + 2-acetolactato
	<i>ilvC</i>	acetohidroxiácido isomerorreductasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.86	2-acetolactato + NADPH = 2,3-dihidroxiisovalerato
	<i>ilvD</i>	dihidroxiácido deshidratasa.	<i>Escherichia coli</i>	4.2.1.9	2,3-dihidroxiisovalerato = 2-cetoisovalerato
	<i>ilvE</i>	valina transaminasa	<i>Escherichia coli</i>	2.6.1.42	2-cetoisovalerato + L-glutamato = α -cetoglutarato + L-valina
	<i>Ava_1613</i>	ACV Sintetasa	<i>Anabaena variabilis</i>	6.3.2.26	3 ATP + L-2-aminoadipato + L-cisteína + L-valina = N-[L-5-amino-5-carboxipentanoil]-L-cisteinil-D-valina

FIGURA 1-I

Producto	Gen	Enzima	Organismo ejemplar	EC N°	Reacción
	<i>Ava_5009</i>	isopenicilina-N sintasa	<i>Anabaena variabilis</i>	1.21.3.1	N-(L-5-aminocarboxipentanoil)-L-cisteinil-D- valina + O ₂ = isopenicilina-N
	<i>cefD</i>	isopenicilina-N epimerasa	<i>Myxococcus xanthus</i>	5.1.1.17	isopenicilina-N = penicilina-N
	<i>cefEF</i>	expandasa/hidroxilasa de biosíntesis de cefalosporina	<i>Cephalosporium acremonium</i>	1.14.20.1, 1.14.11.26	penicilina-N + 2 α-cetoglutarato + 2 O ₂ = desacetilcefalosporina C + 2 succinato + 2 CO ₂
	<i>cefG</i>	desacetilcefalosporina-C acetiltransferasa	<i>Cephalosporium acremonium</i>	2.3.1.175	acetil-CoA + desacetilcefalosporina C = CoA + cefalosporina C
isopentenol	<i>dxs</i>	1-desoxi-D-xilulosa-5- fosfato . sintasa	<i>Escherichia coli</i>	2.2.1.7	piruvato + D-gliceraldehído -3-P = 1-desoxi-D- xilulosa-5-P + CO ₂
	<i>dxr</i>	1-desoxi-D-xilulosa-5- fosfato reductoisomerasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.267	1-desoxi-D-xilulosa-5-P + NADPH = 2-C-metil- D-eritritol-4-P
	<i>ispD</i>	2-C-metil-D-eritritol 4- fosfato citidililtransferasa	<i>Escherichia coli</i>	2.7.7.60	CTP + 2-C-metil-D-eritritol 4-P = 4-(citidina-5'- PP)-2-C-metil-D-eritritol
	<i>ispE</i>	4-(citidina 5'-difosfo)-2-C- metil-D-eritritol quinasa	<i>Escherichia coli</i>	2.7.1.148	ATP + 4-(citidina-5'-PP)-2-C-metil-D-eritritol = 2-P-4-citidina-5'-PP)-2-C-metil-D-eritritol
	<i>ispF</i>	2-C-metil-D-eritritol 2,4- ciclodifosfato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	4.6.1.12	2-P-4-(citidina 5'-PP)-2-C-metil-D-eritritol = 2- C-metil-D-eritritol-2,4-ciclo-PP + CMP
	<i>ispG</i>	4-hidroxi-3-metilbut-2-en- 1-il difosfato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	1.17.4.3	2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclo-PP = (E)-4- hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il-PP
	<i>ispH</i>	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa	<i>Escherichia coli</i>	1.17.1.2	(E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il-PP + NADPH = isopentenil-PP
	<i>ispH</i>	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa	<i>Escherichia coli</i>	1.17.1.2	(E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il-PP + NADPH = dimetilalil-PP

FIGURA 1 J

Producto	Gen	Enzima	Organismo ejemplar	EG N°	Reacción
	<i>idi</i>	isopentenil-difosfato Δ isomerasa	<i>Escherichia coli</i>	5.3.3.2	dimetilalil-PP = isopentenil-PP
		isopentenil-PP pirofosfatasa			isopentenil-PP = isopentenol
		isopentenol diquinasa			isopentenil-PP = isopentenol + ATP
	<i>ERG13</i>	hidroximetilglutaril-CoA sintasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.3.3.10	acetil-CoA + acetooacetil-CoA = (S)-3-hidroxi- 3H-metilglutaril-CoA + CoA
	<i>HMG2</i>	hidroximetilglutaril-CoA reductasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.1.1.34	(R)-mevalonato + CoA = (S)-3-hidroxi-3- metilglutaril-CoA + 2 NADPH
	<i>ERG12</i>	mevalonato quinasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.7.1.36	ATP + (R)-mevalonato = (R)-5-P-mevalonato
	<i>ERG8</i>	fosfomevalonato quinasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.7.4.2	ATP + (R)-5-P-mevalonato = - (R)-5-PP- mevalonato
	<i>MVD1</i>	difosfomevalonato descarboxilasa	<i>Saccharomyces. cerevisiae</i>	4.1.1.33	ATP + (R)-5-PP-mevalonato = isopentenil-PP + CO ₂
lanosterol	<i>dxs</i>	1-desoxi-D-xilulosa-5- fosfato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	2.2.1.7	piruvato + D-gliceraldehído-3-P = 1-desoxi-D- xilulosa-5-P + CO ₂
	<i>dxr</i>	1-desoxi-D-xilulosa-5- fosfato reductoisomerasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.267	1-desoxi-D-xilulosa-5-P + NADPH = 2-C-metil- D-eritritol-4-P
	<i>ispD</i>	2-C-metil-D-eritritol-4- fosfato citidililtransferasa	<i>Escherichia coli</i>	2.7.7.60	CTP + 2-C-metil-D-eritritol 4-P = 4-(citidina-5'- PP)-2-C-metil-D-eritritol
	<i>ispE</i>	4-(citidina 5'-difosfo)-2-6- metil-D-eritritol quinasa	<i>Escherichia coli</i>	2.7.1.148	ATP + 4-(citidina 5'-PP)-2-C-metil-eritritol = 2- P-4-(citidina 5'-PP)-2-C-metil-D-eritritol
	<i>ispF</i>	2-C-metil-D-eritritol 2,4- ciclodifosfato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	4.8.1.12	2-P-4-(citidina 5'-PP)-2-C-metil-D-eritritol = 2- C-metil-D-eritritol-2,4-ciclo-PP + CMP

FIGURA 1-K

Producto	Gen	Enzima	Organismo ejemplar	EC N°	Reacción
	<i>ispG</i>	4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	1.17.4.3	2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclo-PP = (E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il-PP
	<i>ispH</i>	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa	<i>Escherichia coli</i>	1.17.1.2	(E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il-PP + NADPH = isopentenil-PP
	<i>ispH</i>	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa	<i>Escherichia coli</i>	1.17.1.2	(E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il-PP + NADPH = dimetilalil-PP
	<i>idi</i>	isopentenil-difosfato Δ isomerasa	<i>Escherichia coli</i>	5.3.3.2	dimetilalil-PP = isopentenil-PP
	<i>crtE</i>	geranilgeranil pirofosfato sintasa	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	2.5.1.29	dimetilalil-PP + 2 isopentenil-PP = farnesil-PP
	<i>s110513</i>	escualeno sintasa	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	2.5.1.21	2 farnesil-PP- NADPH = escualeno
	<i>ERG1</i>	escualeno monooxigenasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.14.99.7	escualeno + NADPH + O ₂ = (S)-escualeno-2,3-epóxido
	<i>ERG7</i>	lanosterol sintasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5.4.99.7	(S)-escualeno-2,3-epóxido = lanosterol
DHA omega-3	*	acetil-CoA:ACP transacilasa	<i>Shewanella pneumatophori</i>	2.3.1.38	acetil-CoA + ACP = acetil-ACP + CoA
* son genes necesarios para <i>pfaABCDE</i> , algunos de los cuales son multifuncionales	*	acetil-CoA carboxilasa	<i>Escherichia coli</i>	6.4.1.2	acetil-CoA + ATP + CO ₂ = malonil-CoA
	*	malonil-CoA:ACP transacilasa	<i>Escherichia coli</i>	2.3.1.39	malonil-CoA + ACP = malonil-ACP + CoA
	*	3-cetoacil-ACP sintasa	<i>Escherichia coli</i>	2.3.1.41	acil-ACP + malonil-ACP = CO ₂ + 3-cetoacil-ACP
	*	3-cetoacil-ACP reductasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.100	3-cetoacil-ACP + NADPH = 3-hidroxiacil-ACP
	*	3-hidroxiacil-ACP deshidratasa	<i>Escherichia coli</i>	4.2.1.60	3-hidroxiacil-ACP = enoil-ACP
	*	enoil-ACP reductasa	<i>Escherichia coli</i>	1.3.1.[9,10]	enoil-ACP + {NADH, NADPH} = acil-ACP

FIGURA 1-L

Producto	Gen	Enzima	Organismo ejemplar	EC N°	Reacción
	*	desaturasa	<i>Shewanella pneumatophori</i>	1.14.19.n	ácido graso m:n+ NADPH + O 2= ácido graso m:(n+1)
	<i>FAS1</i>	acil-ACP hidrolasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.1.2.14	acil-ACP = ácido graso + ACP
licopeno	<i>dxs</i>	1-desoxi-D-xilulosa-5- fosfato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	2.2.1.7	piruvato + D-gliceraldehído-3-P = 1-desoxi-D- xilulosa-5-P + CO ₂
	<i>dxr</i>	1-desoxi-D-xilulosa-5- fosfato reductoisomerasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.267	1-desoxi-D-xilulosa-5-P + NADPH = 2-C-metil- D-eritritol-4-P
	<i>ispD</i>	2-C-metil-D-eritritol 4- fosfato citidililtransferasa	<i>Escherichia coli</i>	2.7.7.60	CTP + 2-C-metil-D-eritritol 4-P = 4-(citidina-5- PP)-2-C-metil-D-eritritol
	<i>ispE</i>	4-(citidina 5'-difosfo)-2-C- metil-D-eritritol quinasa	<i>Escherichia coli</i>	2.7.1.148	ATP + 4-(citidina-5'-PP)-2-C-metil-D-eritritol = 2- P-4-citidina-5-PP)-2-C-metil-D-eritritol
	<i>ispF</i>	2-C-metil-eritritol 2,4- ciclodifosfato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	4.6.1.12	2-P-4-(citidina-5'-P)-2-C-metil-D-eritritol = 2-C- metil-D-eritritol-2,4-ciclo-PP + CMP
	<i>ispG</i>	4-hidroxi-3-metilbut-2-en- 1-il difosfato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	1.17.4.3	2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclo-PP = (E)-4-hidroxi- 3-metilbut-2-en-1-il-PP
	<i>ispH</i>	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa	<i>Escherichia coli</i>	1.17.1.2	(E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il-PP + NADPH = isopentenil-PP
	<i>ispH</i>	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa	<i>Escherichia coli</i>	1.17.1.2	(E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il-PP + NADPH = dimetilalil-PP
	<i>idi</i>	isopentenil-difosfato Δ- isomerasa	<i>Escherichia coli</i>	5.3.3.2	dimetilalil-PP = isopentenil-PP
	<i>crtE</i>	geranilgeranil pirofosfato sintasa	<i>Synechocystis</i> sp. <i>PCC6803</i>	2.5.1.29	dimetilalil-PP + 2 isopentenil-PP = farnesil-PP

FIGURA 1-M

Producto	Gen	Enzima	Organismo ejemplar	EC N°	Reacción
	<i>crtE</i>	geranilgeranil pirofosfato sintasa	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	2.5.1.29	isopentenil-PP + farnesil-PP = (trans)-geranilgeranil-PP
	<i>crtB</i>	fitoeno sintasa	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	2.5.1.32	2 geranilgeranil-PP = fitoeno
	<i>crtl</i>	fitoeno oxidoreductasa	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	1.14.99.n	fitoeno + 2 NADPH + 2 O ₂ = ζ-caroteno
	<i>crtQ-2</i>	ζ-caroteno oxidoreductasa	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	1.14.99.30	ζ-caroteno + 2 NADPH + 2 O ₂ = licopeno
itaconato	(<i>nc</i>)	aconitato descarboxilasa	<i>Aspergillus terreus</i>	4.1.1.6	cis-aconitato = itaconato + CO ₂
1,3-butadieno	<i>sucD</i>	Succinil-CoA deshidrogenasa	<i>Clostridium kluyveri</i>	1.2.1.n	succinil-CoA + NADPH = semialdehído succínico + CoA
	<i>GHBH</i>	4-hidroxibutirato deshidrogenasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.1.1.2	semialdehído succínico + NADPH = 4-hidroxibutirato
	<i>gdhA</i>	glutamato deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i>	1.4.1.4	α-cetoglutarato + NH ₃ + NADPH = glutamato
	<i>gadA</i>	glutamato descarboxilasa	<i>Escherichia coli</i>	4.1.1.15.	glutamato = 4-aminobutirato + CO ₂
	<i>gabT</i>	4-aminobutirato transaminasa	<i>Escherichia coli</i>	2.6.1.19	4-aminobutirato + α-cetoglutarato = glutamato + semialdehído succínico
	<i>aldH</i>	aldehído deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.n	4-hidroxibutirato + NADH = 4-hidroxibutanol
	<i>dhaT</i>	1,3-propanodiol oxidoreductasa	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.1.1.202	4-hidroxibutanol + NADH = 1,4-butanodiol
etileno		alcohol deshidratasa		4.2.1.n	1,4-butanodiol = 1,3-butadieno
propileno	<i>accBCAD</i>	acetil-CoA carboxilasa	<i>Escherichia coli</i>	4.2.1.n	etanol = etileno
	(<i>nc</i>)	malonil-CoA reductasa bifuncional	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	6.4.1.2	acetil-CoA + ATP + CO ₂ = malonil-CoA
	<i>orfZ</i>	3-hidroxipropionil-CoA transferasa	<i>Clostridium kluyveri</i>	1.2.1.18, 1.1.1.59	malonil-CoA + 2 NADPH = 3-hidroxipropionato + CoA
				2.8.3.n	3-hidroxipropionato + acetil-CoA = 3-hidroxipropionil-CoA + acetato

FIGURA 1-N

Producto	Gen	Enzima	Organismo ejemplar	EC*	Reacción
		3-hidroxi- γ -butyrol-CoA dehidratasa	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	4.2.1.17	3-hidroxi- γ -butyrol-CoA = γ -butyrol-CoA
		acrilol-CoA reductasa	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	1.3.1.n	acrilol-CoA + NADPH = propionil-CoA
	<i>pct</i>	propionil CoA-transferasa	<i>Ralstonia eutropha</i>	2.8.3.1	propionil-CoA + acetato = acetyl-CoA + propionato
	<i>adhE</i>	aldehído deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i>	1.2.1.{3,4}	propionato + NADPH = propanal
	<i>adhE</i>	alcohol deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.{1,2}	propanal + NADPH = 1-propanol
		alcohol deshidratasa	?	4.2.1.n	1-propanol = propileno
Ya parte del metabolismo central					
succinato, citrato, glutamato, malato					

FIGURA 1-O

Succinato y derivados

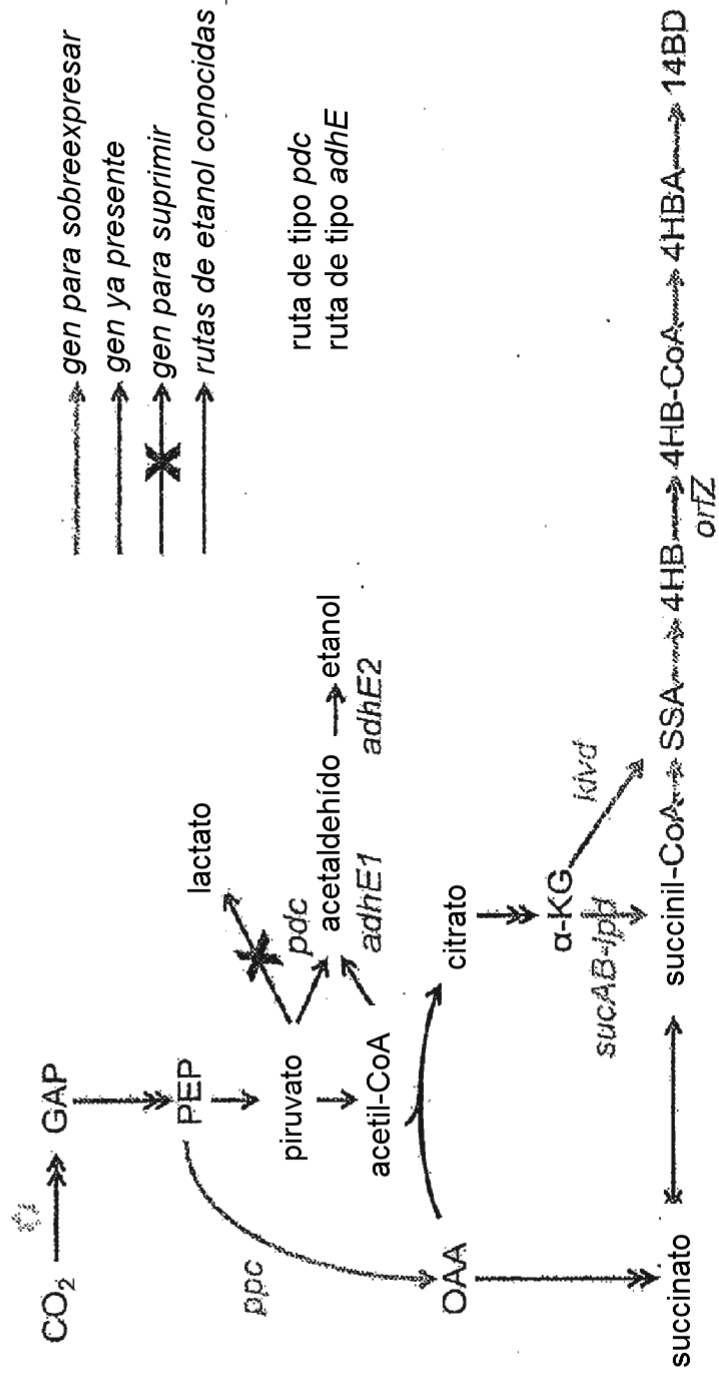


Fig. 2

FIG. 3

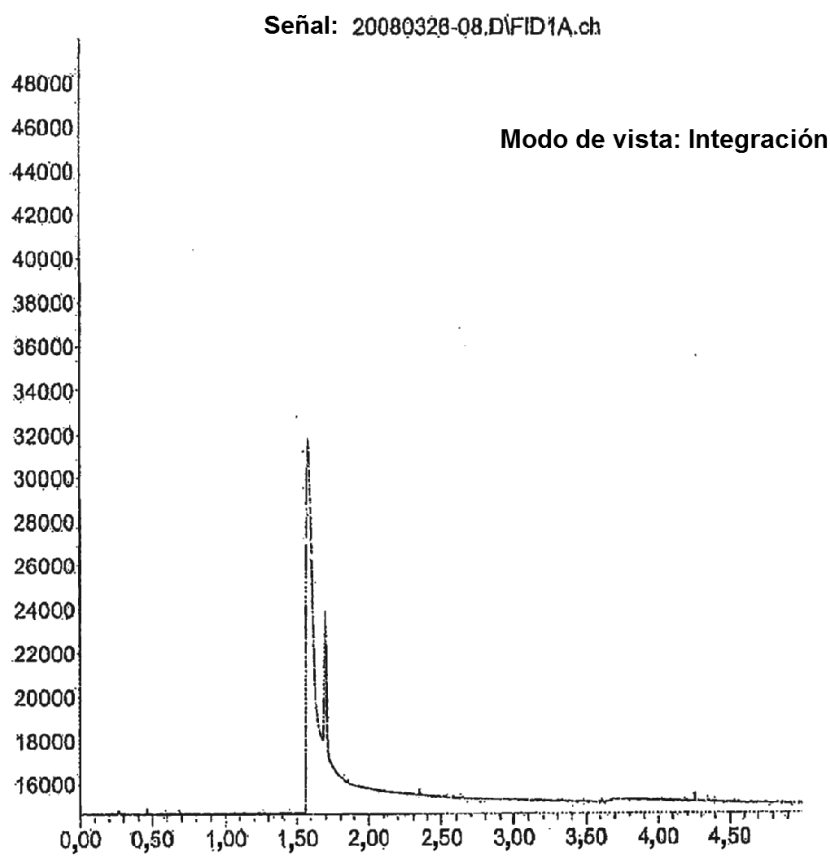


FIG. 4

Señal: 20080326-10.D\FID1A.ch

Modo de vista: Integración

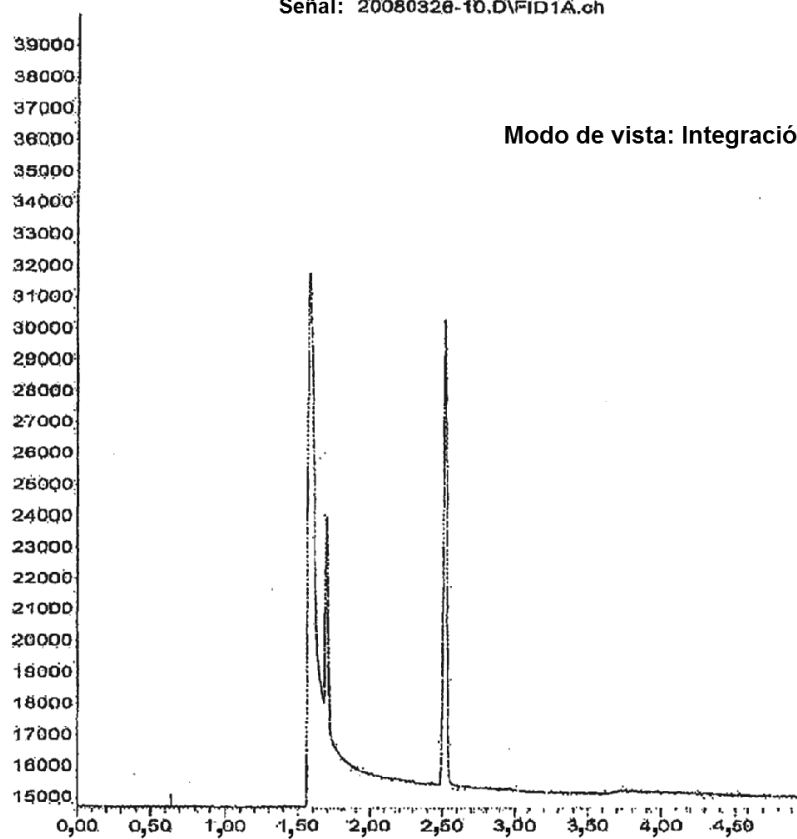


FIG. 5

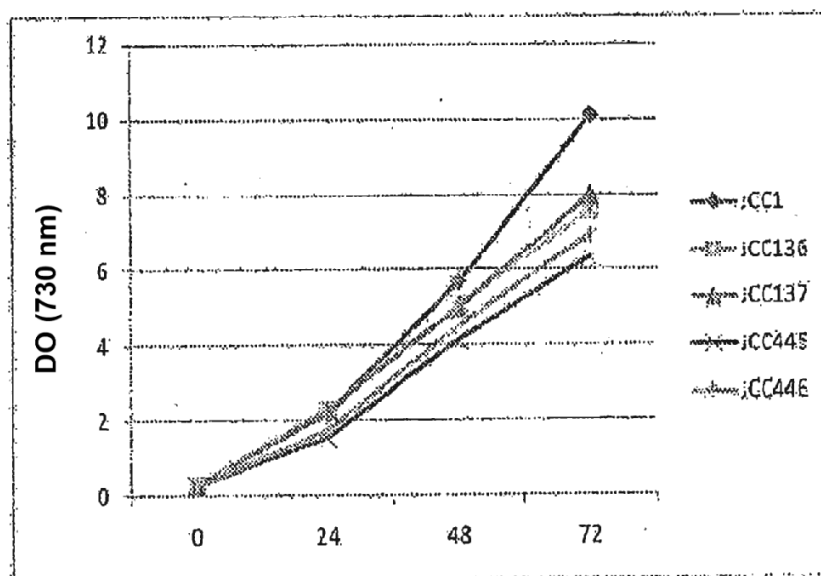


FIG. 6

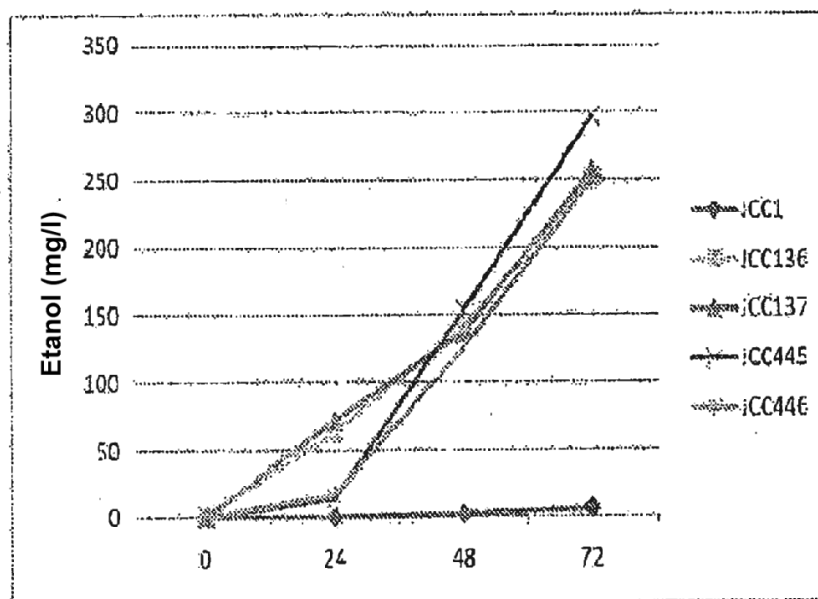


FIG. 7

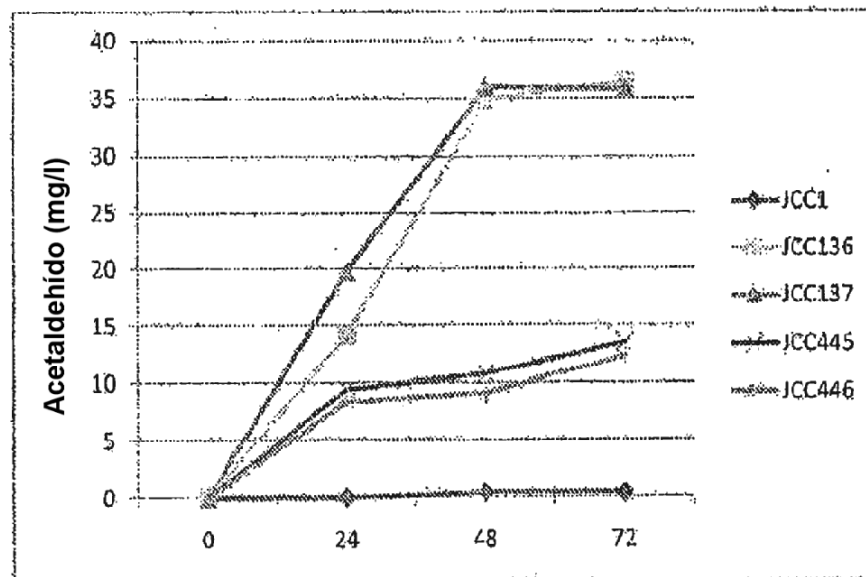


FIG. 8

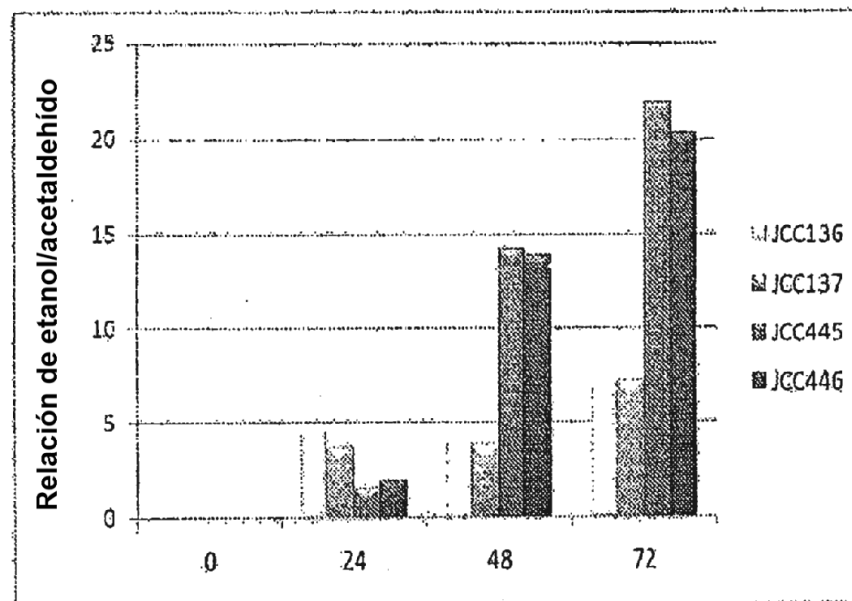


FIG. 9

