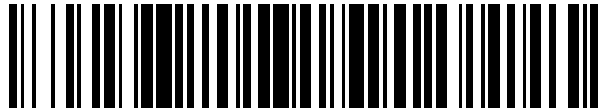


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 281**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2009 E 09820965 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2344652**

54 Título: **Producción de etanol por microorganismos**

30 Prioridad:

05.06.2009 US 184757 P
03.03.2009 WO PCT/US2009/035937
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:
18.02.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GREEN, BRIAN;
REPPAS, NIKOS y
ROBERTSON, DAN

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 560 281 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción de etanol por microorganismos

Campo

La presente divulgación se refiere a métodos y cianobacterias diseñadas para la producción biogénica de etanol.

5 Antecedentes

10 La fotosíntesis es un proceso mediante el cual las entidades biológicas utilizan la luz solar y el CO₂ para producir azúcares para obtener energía. La fotosíntesis, cómo evoluciona naturalmente, es un sistema muy complejo, con numerosos y poco entendidos bucles de retroalimentación, mecanismos de control, y las ineficiencias del proceso. Este complicado sistema presenta obstáculos probablemente insuperables para cualquiera de los dos enfoques de optimización global o un factor cada vez [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)].

15 Los organismos fotoautotróficos existentes (i.e., plantas, algas, y bacterias fotosintéticas) son poco apropiados para el bioprocesamiento industrial y por lo tanto no han demostrado viabilidad comercial para este propósito. Tales organismos tienen tiempo de generación lento (3-72 horas) en comparación con los organismos heterótrofos industrializados tales como *Escherichia coli* (20 minutos), reflejo de bajas productividades totales. Además, las técnicas de manipulación genética (desactivación, sobreexpresión de transgenes a través de la integración o propagación del plásmido episómico) son ineficientes, lentas, laboriosas, o inexistentes.

Resumen

20 Se describen en este documento rutas y mecanismos para conferir capacidad de producción de productos a base de carbono directos a organismos fotoautotróficos. Los resultantes fotoautótrofos productores de productos a base de carbono diseñados genéticamente permiten únicamente la producción eficiente de productos a base de carbono directamente a partir de dióxido de carbono y luz, eliminando las etapas de procesamiento laboriosas y costosas actualmente requeridas para generar biocombustibles y productos bioquímicos a partir de fuentes de biomasa incluyendo maíz, caña de azúcar, miscanthus, celulosa, y otros. La invención provee un método para la producción biogénica de etanol, que comprende: cultivar una cianobacteria diseñada genéticamente en un medio de cultivo en la presencia de luz y CO₂, en donde dicha cianobacteria comprende un gen de la piruvato descarboxilasa recombinante y al menos dos copias de un gen del alcohol deshidrogenasa recombinante que codifica un alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH. La invención también provee una cianobacteria diseñada genéticamente, que comprende un gen de la piruvato descarboxilasa recombinante y al menos dos copias de un gen del alcohol deshidrogenasa recombinante que codifica un alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH.

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

30 Todavía en otros aspectos, si se debe aplicar el ciclo de luz-oscuridad, la producción de glucógeno se optimiza durante la exposición a la luz (en oposición a la biomasa, etc.) y el aumento en % de peso de células secas que puede ser glucógeno (i.e., la célula está diseñada genéticamente para derrotar cualquier limitación que evite el acrecentamiento completo de glucógeno de las células). Luego, durante la oscuridad, se permite que la síntesis de etanol continúe a partir del glucógeno acumulado, después de haber atenuado o eliminado las otras rutas de fermentación. Además, se revela utilizando un ciclo de luz-oscuridad que coincide con las tasas de síntesis/catabolismo del glucógeno de tal manera que un tiempo mínimo se desperdicia (el glucógeno no se agota y las células reposan improductivamente en la oscuridad, o hay demasiado glucógeno para consumir por completo durante el periodo de oscuridad).

35 El ácido nucleico diseñado genéticamente compuesto por la célula de la invención codifica una actividad de alcohol deshidrogenasa dependiente de la NADPH. En una realización, la alcohol deshidrogenasa dependiente de la actividad de NADPH es *Moorella* sp. HUC22-1 *adhA*.

En ciertas realizaciones, la actividad de la piruvato descarboxilasa se selecciona a partir de la actividad de *Z. palmae* y *Z. mobilis pdc*.

40 En ciertas realizaciones, la célula diseñada genéticamente 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 todavía otras realizaciones, el rendimiento de etanol está entre aproximadamente 2.5 a aproximadamente 5 g/L de medio de cultivo-hr. En otras realizaciones, el nivel de acetaldehído en dicho cultivo después de 72 horas es inferior a 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.

La figura 9 ilustra gráficamente las relaciones de concentración de etanol con DO (730nm) de los cultivos en el sobrenadante con el tiempo.

La figura 10 ilustra gráficamente las mediciones de OD₇₃₀ y las curvas de crecimiento derivadas.

La figura 11 ilustra gráficamente los niveles de etanol en medio de cultivo.

5 La figura 12 ilustra gráficamente los niveles de acetaldehído en medio de cultivo.

Descripción detallada

Abreviaturas y Términos

10 Las siguientes explicaciones de términos y métodos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y guiar a los expertos normales en el arte en la práctica de la presente divulgación. Como se usa en este documento, "que comprende" significa "que incluye" y las formas singulares "un" o "una" o "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "que comprende una célula" incluye una o una pluralidad de tales células, y la referencia a "que comprende la tioesterasa" incluye la referencia a uno o más péptidos de la tioesterasa y sus equivalentes conocidos para los expertos normales en el arte, y en adelante. El término "o" se refiere a un solo elemento de elementos alternativos indicados o una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

15 A menos que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado como se entiende comúnmente para un experto normal en el arte al que pertenece esta divulgación. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la presente divulgación, los métodos y materiales apropiados se describen a continuación. Los materiales, métodos, y ejemplos solo son ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Otras características de la divulgación son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

20 Números de referencia: Los números de referencia a lo largo de esta descripción se derivan de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mantenida por el Instituto Nacional de Salud, de los Estados Unidos. Los números de referencia son según lo establecido en la base de datos del 1 de febrero de 2008.

25 Números de clasificación de enzimas (EC): Los números de la EC proporcionadas en a lo largo de esta descripción se derivan de la base de datos de Ligando KEGG, mantenida por the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics, patrocinada en parte por the University of Tokyo. Los números EC son según lo establecido en la base de datos del 1 de febrero de 2008.

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

35 Atenuar: El término como se usa en este documento se refiere generalmente a una delección funcional, incluyendo una mutación, delección parcial o completa, inserción u otra variación hecha a una secuencia de gen o una secuencia de control de la transcripción de una secuencia de genes, que reduce o inhibe la producción del producto del gen, o hace el producto del gen no funcional. En algunos casos una delección funcional se describe como una mutación de desactivación. La atenuación también incluye los cambios de la secuencia de aminoácidos mediante la alteración de la secuencia de ácido nucleico, colocando el gen bajo el control de un promotor menos activo, inhibición de la expresión, expresando ARN de interferencia, ribozimas o secuencias antisentido que se dirigen al gen de interés, o mediante cualquier otra técnica conocida en el arte. En un ejemplo, la sensibilidad de una enzima particular a la inhibición de retroalimentación o la inhibición causada por una composición que no es un producto o un reactivo (retroalimentación específica no ruta) se reduce de tal manera que la actividad de la enzima no se ve afectada por la presencia de un compuesto. En otros casos, una enzima que ha sido alterada para ser menos activa se puede denominar como atenuada.

45 Los "productos a base de carbono de interés" incluyen alcoholes tales como etanol, propanol, isopropanol, butanol, alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, ésteres de cera; hidrocarburos y alcanos tales como propano, octano, diesel, Jet Propellant 8, polímeros tales como tereftalato, 1,3-propanodiol, 1,4-butanodiol, polioles, polihidroxicanoatos (PHAs), polihidroxibutiratos (PHB), acrilato, ácido adípico, ε caprolactona, isopreno, caprolactama, caucho; productos químicos básicos, tales como lactato, ácido docosahexaenoico (DHA), 3-hidroxiopropionato, γ-valerolactona, lisina, serina, aspartato, ácido aspártico, sorbitol, ascorbato, ácido ascórbico, isopentenol, lanosterol, omega-3 DHA, licopeno, itaconato, 1,3-butadieno, etileno, propileno, succinato, citrato, ácido cítrico, glutamato, malato, ácido 3-hidroxiopropionico (HPA), ácido láctico, THF, gamma butirrolactona, pirrolidonas, hidroxibutirato, ácido glutámico, ácido levulínico, ácido acrílico, ácido malónico; productos químicos especiales, tales como carotenoides, isoprenoides, ácido itacónico; productos farmacéuticos y productos intermedios farmacéuticos, tales como el ácido 7-aminodesacetoxicefalosporónico, cefalosporina, eritromicina, policétidos, estatinas, paclitaxel, docetaxel, terpenos, péptidos, esteroides, ácidos grasos omega y otros dichos productos apropiados de interés. Tales productos son útiles en el contexto de los biocombustibles, productos químicos industriales y especiales, como productos intermedios utilizados para hacer productos adicionales,

tales como suplementos nutricionales, nutracéuticos, polímeros, reemplazos de parafina, productos para el cuidado personal y productos farmacéuticos.

Delección: La eliminación de uno o más nucleótidos desde una molécula de ácido nucleico o uno o más aminoácidos a partir de una proteína, estando las regiones a ambos lados unidas entre sí.

5 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 incluyendo el ácido ribonucleico, ARN). Las unidades que se repiten en los polímeros de ADN son cuatro nucleótidos diferentes, cada uno de los cuales incluye una de las cuatro bases, adenina, guanina, citosina y timina unida a un azúcar desoxirribosa a la que está unido un grupo fosfato.

10 Endógeno: Como se usa en este 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 fue introducida en la célula (o sus progenitores) utilizando 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 se considera todavía endógeno si las secuencias de control, tales como una secuencia promotora o potenciadora que activa la transcripción o traducción se han modificado a través de las técnicas recombinantes.

15 "Una actividad de la enzima": Como se utiliza en este documento, el término "una actividad enzimática" significa que la enzima indicada (por ejemplo, "una actividad de alcohol deshidrogenasa") tiene atributos medibles en términos de, por ejemplo, la actividad específica de sustrato, pH y temperatura óptimos, y otras medidas estándar de la actividad de la enzima como la actividad codificada por una enzima de referencia (por ejemplo, alcohol deshidrogenasa). Además, la enzima es al menos 90% idéntica a un nivel nucleico o aminoácido a la secuencia de la enzima de referencia como se mide por una búsqueda BLAST.

20 Exógeno: Como se usa en este documento con referencia a una molécula de ácido nucleico y una célula o microorganismo particular, se refiere a una secuencia o péptido de ácido nucleico 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 diseñó en una célula alternativa utilizando técnicas de ADN recombinante u otros métodos para suministrar dicho ácido nucleico es exógeno.

25 Expresión: El proceso por el cual una información codificada del gen se convierte en las estructuras y funciones de una célula, tales como una proteína, ARN de transferencia, o ARN ribosómico. Los genes expresados incluyen aquellos que se transcriben en ARNm y luego traducen en proteína y los que se transcriben en ARN, pero no se traducen en las proteínas (por ejemplo, transferencia y ARN ribosómico).

30 Secuencia de control de la expresión: como se utiliza en este documento, se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para afectar la expresión de secuencias codificantes a las que están unidos operativamente. Las secuencias de control de la expresión son secuencias que controlan la transcripción, eventos post-transcripcional y la traducción de secuencias de ácidos nucleicos. 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 ARNm citoplásmico; secuencias que aumentan la eficiencia de traducción (por ejemplo, sitios de unión a ribosoma); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariotas, tales secuencias de control generalmente incluyen promotor, sitio de unión a ribosoma, y secuencia de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias socias de fusión.

35 Sobreexpresión: Cuando un gen es producido para ser transcrito a una tasa elevada en comparación con la tasa de transcripción endógena para ese gen. En algunos ejemplos, la sobreexpresión incluye, además, una elevada tasa de traducción del gen en comparación con la tasa de traducción endógena para ese gen. Los métodos de ensayo para la sobreexpresión son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, se pueden evaluar los niveles de ARN transcrito utilizando la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR) y se pueden evaluar los niveles de proteína utilizando análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Adicionalmente, se considera que un gen se sobreexpresa cuando muestra actividad elevada en comparación con su actividad endógena, lo que puede ocurrir, por ejemplo, a través de reducción en la concentración o actividad de su inhibidor, o mediante la expresión de la versión mutante con actividad elevada. En realizaciones preferidas, cuando la célula huésped 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 alrededor de los genes explícitamente nativos.

45 Inhibición de la expresión: Cuando se provoca que un gen se transcriba a una tasa reducida en comparación con la tasa de transcripción de genes endógenos para ese gen. En algunos ejemplos, la inhibición de la expresión incluye adicionalmente un nivel reducido de la traducción del gen en comparación con la tasa de traducción endógena para ese gen. Métodos de ensayo para la inhibición de la expresión son bien conocidos por aquellos en el arte. Por ejemplo, los

niveles de ARN transcrito se pueden evaluar mediante RT-PCR, y los niveles de proteína pueden ser evaluados utilizando el análisis de SDS-PAGE.

5 Desactivación: Un gen cuyo nivel de expresión o actividad se ha reducido a cero. En algunos ejemplos, un gen es desactivado a través de la delección de algo o toda su secuencia de codificación. En otros ejemplos, un gen es desactivado a través de la introducción de uno o más nucleótidos en su marco de lectura abierto, lo que resulta en la traducción de un producto de proteína no-sentido o de otro modo no funcional.

Autótrofo: Los autótrofos (o los organismos autótrofos) son organismos que producen compuestos orgánicos complejos de moléculas inorgánicas simples y una fuente externa de energía, como la luz (fotoautótrofo) o reacciones químicas de los compuestos inorgánicos.

10 Hidrocarburos: El término generalmente se refiere a un compuesto químico que consta de 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, solventes y aceites. Los hidrocarburos abarcan los biocombustibles, así como plásticos, ceras, solventes y aceites.

15 "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 de equilibrio del compuesto en una fase orgánica (en un sistema bi-fásico la fase orgánica es generalmente la fase formada por el derivado de ácido graso durante el proceso de producción, sin embargo, en algunos ejemplos una fase orgánica puede ser proporcionada (tal como una capa de octano para facilitar la separación del producto) dividida por la
20 concentración en equilibrio en una fase acuosa (i.e., caldo de fermentación). Cuando se describe un sistema de dos fases el P generalmente se discute en términos de logP. Un compuesto con un 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.

25 Ruta biosintética: También se conoce como "ruta metabólica", se refiere a un conjunto de anabólicos o reacciones bioquímicas catabólicas para convertir (transmutar) una especie química en otra. Por ejemplo, una ruta biosintética de hidrocarburo se refiere al conjunto de reacciones bioquímicas que convierten insumos y/o metabolitos a intermedios como productos de hidrocarburos y luego a hidrocarburos o productos de hidrocarburos. Las rutas anabólicas implican la construcción de una molécula más grande desde moléculas más pequeñas, un proceso que requiere energía. Las rutas catabólicas implican ruptura de moléculas mayor tamaño, a menudo liberando energía.

30 Celulosa: La celulosa $[(C_6H_{10}O_5)_n]$ es un carbohidrato polisacárido polímero de cadena larga, de beta-glucosa. Esta forma el componente estructural principal de las plantas y no es digerible por los seres humanos. La celulosa es un material común en las paredes celulares de la planta y se observó primero como tal en 1838. Se produce naturalmente en forma casi pura sólo en la fibra de algodón; en combinación con lignina y cualquier hemicelulosa, que se encuentra en todo el material vegetal.

35 Biocombustible: Un biocombustible es cualquier combustible que se deriva desde una fuente biológica. El biocombustible se refiere a uno o más hidrocarburos, uno o más alcoholes, uno o más ésteres grasos o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, se utilizan hidrocarburos líquidos.

40 "Componente de combustible" es cualquier compuesto o una mezcla de compuestos que se utilizan para formular una composición de combustible. Existen "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 por menos del 50%. Los aditivos de combustible son componentes de combustible menores. Los compuestos isoprenoides revelados en este documento pueden ser un componente principal o un componente menor, por sí mismo o en una mezcla con otros componentes de combustible.

45 Como se usa en este documento, una composición que es un compuesto "sustancialmente puro" está sustancialmente libre de uno o más de otros compuestos, i.e., 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 menos 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
50 volumen, menos del 0.1 % en volumen, o menos del 0.01 % en volumen del uno o más otros compuestos, basándose en el volumen total de la composición.

55 Molécula de ácido nucleico: El término abarca tanto moléculas de ARN como de ADN, incluyendo, sin limitación, ADNc, ADN genómico, y ARNm y también incluye moléculas de ácidos nucleicos sintéticos, tales como los que se sintetizan químicamente o se producen de forma recombinante. La molécula de ácido nucleico puede ser bicatenaria o monocatenaria, circular o lineal. Si es monocatenaria, la molécula de ácido nucleico puede ser la cadena sentido o la cadena antisentido.

Ácido nucleico diseñado genéticamente: Un "ácido nucleico diseñado genéticamente" es una molécula de ácido nucleico que incluye al menos una diferencia de una molécula de ácido nucleico de origen natural. Un ácido nucleico diseñado genéticamente incluye todas las secuencias heterólogas no modificadas y modificadas exógenas (i.e., secuencias derivadas de un organismo o célula diferente del que hospede el ácido nucleico diseñado genéticamente), así como genes endógenos, operones, secuencias codificantes, o secuencias no codificantes, que han sido modificados, mutados, o que incluyen deleciones o inserciones en comparación con una secuencia de origen natural. Los ácidos nucleicos diseñados genéticamente también incluyen todas las secuencias, independientemente del origen, que están unidos a un promotor inducible o a otra secuencia de control con los que no están asociados de forma natural.

Condiciones de fermentación apropiadas. El término generalmente se refiere a medios de fermentación y condiciones ajustables con, pH, temperatura, niveles de aireación, etc., preferiblemente condiciones óptimas que permiten a los microorganismos para producir productos a base de carbono de interés. Para determinar si las condiciones de cultivo permiten la producción de productos, el microorganismo se puede cultivar durante aproximadamente 24 horas a una semana después de la inoculación y una muestra se puede obtener y analizar. Las células en la muestra o el medio en el cual se cultivan las células se ensayan para determinar la presencia del producto deseado.

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 el polinucleótido nativo en su célula huésped natural, por ejemplo, ribosomas, polimerasas, y secuencias genómicas con las que se asocia naturalmente. El término abarca un ácido nucleico o polinucleótido que (1) se ha retirado desde su entorno de origen natural, (2) no está asociado con toda o una porción de un polinucleótido en el cual el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (3) está unido operativamente a un polinucleótido al cual no está unido en la naturaleza, o (4) no se produce en la naturaleza. El término "aislado" o "sustancialmente puro" se puede utilizar también en referencia a aislados de ADN recombinante o clonado, los análogos de polinucleótidos sintetizados químicamente, o análogos de polinucleótidos que son sintetizados biológicamente por sistemas heterólogos. Sin embargo, los "aislados" no requieren necesariamente que el ácido nucleico o polinucleótido descrito de esta manera haya sido retirado en sí físicamente de su entorno nativo. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico endógeno en el genoma de un organismo se considera "aislado" en este documento si una secuencia heteróloga (i.e., una secuencia que no es, naturalmente, adyacente a esta secuencia de ácido nucleico endógena) se coloca adyacente a la secuencia de ácido nucleico endógena, de tal manera que la expresión de esta secuencia de ácido nucleico endógena se altera. A modo de ejemplo, una secuencia promotora no nativa puede ser sustituida (por ejemplo, mediante recombinación homóloga) para el promotor nativo de un gen en el genoma de una célula humana, de tal manera que este gen tiene un patrón de expresión alterado. Este gen sería ahora convertido en "aislado" debido a que se separa desde al menos algunas de las secuencias que naturalmente lo flanquean. Un ácido nucleico también se considera "aislado" si contiene cualquier modificación que no se produzca naturalmente al ácido nucleico correspondiente en un genoma. Por ejemplo, una secuencia codificante endógena se considera "aislada" si contiene una inserción, deleción o una mutación puntual introducida artificialmente, por ejemplo, por la intervención humana. Un "ácido nucleico aislado" también incluye un ácido nucleico integrado en un cromosoma de la célula huésped en un sitio heterólogo, así como una construcción del ácido nucleico presente como un episoma. Además, un "ácido nucleico aislado" puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o sustancialmente libre de medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. El término también abarca moléculas de ácidos nucleicos y proteínas preparados por expresión recombinante en una célula huésped, así como moléculas de ácidos nucleicos y proteínas sintetizados 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 se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, en el mismo marco de lectura. Las configuraciones de genes separados que se transcriben en tándem como un solo ARN mensajero se indican como operones. Por lo tanto, la colocación de genes en estrecha proximidad, por ejemplo, en un vector plasmídico, bajo la regulación transcripcional de un promotor único, que constituye un operón sintético.

Purificado: El término purificado no requiere pureza absoluta; más bien, se pretende como un término relativo. Así, por ejemplo, una preparación de producto purificado, es una en la cual el producto es más concentrado de lo que está el producto en su entorno dentro de una célula. Por ejemplo, una cera purificada es una que está separada sustancialmente de componentes celulares (ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, y otros péptidos) que pueden acompañar a la misma. En otro ejemplo, una preparación de cera purificada es una en la que la cera está sustancialmente libre de contaminantes, tales como los que puedan estar presentes después de la fermentación.

Detectable: capaz de tener una existencia o presencia comprobada utilizando diversos métodos de análisis tal como se describe a lo largo de la descripción o de otra manera conocida para un experto en el arte.

Recombinante: Una proteína o molécula de ácido nucleico recombinante es una que tiene una secuencia que no es de origen natural, tiene una secuencia que se hace por una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otro modo, o ambos. Esta combinación artificial se puede lograr, por ejemplo, por síntesis química o por la manipulación artificial de segmentos aislados de moléculas de ácidos nucleicos o proteínas, tales como técnicas de

ingeniería genética. Recombinante también se utiliza para describir moléculas de ácido nucleico que han sido manipulados artificialmente, pero contienen las mismas secuencias reguladoras y las regiones codificantes que se encuentran en el organismo desde el cual se aisló el ácido nucleico.

5 El término "célula huésped recombinante" ("célula huésped de expresión", "sistema huésped de expresión", "sistema de expresión", o simplemente "célula huésped"), como se usa en este documento, se refiere a una célula en la cual un vector recombinante se ha introducido, por ejemplo, un vector que comprende acil-CoA sintasa. Se debe entender que tales términos pretenden referirse no sólo a la célula objeto particular sino a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula progenitora, pero aun así se incluyen dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en este documento. Una célula huésped recombinante puede ser una célula aislada o línea celular cultivada en cultivo o puede ser una célula que reside en un tejido vivo o un organismo.

15 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 se activa puede ser facilitada por uno o más péptidos del transportador y en algunos ejemplos puede consumir energía. Cuando la liberación es pasiva, puede ser a través de difusión a través de la membrana y se puede facilitar mediante la recolección continuamente del compuesto deseado desde el entorno extracelular, promoviendo así aún más la difusión. La liberación de un compuesto también se puede lograr mediante la lisis de una célula.

20 Surfactantes: sustancias capaces de reducir la tensión superficial de un líquido en el cual se disuelven. Por lo general se componen de una cabeza soluble en agua y una cadena de hidrocarburo o cola. El grupo soluble en agua es hidrófilo y puede ser ya sea iónico o no iónico, y la cadena de hidrocarburo es hidrófoba. Los surfactantes se usan en una variedad de productos, incluyendo detergentes y limpiadores, y también se utilizan como auxiliares para textiles, cuero y papel, en los procesos químicos, en cosméticos y productos farmacéuticos, en la industria alimentaria y en la agricultura. Además, pueden ser utilizados para ayudar en la extracción y aislamiento de aceites crudos que se encuentran en lugares de difícil acceso o como emulsiones en agua.

25 Existen cuatro tipos de surfactantes caracterizados por diversos usos. Los surfactantes aniónicos tienen actividad como detergente y generalmente se usan para aplicaciones de limpieza. Los surfactantes catiónicos contienen hidrocarburos de cadena larga y, a menudo se utilizan para tratar las proteínas y polímeros sintéticos o son componentes de los suavizantes y acondicionadores para el pelo. Los surfactantes anfóteros también contienen hidrocarburos de cadena larga y se utilizan normalmente en los champús. Los surfactantes no iónicos se utilizan generalmente en productos de limpieza.

30 Vector: El término "vector", como se usa en este documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular, en el cual segmentos de ADN adicionales se pueden unir. Otros vectores incluyen cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y cromosomas artificiales de levadura (YAC). Otro tipo de vector es un vector viral, en donde segmentos de ADN adicionales se pueden unir en el genoma viral (discutido en más detalle a continuación). Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores que tienen un origen de replicación que funciona en la célula huésped). Otros vectores se pueden integrar en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de ese modo se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores preferidos son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en este documento como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en el arte.

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

50 Éster graso: Incluye cualquier éster obtenido de un ácido graso. Las cadenas de carbono en ácidos grasos pueden contener cualquier combinación de las modificaciones descritas en este documento. Por ejemplo, la cadena de carbono puede contener uno o más puntos de insaturación, uno o más puntos de ramificación, incluyendo la ramificación cíclica, y puede ser diseñado para ser corto o largo. Cualquier alcohol se puede utilizar para formar ésteres de ácidos grasos, por ejemplo, alcoholes derivados de la ruta biosintética de ácidos grasos, alcoholes producidos por el huésped de producción a través de las rutas biosintéticas de ácido no graso, y alcoholes que se suministran en el caldo de fermentación.

55 Ácido graso: Incluye productos o derivados de los mismos realizados en parte desde la ruta biosintética de ácidos grasos del organismo huésped. La ruta biosintética de ácidos grasos incluye enzimas ácido graso sintetas que pueden ser diseñadas como se describe en este documento para producir derivados de ácidos grasos, y en algunos ejemplos se puede expresar con enzimas adicionales para producir derivados de ácidos grasos que tienen características de la cadena de carbono deseadas. Los derivados de ácidos grasos de ejemplo incluyen, por ejemplo, alcoholes de cadena corta y larga, hidrocarburos y ésteres de ácidos grasos incluyendo ceras.

Métodos generales para microorganismos diseñados genéticamente para producir productos basados en carbono

Los métodos para microorganismos diseñados genéticamente para producir productos a base de carbono se basan en los principios de la ingeniería metabólica, y usos, por ejemplo, las rutas diseñadas genéticamente como se describe, por ejemplo, en WO 2007/136762 y WO 2007/139925 para hacer productos de energía capturados por organismos fotoautotróficos. Generalmente, los productos a base de carbono de interés se producen mediante la expresión de un gen o un conjunto de genes como se describe en la figura 1 en un microorganismo fotoautotrófico, por ejemplo, cianobacterias, tal como se describe en este documento. Los plásmidos se construyen para expresar diversas proteínas que son útiles en la producción de productos a base de carbono, como se describe en los ejemplos en este documento, por ejemplo, el ejemplo 1. Las construcciones se pueden hacer sintéticamente o hacer utilizando métodos estándar de biología molecular 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 huésped y los correspondientes transformantes se seleccionan en la placa LB suplementada con antibióticos tales como la espectinomicina, carbenicilina, etc. Utilizando técnicas de biología molecular estándar, células en las que se ha introducido una molécula de ácido nucleico son transformados para expresar o sobre-expresar los genes deseados, mientras que otras moléculas de ácido nucleico se atenúan o suprimen funcionalmente. Las técnicas de transformación por las cuales una molécula de ácido nucleico se puede introducir en dicha célula, incluyendo, pero no limitadas a, la transfección con vectores virales, conjugación, transformación con vectores de plásmidos, y la introducción de ADN desnudo mediante electroporación, lipofección y aceleración con pistola de partículas. Los transformantes se inoculan en un medio apropiado. Las muestras que contienen los transformantes se cultivan a temperaturas apropiadas en un agitador hasta que llegan a una cierta DO. A continuación, las células se sedimentan por centrifugación y se suspenden los pellets celulares. Las técnicas de separación permiten que la muestra se someta a análisis mediante GC/MS. Se determina el rendimiento total.

Microorganismos seleccionados o diseñados genéticamente para la producción de productos a base de carbono de interés

Microorganismos: incluye especies microbianas procariontas y eucariotas a partir de los dominios Archaea, Bacteria y Eucarya, incluyendo estos últimos levaduras y hongos filamentosos, protozoos, algas, o Protista superior. Los términos "células microbianas" y "microbios" se usan de forma intercambiable con el término microorganismo. Los organismos apropiados incluyen extremófilos que soportan diversos parámetros ambientales tales como temperatura, radiación, presión, gravedad, vacío, desecación, salinidad, pH, tensión de oxígeno, y productos químicos. Ellos incluyen hipertermófilos, que crecen en o por encima de 80 °C como *Pyrolobus fumarii*; termófilos, que crecen entre 60 a 80 °C tales como *Synechococcus lividis*; mesófilos, que crecen entre 15-60 °C y psicrófilos, que crecen en o por debajo de 15 °C tales como *Psychrobacter* y algunos insectos. Los organismos tolerantes a la radiación incluyen *Deinococcus radiodurans*. Los organismos tolerantes a presión incluyen piezófilos o barófilos que toleran la presión de 130 MPa. También se contemplan organismos tolerantes a la hipergravedad (por ejemplo, > 1 g) e hipogravedad (por ejemplo, <1 g). Los organismos tolerantes al vacío incluyen tardígrados, insectos, microbios y semillas. Organismos tolerantes y anhidrobióticos desecantes incluyen xerófilos tales como *Artemia salina*; nematodos, microbios, hongos y líquenes. Organismos tolerantes a la sal incluyen halófilos (por ejemplo, NaCl 2-5 M) *Halobacteriaceae* y *Dunaliella salina*. Los organismos tolerantes a pH incluyen alcalófilos como *Natronobacterium*, *Bacillus firmus* OF4, *Spirulina spp.* (por ejemplo, pH > 9) y acidófilos tales como *Cyanidium caldarium*, *Ferroplasma sp.* (por ejemplo, un pH bajo). Los anaerobios, que no pueden tolerar O₂ tales como *Methanococcus jannaschii*; microaerófilos, que toleran algunos O₂ tales como *Clostridium* y aerobios, que requieren O₂ también se contemplan. Los organismos tolerantes de gas, que toleran CO₂ puro incluyen *Cyanidium caldarium* y organismos tolerantes a metales incluyen metalotolerantes 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. New York: Plenum (1998) y Seckbach, J. "Search for Life in the Universe with Terrestrial Microbes Which Thrive Under Extreme Conditions." In Cristiano Batalli Cosmovici, Stuart Bowyer, y Dan Wertheimer, eds., Astronomical and Biochemical Origins and the Search for Life in the Universe, p. 511. Milan: Editrice Compositori (1997).

Las algas y las cianobacterias incluyen, pero no se limitan a los siguientes géneros:

Acanthoceras, Acanthococcus, Acaryochloris, Achnanthes, Achnanthidium, Actinastrum, Actinochloris, Actinocyclus, Actinotaenium, Amphichrysis, Amphidinium, Amphikrikos, Amphipleura, Amphiprora, Amphithrix, Amphora, Anabaena, Anabaenopsis, Aneumastus, Ankistrodesmus, Ankyra, Anomooneis, Apatococcus, Aphanizomenon, Aphanocapsa, Aphanochaete, Aphanothece, Apiocystis, Apistonema, Arthrodesmus, Artherospira, Ascochloris, Asterionella, Asterococcus, Audouinella, Aulacoseira, Bacillaria, Balbiania, Bambusina, Bangia, Basichlariys, Batrachospermum, Binuclearia, Bitrichia, Blidingia, Botrdiopsis, 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, Chlamydoublepharis, Chlamydocapsa, Chlamydomonas, Chlamydomonopsis, Chlamydomyxa, Chlamydonephris, Chlorangiella, Chlorangiopsis, Chlorella, Chlorobotrys, Chlorobrachis, Chlorochytrium, Chlorococcum, Chlorogloea, Chlorogloeopsis, Chlorogonium, Chlorolobion, Chloromonas, Chlorophysemma, Chlorophyta, Chlorosaccus, Chlorosarcina, Choricystis, Chromophyton, Chromulina, Chroococcidiopsis, Chroococcus, Chroodactylon, Chroomonas, Chroothece, Chrysamoeba, Chrysapsis, Chrysidiastrum,

Chrysocapsa, Chrysocapsella, Chrysochaete, Chrysochromulina, Chrysococcus, Chrysocrinus, Chrysolepidomonas,
 Chrysolkyos, Chrysonebula, Chrysophyta, Chrysopyxis, Chrysosaccus, Chrysosphaerella, Chrysostephanosphaera,
 Clodophora, Clastidium, Closteriopsis, Closterium, Coccoomyxa, Cocconeis, Coelastrella, Coelastrum, Coelosphaerium,
 5 Coenochloris, Coenococcus, Coenocystis, Colacium, Coleochaete, Collodictyon, Compsogonopsis, Compsopogon,
 Conjugatophyta, Conochaete, Coronastrum, Cosmarium, Cosmioneis, Cosmocladium, Crateriportula, Craticula,
 Crinalium, Crucigenia, Crucigeniella, Cryptoaulax, Cryptomonas, Cryptophyta, Ctenophora, Cyanodictyon,
 Cyanonephron, Cyanophora, Cyanophyta, Cyanothece, Cyanothomonas, Cyclonexis, Cyclostephanos, Cyclotella,
 Cylindrocapsa, Cylindrocystis, Cylindrospermum, Cylindrotheca, Cymatopleura, Cymbella, Cymbellonitzschia,
 10 Cystodinium Dactylococopsis, 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, Distrionella, Docidium, Draparnaldia, Dunaliella, Dysmorphococcus, Ecbalocystis, Elakatothrix,
 15 Ellerbeckia, Encyonema, Enteromorpha, Entocladia, Entomoneis, Entophysalis, Epichrysis, Epipyxis, Epithemia,
 Eremosphaera, Euastropsis, 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,
 20 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,
 25 Hyalodiscus, Hyalogonium, Hyalotheca, Hydrianium, 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,
 30 Gastogloia, Melosira, Merismopedia, Mesostigma, Mesotaenium, Micractinium, Micrasterias, Microchaete, Microcoleus,
 Microcystis, Microglena, Micromonas, Microspora, Microthamnion, Mischochlois, Monochrysis, Monodus, Monomastix,
 Monoraphidium, Monostroma, Mougeotia, Mougeotiopsis, Myochloris, Myromecia, Myxosarcina, Naegeliella,
 Nannochloris, Nautococcus, Navicula, Neglectella, Neidium, Nephrocladus, Nephrocystium, Nephrodiella, Nephroselmis,
 Netrium, Nitella, Nitellopsis, Nitzschia, Nodularia, Nostoc, Ochromonas, Oedogonium, Oligochaetophora, Onychonema,
 Oocardium, Oocystis, Opephora, Ophiocytium, Orthoseira, Oscillatoria, Oxyneis, Pachycladella, Palmella, Palmodictyon,
 35 Pnadorina, Pannus, Paralia, Pascherina, Paulschulzia, Pedastrum, Pedinella, Pedinomonas, Pedinopera,
 Pelagodictyon, Penium, Peranema, Peridiniopsis, Peridinium, Peronia, Petroneis, Phacotus, Phacus, Phaeaster,
 Phaeodermatium, Phaeophyta, Phaeosphaera, Phaeothamnion, Phormidium, Phycopeltis, Phyllariochloris,
 Phyllocardium, Phyllomitis, Pinnularia, Pitophora, Placoneis, Planctonema, Planktosphaeria, Planothidium, Plectonema,
 Pleodorina, Pleurastrum, Pleurocapsa, Pleurocladia, Pleurodiscus, Pleurosigma, Pleurosira, Pleurotaenium,
 40 Pocillomonas, Podohedra, Polyblepharides, Polychaetophora, Polyedriella, Polyedriopsis, Polygoniochloris,
 Polyepidomonas, Polytaenia, Polytoma, Polytomella, Porphyridium, Posteriochromonas, Prasinocloris, Prasinocladus,
 Prasinophyta, Prasiola, Prochlorophyta, Prochlorothrix, Protoderma, Protosiphon, Provasoliella, Prymnesium,
 Psammodictyon, Psammothidium, Pseudanabaena, Pseudenoelidium, Pseudocarteria, Pseudochate,
 Pseudocharacium, Pseudococcomyxa, Pseudodictyosphaerium, Pseudokephyrion, Pseudoncobyrza, Pseudoquadrigula,
 45 Pseudosphaerocystis, Pseudostaurastrum, Pseudostaurisira, Pseudotetrastrum, Pteromonas, Punctastruata,
 Pyramichlamys, Pyramimonas, Pyrrophyta, Quadrichloris, Quadricoccus, Quadrigula, Radiococcus, Radiofilum,
 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,
 50 Scotiellopsis, Scourfieldia, Scytonema, Selenastrum, Selenochloris, Sellaphora, Semiorbis, Siderocelis, Diderocystopsis,
 Dimonsenia, Siphononema, Sirocladium, Sirogonium, Skeletonema, Sorastrum, Spermatozopsis, Sphaerellopsis,
 Sphaerellopsis, Sphaerodinium, Sphaeroplea, Sphaerozosma, Spiniferomonas, Spirogyra, Spirotaenia, Spirulina,
 Spondylomorom, Spondylosium, Sporotetrax, Spumella, Staurastrum, Stauerodesmus, Stauroneis, Staurisira,
 Staurisirella, Stenopterobia, Stephanocostis, Stephanodiscus, Stephanoporos, Stephanosphaera, Stichococcus,
 55 Stichogloea, Stigeoclonium, Stigonema, Stipitococcus, Stokesiella, Strombomonas, Stylochrysalis, Stylocladium,
 Styloxys, Stylosphaeridium, Surirella, Sykidion, Symploca, Synechococcus, Synechocystis, Synedra, Synochromonas,
 Synura, Tabellaria, Tabularia, Teilingia, Temnogametum, Tetmemorus, Tetrachlorella, Tetracyclus, Tetrademus,
 Tetraediella, Tetraedron, Tetraselmis, Tetraspora, Tetrastrum, Thalassiosira, Thamniochaete, Thorakochloris, Thorea,
 Tolypella, Tolypothrix, Trachelomonas, Trachydiscus, Trebouxia, Trentepohlia, Treubaria, Tribonema, Trichodesmium,
 60 Trichodiscus, Trochiscia, Tryblionella, Ulothrix, Uroglena, Uronema, Urosolenia, Urospora, Uva, Vacuolaria, Vaucheria,
 Volvox, Volvulina, Westella, Woloszynskia, Xanthidium, Xanthophyta, Xenococcus, Zygnema, Zygnemopsis, y
 Zygonium.

La conversión Hiperfotosintética requiere una amplia modificación genética; por lo tanto, en realizaciones preferidas, el organismo foto autótrofo parental puede ser transformado con el ADN exógeno.

Los organismos preferidos para la conversión Hiperfotosintética incluyen: *Synechococcus* sp PCC 7002, *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803, y *Thermosynechococcus elongatus* BP-1.

Sin embargo, otros organismos apropiados incluyen células sintéticas o células producidas por genomas sintéticos como se describe en Venter et al. US Pat. Pub. No. 2007/0264688, y los sistemas similares a células o células de síntesis como se describe en Glass et al. US Pat. Pub. No. 2007/0269862.

Un tema común en la selección o diseño genéticamente de un organismo apropiado es la fijación autótrofa de carbono, tales como el CO₂ a los productos. Esto cubriría la fotosíntesis y la metanogénesis. La acetogénesis, que abarca los tres tipos de fijación de CO₂; ciclo de Calvin, ruta de acetil CoA y ruta TCA reductiva también está cubierta. La capacidad de usar dióxido de carbono como la única fuente de carbono celular (autotrofia) se encuentra en casi todos los grupos principales de procariotas. Las rutas de fijación de CO₂ difieren entre los grupos, y no hay ningún patrón de distribución claro de las cuatro rutas autótrofas actualmente conocidas. Fuchs, G. 1989. Alternative pathways of autotrophic CO₂ fixation, p. 365-382. In H. G. Schlegel, and B. Bowien (ed.), *Autotrophic bacteria*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. El ciclo reductor de la pentosa fosfato (ciclo Calvin-Benson-Bassham) representa la ruta de fijación de CO₂ en casi todas las bacterias autótrofas aeróbicas, por ejemplo, las cianobacterias.

15 Propagación de microorganismos seleccionados

Los métodos para el cultivo de organismos fotosintéticos en medios líquidos y en placas que contienen agarosa son bien conocidos para los expertos en el arte (véase, por ejemplo, sitios web asociados con ATCC, y con el Instituto Pasteur). Por ejemplo, *Synechococcus* sp. células PCC 7002 (disponibles de la Colección de Cultivos 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 de amonio férrico 0.03 mM, EDTA 0.003 mM, Na₂CO₃ 0.19 mM, 2.86 mg/L de H₃BO₃, 1.81 mg/L de MnCl₂, 0.222 mg/L de ZnSO₄, 0.390 mg/L de Na₂MoO₄, 0.079 mg/L de CuSO₄, y 0.049 mg/L de Co(NO₃)₂, pH 7.4) suplementado con 16 µg/L de biotina, MgSO₄ 20 mM, KCl 8 mM, y NaCl 300 mM (véase, por ejemplo, un sitio web asociado con el Institute Pasteur, and 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). Normalmente, los cultivos se mantienen a 28 °C y se burbujeó continuamente con 5% de CO₂ bajo una intensidad de luz de 120 µmol de fotones/m²/s. Alternativamente, tal como se describe en el ejemplo. 1, *Synechococcus* sp. células PCC 7002 se cultivan en medio A⁺ como se describe anteriormente [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 en el Kazusa DNAResearch Institute, Japón) se propaga en medio BG11 suplementado con TES-KOH 20 mM (pH 8.2) como se describe anteriormente [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]. Normalmente, los cultivos se mantienen a 50 °C y se burbujean continuamente con 5% de CO₂ en virtud de una intensidad de luz de 38 µmol de fotones/m²/s. *T. elongatus* BP-1 se pueden cultivar en medio A⁺ también como se describe en el Ejemplo 2.

Lo anterior define las condiciones típicas de propagación. En su caso, las incubaciones se realizan utilizando medios alternativos o composiciones de gas, temperaturas alternas (5 - 75 °C), y/o flujos de luz (0-5500 µmol de fotones /m²/s).

La luz se suministra a través de una variedad de mecanismos, incluyendo la iluminación natural (luz solar), bombillas incandescentes estándar, fluorescentes, o halógenas, o por medio de propagación en cámaras de crecimiento iluminadas especialmente diseñadas (por ejemplo, Model LI15 Illuminated Growth Chamber (Sheldon Manufacturing, Inc. Cornelius, OR). Para los experimentos que requieren longitudes de onda y/o intensidades específicas, la luz se distribuye a través de diodos emisores de luz (LED), en los cuales los espectros de longitud de onda y la intensidad pueden ser controladas cuidadosamente (Philips).

El dióxido de carbono se suministra a través de la inclusión de suplementos de medios sólidos (i.e., bicarbonato de sodio) o como un gas a través de su distribución en la incubadora del crecimiento o medios. La mayoría de los experimentos se realizaron utilizando gas de dióxido de carbono concentrado, a concentraciones entre 1 y 30%, lo que se hace burbujear directamente en el medio de cultivo a velocidades suficientes para proporcionar la mezcla para los organismos. Cuando se utiliza el gas de dióxido de carbono concentrado, el gas se origina en forma pura desde cilindros disponibles en el mercado, o preferentemente desde fuentes concentradas incluyendo descarga gaseosa o gases de escape de plantas de carbón, refinerías, instalaciones de producción de cemento, instalaciones de gas natural, cervecerías, y similares.

Transformación de microorganismos seleccionados

Se transforman las células *Synechococcus* sp. PCC 7002 de acuerdo con el protocolo optimizado 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 (18 g/L de NaCl, 5 g/L de MgSO₄. 7 H₂O, 30 mg/L de Na₂EDTA, 600 mg/L de KCl, 370 mg/L de CaCl₂. 2 H₂O, 1 g/L de NaNO₃, 50 mg/L de KH₂PO₄, 1 g/L de Trizma base pH 8.2, 4 µg/L de Vitamina B12, 3.89 mg/L de FeCl₃. 6 H₂O, 34.3 mg/L H₃BO₃, 4.3 mg/L de MnCl₂. 4 H₂O, 315 µg/L de

ZnCl₂, 30 µg/L de MoO₃, 3 µg/L de CuSO₄ · 5 H₂O, 12.2 µg/L de CoCl₂ · 6 H₂O [Stevens SE, Patterson COP, and Myers J. "The production of hydrogen peroxide by green algae: a survey." J. Phycology (1973). 9:427-430] más 5g/L de NaNO₃ a aproximadamente 108 células/mL. Nueve volúmenes de células se mezclan con 1 volumen de 1-10 µg/mL de ADN en NaCl 0.15 M/Na₃citrato 0.015 M y se incubaron a 27-30 °C, durante 3 horas antes de la adición de 1 volumen de ADNasa I a una concentración final de 10 µg/mL. Las células se sembraron en placas en 2.5mL de medio A al 0.6% de agar de recubrimiento que fue atemperado a 45 °C y se incubó. Las células se estimularon con antibiótico poniendo por debajo 2.0 mL de medio A al 0.6% de agar, que contiene la concentración apropiada de antibiótico con una pipeta Pasteur estéril. Los transformantes se recogieron 3-4 días más tarde. Las selecciones se realizan por lo general utilizando 200 µg/mL de kanamicina, 8 µg/mL de cloranfenicol, 10 µg/mL de espectinomicina en medios sólidos, mientras que 150 µg/mL de kanamicina, 7 µg/mL de cloranfenicol, y 5 µg/mL de espectinomicina se emplean en medio líquido.

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

Se transforman *E. coli* utilizando técnicas estándar conocidas para los expertos en el arte, incluyendo choque térmico de las células químicamente competentes y electroporación [Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif; Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning-A Laboratory Manual (2nd ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; y Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (a través de e incluyendo el Suplemento de 1997)].

Las rutas biosintéticas como se describen en este documento en primer lugar primero se prueban y optimizan utilizando plásmidos episódicos descritos anteriormente. Las optimizaciones no limitantes incluyen intercambio y puesta a punto del promotor, manipulación del sitio de unión del ribosoma, alteración de orden de los genes (por ejemplo, gen *ABC* frente *BAC*, *CBA*, *CAB*, *BCA*), coexpresión de chaperones moleculares, mutagénesis aleatoria o dirigida de secuencias de genes para aumentar o disminución de la actividad, plegado, o regulación alostérica, expresión de secuencias de genes de especies alternativas, manipulación del codón, adición o eliminación de las secuencias dirigidas intracelulares tales como secuencias señal, y similares.

Cada gen o ácido nucleico diseñado genéticamente es optimizado de forma individual, o, alternativamente, en paralelo. Las secuencias génicas y promotoras funcionales están integradas posteriormente en el cromosoma de *E. coli* para permitir la propagación estable en ausencia de presión selectiva (i.e., inclusión de antibióticos) utilizando técnicas estándar conocidas para los expertos en el arte.

La figura 1 enumera los genes implicados en la producción de productos a base de carbono de interés, relacionados con las rutas asociadas, números de comisión de enzimas (CE), nombres de genes de ejemplo, organismo fuente, números de referencia 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 se puede sobreexpresar o atenuar. En otras circunstancias, es útil sobreexpresar o atenuar un gen exógeno, que permite un control regulador más explícito en el bioproceso y un medio para mitigar potencialmente los efectos de la regulación del metabolismo central, que se centra alrededor de los genes nativos de forma explícita.

Producción de Etanol

La figura 2 provee una ruta para producir etanol, succinato y derivados de los mismos.

Hasta la fecha, los rendimientos actuales de etanol producido en las cianobacterias no son apropiados para la producción comercial a 1.3 mM por OD₇₃₀ por día, como se revela en WO 2007/084477, o 1.7 µmol de etanol por mg de clorofila por hora, como se muestra en la Patente de los Estados Unidos No. 6,699,696.

La presente invención, por lo tanto, provee una célula huésped capaz de fijar el CO₂ que produce etanol a un nivel comercial, por ejemplo, entre aproximadamente 50 y 150 g/L en aproximadamente un período de 48 horas. En ciertas realizaciones, la tasa de productividad de etanol está en el intervalo de aproximadamente 2.5 g/L-hr a aproximadamente 5 g/L-hr. En una realización, una célula huésped capaz de fijar el CO₂ tal como una cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7002 está diseñada genéticamente para expresar genes tales como *pdh* y/o *adh* como se describe. Tal microorganismo recombinante codifica la actividad PDC convirtiendo el ácido pirúvico a acetoaldehído y/o actividad ADH convirtiendo acetoaldehído a etanol. La capacidad del microorganismo transformado para fijar CO₂ evita la necesidad de suplementar, ya sea con azúcares o biomasa. De acuerdo con lo anterior, los microorganismos de la presente invención son alternativas atractivas para producir biocombustibles. La presente invención provee el peso/vol. de etanol para que sea al menos 50, o al menos 60 o al menos 70 o al menos 80 o al menos 90 o al menos 100 o al menos 125 o al menos 150 g/L o de otra manera producido a escala comercial.

Selección de enzimas y enzimas óptimas

5 En la actualidad, los productos de fermentación tales como etanol, butanol, ácido láctico, formiato, acetato producidos en los organismos biológicos emplean un proceso dependiente de NADH. Se usa NAD para descomponer la glucosa u otras fuentes de azúcar para formar NADH. NADH se recicla durante la fermentación a NAD⁺ para permitir la interrupción adicional de azúcar, lo que resulta en productos secundarios de fermentación. Durante la fotosíntesis, sin embargo, la célula forma NADPH, que se utiliza sobre todo para las operaciones de biosíntesis en los organismos biológicos, por ejemplo, para la división, crecimiento celular, y para la construcción de almacenes de químicos, tales como glucógeno, sacarosa, y otras macromoléculas. Los productos de fermentación se producen en la luz, pero en pequeñas cantidades.

10 El uso de enzimas naturales o diseñadas genéticamente que utilizan NADPH como una fuente para reducir la energía en lugar de NADH permite el uso directo de energía reductora fotosintética hacia la formación de productos secundarios normalmente fermentativos. De acuerdo con lo anterior, la presente invención provee métodos para producir etanol que comprende cultivar una cianobacteria diseñada genéticamente que comprende un gen del alcohol deshidrogenasa recombinante que codifica un alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH. Esto es una mejora de los métodos anteriores de uso de organismos tales como algas para construir almacenes de productos químicos, que se utilizan posteriormente para hacer productos de fermentación durante la noche o el uso de excedentes extraños de organismos separados. En efecto, los productos de fermentación se forman a mayores eficiencias directamente a la luz durante la fotosíntesis. Además, la producción obligatoria de macromoléculas en una concentración elevada se alivia durante el día, mediante la producción de dichos productos directamente durante el día.

20 Las enzimas dependientes de NADPH que producen productos normalmente fermentados son raros en la naturaleza. De acuerdo con lo anterior, en ciertos aspectos de la invención, el etanol se produce en los organismos que se expresan o modifican para expresar *Moorella* sp. HUC22-1 o un homólogo del mismo que incluye al menos tres deshidrogenasas de alcohol tales como AdhA (Registro de NCBI YP_430754). Se ha demostrado previamente que esta enzima utiliza preferentemente NADP como un cofactor en oposición a NAD y produce etanol a altas tasas a partir de acetaldehído ["Characterization of enzymes involved in the ethanol production of *Moorella* sp. HUC22-1 "]. Por coexpresión de este gen en organismos seleccionados, tales como cianobacterias, la NADPH₂ formado durante la fotosíntesis se puede utilizar directamente para formar el etanol en estos organismos. Alternativamente, las enzimas que naturalmente utilizan NADH pueden ser diseñadas genéticamente utilizando técnicas establecidas de ingeniería de proteínas para requerir NADPH₂ en lugar de NADH.

30 En ciertas realizaciones, *adhA* dependiente de NADPH a partir de *Moorella* es coexpresada con la piruvato descarboxilasa a partir de *Zymomonas mobilis* en las cianobacterias con el fin de obtener un proceso eficiente para la producción de etanol dependiente de NADPH como un cofactor en lugar de la tradicional NADH. Tales organismos transgénicos son capaces de producir etanol utilizando procesos dependientes de NADPH.

Polinucleótidos aislados

35 Las moléculas de ácido nucleico aisladas para el gen *adhA* y variantes de los mismos se describen en este documento. 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. SEQ ID NO: 1 representa la secuencia de codificación del codón y expresión optimizada para el gen *adhA* de *Moorella* sp. HUC22-1.

40 La célula de la presente invención puede comprender una molécula de ácido nucleico que comprende o que consiste en una secuencia que es un codón y la versión optimizada de la expresión del gen *adhA* de tipo salvaje. En una realización adicional, la célula de la presente invención puede comprender una molécula de ácido nucleico y homólogos, variantes y derivados de SEQ ID NO: 1 que comprende o consiste en una secuencia que es una variante del gen *adhA* tiene una identidad de al menos 77,1% a SEQ ID NO: 1. La secuencia de ácido nucleico puede tener preferiblemente 78%, 79%, 80%, 81%, 85%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99%, 99.9% o incluso más identidad con la SEQ ID NO: 1.

45 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 SEQ ID NO: 2.

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

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

Los fragmentos de la secuencia de ácido nucleico de más utilidad de pantalla en una variedad de sistemas y métodos. Por ejemplo, los fragmentos se pueden usar como sondas en diversas técnicas de hibridación. Dependiendo del método, las secuencias de ácidos nucleicos diana pueden ser ADN o ARN. Las secuencias de ácidos nucleicos diana

se pueden fraccionar (por ejemplo, mediante electroforesis en gel) antes de la hibridación, o la hibridación se puede realizar en muestras in situ. Un experto en el arte apreciará que las sondas de ácido nucleico de secuencia conocida encuentran utilidad en la determinación de la estructura cromosómica (por ejemplo, mediante transferencia Southern) y en la medición de la expresión génica (por ejemplo, mediante transferencia de Northern). En tales experimentos, los fragmentos de secuencia preferiblemente se marcan de forma detectable, de modo que su hibridación específica a secuencias diana se pueden detectar y opcionalmente cuantificar. Un experto en el arte apreciará que los fragmentos de ácido nucleico se pueden usar en una amplia variedad de técnicas de transferencia no descritas específicamente en este documento.

También se debe apreciar que los fragmentos de secuencias de ácido nucleico revelados en este documento también encuentran utilidad como sondas cuando se inmovilizan sobre micromatrices. Los métodos para la creación de micromatrices por la deposición y fijación de los ácidos nucleicos sobre sustratos de soporte son bien conocidos en el arte. Revisado en *Chip de Micromatrices de ADN: A Practical Approach* (Practical Approach Series), Schena (ed.), Oxford University Press (1999) (ISBN: 0199637768); *Nature Genet.* 21(1) (suppl):1-60 (1999); *Microarray Biochip: Tools and Technology*, Schena (ed.), Eaton Publishing Company/BioTechniques Books Division (2000) (ISBN: 1881299376). Análisis de, por ejemplo, la expresión génica utilizando micromatrices que comprenden fragmentos de secuencia de ácido nucleico, tales como los fragmentos de secuencias de ácido nucleico revelados en este documento, es una utilidad bien establecida para fragmentos de secuencia en el campo de la biología celular y molecular. Otros usos de fragmentos de secuencias inmovilizadas sobre micromatrices se describen en Gerhold et al., *Trends Biochem. Sci.* 24:168-173 (1999) and Zweiger, *Trends Biotechnol.* 17:429-436 (1999); *ADN Microarrays: A Practical Approach* (Practical Approach Series), Schena (ed.), Oxford University Press (1999) (ISBN: 0199637768); *Nature Genet.* 21(1)(suppl):1-60 (1999); *Microarray Biochip: Tools and Technology*, Schena (ed.), Eaton Publishing Company/BioTechniques Books Division (2000) (ISBN: 1881299376).

Se revelan las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican el polipéptido AdhA dependiente de NADPH que comprende la actividad de alcohol deshidrogenasa. Como es bien conocido en la técnica, las actividades enzimáticas se pueden medir de varias maneras. Por ejemplo, la pirofosforólisis de OMP se puede seguir espectroscópicamente. Grubmeyer et al., *J. Biol. Chem.* 268: 20299 a 20304 (1993). Alternativamente, la actividad de la enzima se puede seguir utilizando técnicas cromatográficas, tales como por cromatografía líquida de alto rendimiento. Chung and Sloan, *J. Chromatogr.* 371:71-81 (1986). Como otra alternativa la actividad se puede medir indirectamente mediante la determinación de los niveles de producto hecho de la actividad enzimática. Estos niveles se pueden medir con técnicas que incluyen extracción con cloroformo/metanol acuoso como es conocido y se describe en la técnica (cf. M. Kates (1986) *Techniques of Lipidology; Isolation, analysis and identification of Lipids*. Elsevier Science Publishers, New York (ISBN: 0444807322)). Técnicas más modernas incluyen el uso de la cromatografía de gases unida a espectrometría de masas (Niessen, W. M. A. (2001). *La práctica actual de la cromatografía de gases - espectrometría de masas* New York, N.Y: Marcel Dekker. (ISBN: 0824704738)) de Nueva York, Nueva York:... Marcel Dekker (ISBN: 0824704738)). Técnicas modernas adicionales para la identificación de actividad de la proteína recombinante y productos incluyendo 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 (NMR), espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR), viscosimetría (Knothe, G., R.O. Dunn, and M.O. Bagby. 1997. *Biodiesel: The use of vegetable oils and their derivatives as alternative diesel fuels*. Am. Chem. Soc. Symp. Series 666: 172-208), titulación para la determinación de ácidos grasos libres (Komers, K., F. Skopal, and R. Stloukal. 1997. *Determination of the neutralization number for biodiesel fuel production*. *Fett/Lipid* 99(2): 52-54), métodos enzimáticos (Bailer, J., and K. de Hueber. 1991. *Determination of saponifiable glycerol in "bio-diesel"*. *Fresenius J. Anal. Chem.* 340(3): 186), métodos basados en las propiedades físicas, métodos químicos húmedos, etc., pueden ser utilizados para analizar los niveles y la identidad del producto producido por los microorganismos de la presente invención. Otros métodos y técnicas también pueden ser apropiados para la medición de la actividad enzimática, como será conocido por un experto en el arte.

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

Polipéptidos aislados

Los polipéptidos aislados (incluyendo muteínas, variantes alélicas, fragmentos, derivados, y análogos) codificados por las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente también se describen. El polipéptido aislado puede comprender la secuencia de polipéptido que corresponde a SEQ ID NO: 2. El polipéptido aislado puede comprender una secuencia de polipéptido al menos 71,1% idéntica a SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, 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 incluso más de identidad con la SEQ ID NO: 2.

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

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

Resultados de enzimas óptimas

El aumento del nivel de etanol es observado por las células huésped diseñadas genéticamente para tener actividad de alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH. Los métodos para producir mayor nivel de etanol comprenden la expresión de dichos genes *adhA* dependientes de NADPH como se describe en este documento.

En ciertos aspectos de la invención, se produce el aumento de los niveles de etanol de al menos aproximadamente 249 mg/L de etanol sobre las 72 horas. Más preferiblemente, al menos aproximadamente 297 mg/L de etanol se producen sobre las 72 horas (Figura 6).

En otros aspectos de la invención, se produce la disminución de los niveles de acetaldehído. En realizaciones preferidas, se produce menos de aproximadamente 14 mg/L de acetaldehído (Figura 7).

Sin embargo, en otros aspectos de la invención, se producen los métodos para producir una mayor cantidad de etanol en relación con el aumento de DO. En realizaciones preferidas, se producen al menos aproximadamente 36 mg/L de etanol por DO. Más preferiblemente, se producen al menos aproximadamente 47 mg/L de etanol por DO (Figura 8).

De acuerdo con lo anterior, en este documento se muestra que la expresión de tales enzimas dependientes de NADPH para la generación de productos de fermentación tales como el etanol, aumenta los niveles de etanol, disminuye los niveles de acetaldehído y, en efecto, permite una mayor producción de etanol como una función de DO.

Independencia de nutrientes

En otro aspecto, además de CO₂ y la luz, los organismos fotoautotróficos normalmente requieren fuentes de nutrientes inorgánicos y vitaminas. Los nutrientes necesarios generalmente están suplementados al medio de cultivo, durante la propagación a escala experimental de tales organismos. Sin embargo, tales 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 el crecimiento, que es prohibitivamente cara en el bioprocesamiento industrial a gran escala. En una realización, la necesidad de vitamina B12 se evita mediante el diseño de células fotoautotróficas para expresar la ruta biosintética de la vitamina B12 como se describe en PCT/US2008/083056, presentada el 10 de noviembre de 2008. Una ruta biosintética de ejemplo, encontrada en *Salmonella typhimurium* se sobreexpresa, incluyendo pero no limitado a, los siguientes genes que codifican las secuencias de aminoácidos, se expone 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 la síntesis de cobalamina (CbiD), locus NP_460977), (precorrin-6A reductasa dependiente de NADPH (CbiJ) (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-nucleotido dimetilbencimidazol-P fosforribosil transferasa (CobT), EC 2.4.2.21, locus NP_460961)].

Además, para permitir la captación de cobalto y la incorporación en la vitamina B12, los genes que codifican el transportador de cobalto se sobreexpresan. La proteína transportadora de cobalto de ejemplo encontrado en *Salmonella typhimurium* se sobreexpresa y está codificada por secuencias de aminoácidos expuestas en (sistema de transporte Co₂⁺ de tipo ABC, el componente 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, los organismos fotoautotróficos se diseñan genéticamente para sobreexpresar enzimas independientes de la vitamina B12 para evitar la necesidad de este cofactor completamente. En la mayoría de los organismos fotoautotróficos, solo la metionina sintasa (EC 2.1.1.13) y las ribonucleótido reductasas clase II requieren vitamina B12. Por lo tanto, se sobreexpresa una metionina sintasa independiente de la vitamina B12 de ejemplo (EC

2.1.1.14) a partir de *Thermotoga maritime*, como se expone en PCT/US2008/083,506 (5-metiltetrahidropterilglutamato-homocisteína metiltransferasa (MetE), locus NP_229090). Además, se sobreexpresa una ribonucleótido reductasa clase I de ejemplo (nrdAB) a partir 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).

Mediante ingeniería genética un organismo con las enzimas mencionadas anteriormente y en la figura 1, se produce un fotoetanolgeno como se describe más específicamente en el Ejemplo 3. De acuerdo con lo anterior, la presente invención provee una célula huésped capaz de fijar el CO₂ tal como una cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7002 que está diseñada para expresar *pdc* y *adh* para producir etanol, y está diseñada para ser independiente de los nutrientes.

Producción de etanol bajo iluminación continua

Normalmente, se forma el glucógeno en los microorganismos en la luz, para ser consumidos por la energía de reducción en la oscuridad. Con iluminación continua, sin embargo, puede ser desventajoso acumular cantidades significativas de glucógeno, que alejarían el carbono de la(s) ruta(s) deseada(s), especialmente debido a que no podía haber un 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 por completo, en la medida en que el organismo sigue siendo fácil de mantener en un estado viable y siendo robusto en condiciones de fermentación. De acuerdo con lo anterior, la célula de la presente invención puede ser al menos atenuada en las actividades enzimáticas que incluyen, 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 1,4-alfa-glucano (EC 2.4.1.18).

En ciertos aspectos para la producción de etanol, el carbono que está disponible a partir 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, utilizando gliceraldehído-3-fosfato derivado del ciclo de Calvin, debido a que aún deben realizar precursores de biosíntesis a partir de estas. Sin embargo, lo hacen sólo en la medida en que lo requieran para el crecimiento. Para aumentar el flujo un piruvato a partir de intermediarios del ciclo de Calvin, es deseable expresar de forma constitutiva los genes que codifican las enzimas glucolíticas, a partir de un huésped nativo o un huésped no nativo. La elección de genes se realiza basándose en si se proyectan efectos reguladores alostéricos eviten que ejerciten sus actividades completas en el contexto metabólico esperado del huésped. La capacidad constitutiva podría lograrse mediante la eliminación de la regulación transcripcional donde exista, o mediante la expresión de las enzimas a partir de promotores constitutivos con los que no están asociados normalmente. De acuerdo con lo anterior, la célula de la presente invención puede comprender además las actividades enzimáticas 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 comprende las 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 piruvato-formiato liasa. Las actividades enzimáticas requeridas para la ruta de la piruvato descarboxilasa son: la 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 piruvato-formiato liasa son: piruvato formiato-liasa (EC 2.3.1.54), formiato 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). Preferiblemente, una o más de estas rutas se expresa de forma constitutiva o bajo alguna otra regulación controlada.

Además de proporcionar genes exógenos o genes endógenos con nueva regulación, la optimización de la producción de etanol en microorganismos preferiblemente requiere la eliminación o atenuación de ciertas actividades enzimáticas huésped. Estas incluyen, pero no se limitan a, 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 estas manipulaciones sean necesarias viene determinado por los productos secundarios observados se encuentran en el biorreactor o matraz de agitación. Por ejemplo, la observación de acetato sugeriría la supresión de actividades enzimáticas de piruvato oxidasa, acetato quinasa, y/o fosfotransacetilasa. En otro ejemplo, la observación de D-lactato sugeriría la supresión de actividades enzimáticas de D-lactato deshidrogenasa, mientras que la observación de succinato, malato, fumarato, oxalacetato, o citrato sugeriría la supresión de las actividades enzimáticas de citrato sintasa y/o PEP carboxilasa.

Producción de etanol en ciclo de luz-oscuridad

En realizaciones alternativas, la presente invención está adaptada de modo que los microorganismos se utilizan en sistemas que son apropiados para funcionar con un ciclo de luz-oscuridad, en donde varias horas de iluminación constante se siguen de varias horas de oscuridad relativa. Utilizando 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 la luz; o 2) maximización de la producción de glucógeno durante la fase de luz.

5 En una realización, los microorganismos se atenúan, pero no se eliminan en las actividades enzimáticas de síntesis de glucógeno. Tales métodos se implementan suprimiendo las actividades del gen(s) de síntesis del glucógeno nativo(s) y su sustitución por análogos que tienen regulación y expresión no nativa en un nivel más bajo que en el huésped nativo.

10 En otra realización, los microorganismos maximizan la producción de glucógeno durante la fase de luz. Tales métodos se implementan por la detección de cepas con el contenido más alto de glucógeno entre una colección de cepas de tipo salvaje o una biblioteca de mutantes de una cepa particular, después de que tales cepas se han cultivado a una concentración celular apropiada y se han sometido posteriormente a la limitación de un nutriente clave tal como nitrógeno, fósforo, o potasio. Sería muy ventajoso utilizar un ciclo de luz-oscuridad de tal manera que el glucógeno se sintetiza a la máxima cantidad posible en términos de peso celular seco durante el ciclo de luz, entonces metabolizado a etanol a punto de terminar como sea posible durante el ciclo de oscuridad.

15 Durante el ciclo de oscuridad, el glucógeno se convierte en piruvato por enzimas endógenas, pero, como en el caso de iluminación continua, estas enzimas pueden ser reguladas en el huésped de tal manera que la conversión global suceda a una tasa subóptima. Para aumentar la tasa de esta conversión, tal regulación se contrarresta, ya sea por mutagénesis o cribado de cepas con respecto a rápida utilización de glucógeno en oscuridad o proporcionando al huésped las enzimas necesarias a mayores niveles de expresión y/o proporcionando genes exógenos que codifican enzimas que son menos sometidas a la regulación alostérica que las del huésped. De acuerdo con lo anterior, las actividades enzimáticas preferidas para conseguir este efecto incluyen los enumerados anteriormente para la conversión de gliceraldehído-3-fosfato en etanol, además de actividades enzimáticas que convierten el 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).

20 En aún otra realización, al menos una actividad citocromo oxidasa está atenuada o funcionalmente suprimida. Las citocromo oxidasas funcionan para transferir electrones al oxígeno en la oscuridad. Howitt et al., realizaron supresiones de citocromo oxidasas (CtaI, CtaII y Cyd) y fueron capaces de obtener cepas que no respiran en la 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 salvaje, mientras que las que carecían tanto de CtaI como de Cyd no respiraban. La incapacidad para respirar en la oscuridad significa más productos de fermentación, incluyendo etanol y quizás también succinato, así como 1,4-butanodiol. De acuerdo con lo anterior, la presente invención provee un organismo fijador de carbono, por ejemplo, una cianobacteria diseñada genéticamente en donde al menos una actividad oxidasa del citocromo es atenuada, lo que aumenta la producción de etanol, succinato y/o 1,4-butanodiol.

35 La introducción de secuencias de ácidos nucleicos heterólogas implicadas en una ruta biosintética para la producción de hidrocarburos se puede realizar de forma estable o transitoria en diversas células huésped utilizando técnicas bien conocidas en el arte, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, 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 los antibióticos, por ejemplo, resistencia a neomicina, tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina y genes que complementan las deficiencias auxotróficas.

40 Las secuencias de control de expresión apropiadas para uso en células huésped procariotas incluyen, pero no se limitan a, promotores capaces de reconocer las polimerasas T4, T3, Sp6 y T7, los promotores PR y PL 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*, los promotores de *Streptomyces*, el promotor int del bacteriófago lambda, el promotor bla del gen de beta-lactamasa de pBR322, y el promotor CAT del gen cloranfenicol acetil transferasa. Los promotores procariotas son revisados 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.

45 Ejemplos no limitantes de promotores eucariotas apropiados para su uso dentro de un huésped eucariota son de origen viral e incluyen el promotor del gen de la metalotioneína I de ratón (Hamer et al., *J. Mol. Appl. Gen.* 1:273, 1982); el promotor TK de virus del Herpes (McKnight, *Cell* 31:355, 1982); el promotor temprano de SV40 (Benoist et al, *Nature* (London) 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: 6 971, 1982; Silver, et al., *PNAS* (USA) 81:5951, 1984); y el promotor de IgG (Orlandi et al, *PNAS* (USA) 86:3833, 1989).

50 En algunos ejemplos una célula huésped modificada genéticamente se modifica genéticamente con una secuencia de ADN heteróloga que codifica un producto génico de la ruta biosintética que está unido operativamente a un promotor constitutivo. Promotores constitutivos apropiados son conocidos en el arte e incluyen, promotor tardío constitutivo principal de adenovirus, un promotor de MPSV constitutivo, y un promotor de CMV constitutivo. Promotores constitutivos apropiados aplicables para *Synechococcus* sp. PCC 7002 incluyen, por ejemplo, Ptacl, P-EM7, Paph2 y PaadA

La célula huésped microbiana se puede modificar genéticamente con una secuencia del ácido nucleico heteróloga que codifica un producto génico de ruta biosintética que está unido operativamente a un promotor inducible. Los promotores inducibles son bien conocidos en el arte. Los promotores inducibles apropiados incluyen, pero no se limitan a los promotores que se ven afectados por proteínas, metabolitos, o productos químicos. Estos incluyen: un promotor del virus de la leucemia bovina, un promotor de metalotioneína, un promotor de MMTV inducible por dexametasona, un promotor de SV40, un promotor de MRP polIII, un promotor de CMV inducible por tetraciclina (tal como el promotor de CMV temprano inmediato humano) así como los de los operones trp y lac.

Cuando una célula huésped se modifica genéticamente con secuencias de ácido nucleico heterólogos que codifican dos o más proteínas implicadas en una ruta biosintética para producir productos a base de carbono de interés, las secuencias de ácidos nucleicos pueden ser impulsadas 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 huésped modificada genéticamente) del intermedio de la ruta biosintética se puede aumentar para potenciar aún más el rendimiento del producto final. Por ejemplo, aumentando la cantidad intracelular de un sustrato (por ejemplo, un sustrato primario) para una enzima que es activa en la ruta biosintética, y similares.

Modificaciones de cadenas de carbono

La figura 1 provee una descripción de los diversos genes que pueden ser modulados para alterar la estructura del producto derivado de ácidos grasos y las enzimas codificadas que pueden ser utilizados solos o en combinación para hacer diversos ácidos grasos e hidrocarburos. Los productos se pueden producir de tal manera que contengan puntos de ramificación, los 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 a base de carbono de interés producidos por los microorganismos.

La figura 1 también enumera las enzimas que están implicadas directamente en la síntesis de productos a base de carbono, incluidas las ceras, ésteres de ácidos grasos y/o alcoholes grasos. Para aumentar la producción de ceras/ésteres de ácidos grasos y alcoholes grasos, una o más de las enzimas se puede sobreexpresar o mutar para reducir la inhibición por retroalimentación. Adicionalmente, las enzimas que metabolizan los intermedios para hacer productos basados en ácidos no grasos (reacciones secundarias) pueden ser eliminadas o atenuadas funcionalmente para aumentar el flujo de carbono a través de la ruta biosintética de ácidos grasos. Los ejemplos proporcionados en este documento describen cómo realizar enzimas diseñadas genéticamente en las respectivas rutas de organismos huésped para producir organismos diseñados genéticamente que producen etanol.

Foto-Fermentación consolidada

En un enfoque alternativo para producir directamente producto a base de carbono de interés final como resultado de la fotosíntesis, los productos a base de carbono de interés pueden ser producidos impulsando otros organismos que son más susceptibles de hacer cualquier producto particular, mientras se cultiva el organismo fotosintético por su fuente de carbono. En consecuencia, la fermentación y producción de productos a base de carbono de interés se pueden producir por separado de la producción de fuente de carbono en un fotobiorreactor.

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

Las dos etapas se pueden combinar en un proceso de una única etapa mediante el cual los organismos fotosintéticos diseñados genéticamente convierten luz y CO₂ directamente en glucosa y tales organismos son capaces de producir una variedad de productos a base de carbono de interés.

Ciertos cambios en las condiciones de cultivo de células huésped fotosintéticas, por ejemplo, cianobacterias para la producción de azúcares se pueden optimizar para el crecimiento. Por ejemplo, las condiciones se han optimizado para la intensidad de luz, exposición a la luz, tiempo de exposición, ciclo diurno, adición de suplementos, nutrientes, la velocidad de recirculación y la velocidad de flujo que mantienen una relación de luz y oscuridad. Como será evidente para los expertos en el arte, las condiciones suficientes para lograr un crecimiento óptimo variarán dependiendo de la ubicación, el clima y otros factores ambientales, tales como el ciclo diurno, intensidad de luz y tiempo de exposición a la luz. Pueden ser necesarios otros ajustes, por ejemplo, la capacidad de un organismo para la captación de carbono. Se puede introducir un aumento de carbono en forma de CO₂ en un biorreactor por rociadores de gas o dispositivos de aireación

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

5 El proceso de foto-fermentación consolidada produce productos continuos. El proceso puede implicar la captura directa de luz para el producto a partir de organismos iniciales diseñados genéticamente para producir diversos productos sin la necesidad de lisar los organismos. Por ejemplo, los organismos pueden utilizar 3PGAL a la luz para hacer un producto de fermentación deseado, por ejemplo, etanol. Como alternativa, los organismos pueden acumular glucógeno a la luz y metabolizar etanol en la oscuridad para hacer más productos de fermentación. Tales productos finales se pueden secretar fácilmente en contraposición a los productos intracelulares tales como el aceite y celulosa. Los organismos pueden producir azúcares a la luz, que se secretan en el medio y dichos azúcares se utilizan en oscuridad durante la fermentación con los mismos o diferentes organismos o una combinación de ambos.

Condiciones de fermentación

15 La producción y aislamiento de productos a base de carbono de interés se puede potenciar empleando técnicas de fermentación específicos. Un método para maximizar la producción y reducir los costos está aumentando el porcentaje de carbono que se convierte en productos de hidrocarburo. Durante los ciclos de vida celulares normales se utiliza carbono en las funciones celulares, incluyendo producción de lípidos, sacáridos, proteínas, ácidos orgánicos, y ácidos nucleicos. La reducción de la cantidad de carbono necesaria para las actividades relacionadas con el crecimiento puede aumentar la eficiencia de la conversión de fuente de carbono para la producción. Esto se puede lograr cultivando en primer lugar microorganismos hasta una densidad deseada, tal como una densidad alcanzada en el pico de la fase logarítmica de crecimiento. A tal punto, se pueden aprovechar los genes de punto de control de replicación para detener el crecimiento de las células. En concreto, se pueden utilizar los mecanismos de detección de quórum [revisado en Camilli and Bassler, Science 311:1113, (2006); Venturi FEMS Microbio Rev 30:274-291 (2006); y Reading and Sperandio, FEMS Microbiol Lett, 254:1-11, (2006)] para activar genes, tales como p53, p21, u otros genes de punto de control. Los genes que se pueden activar para detener la replicación y el crecimiento celular en *E. coli* incluyen los genes *umuDC*, cuya sobreexpresión detiene la progresión de la fase estacionaria a crecimiento exponencial [Murli et al, J. of Bact., 182:1127, (2000)]. *UmuC* es un ADN polimerasa que puede llevar a cabo la síntesis de translesión sobre lesiones no codificantes, la base mecánica de la mayoría UV y de las mutagénesis química. Los productos génicos de *umuDC* se utilizan para el proceso de síntesis de translesión y también sirven como un punto de control del daño del ADN. Los productos génicos de *UmuDC* incluyen *UmuC*, *UmuD*, *UmuD'*, *UmuD'₂C*, *UmuD'₂* y *UmUD₂*. Simultáneamente, los genes productores de producto se activan, minimizando así la necesidad de rutas de mantenimiento y replicación para utilizar mientras se está realizando el derivado de ácido graso.

35 En un aspecto, el porcentaje de carbonos de entrada convertido en productos de hidrocarburos es un proceso eficiente y de bajo costo. Usando dióxido de carbono como fuente de carbono, el oxígeno se libera en forma de O₂, lo que conduce a una eficacia metabólica teórica máxima de ~ 34% (peso/peso) (para productos derivados de ácidos grasos).

40 Esta cifra, sin embargo, cambia para otros productos de hidrocarburo y fuentes de carbono. Las eficacias típicas en la bibliografía son ~ < 5 %. Los microorganismos diseñados genéticamente 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.

45 En algunos ejemplos, cuando el producto final se libera de la célula, se puede emplear un proceso continuo. En este enfoque, un reactor con organismos productores de derivados de ácidos grasos se puede ensamblar de varias 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.

En otro ejemplo, la cámara de fermentación incluirá una fermentación que se somete a una reducción continua. En este caso, se crearía 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.

50 La disponibilidad de NADPH intracelular también se puede potenciar diseñando genéticamente el huésped 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 energía la producción de derivados de ácidos grasos.

55 Para la producción de producto a gran escala, los microorganismos diseñados genéticamente 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 diseñados genéticamente 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 (por lo general 16 horas) incubados con kanamicina, ampicilina o similares.

El medio se trata con complemento continuamente para mantener un propionato de sodio 25 mM a un pH apropiado 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.

Procesamiento y separación

Los productos a base de carbono producidas por los organismos fijadores de dióxido de carbono durante la fermentación pueden ser separados del medio de fermentación. Se pueden emplear técnicas conocidas para separar los derivados de ácido grasos a partir de medios acuosos. Un proceso de separación a modo de ejemplo proporcionado en este documento es un proceso de separación de dos fases (bifásica). Este proceso implica la fermentación de los huéspedes de producción diseñados genéticamente 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 acuosa. Este método puede ser practicado tanto en una configuración de fermentación tanto discontinua como continua.

La separación bifásica utiliza la relativa inmiscibilidad del ácido graso para facilitar la separación. Un experto en el arte 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 recipiente de fermentación.

Cuando se produzcan los ácidos grasos mediante los métodos descritos en este documento, estos productos serán relativamente inmiscible en el medio de fermentación, así como en el citoplasma. Por lo tanto, el ácido graso se acumula en una fase orgánica, ya sea intracelular o extracelularmente. La recolección de los productos en una fase orgánica disminuirá el impacto del derivado de ácido graso sobre la función celular y permite que el huésped de producción produzca más producto.

Los alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, ceras e hidrocarburos producidos como se describe en este documento permiten la producción de compuestos homogéneos con respecto a otros compuestos en donde al menos 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 ser producidos de manera que tengan un grado relativamente uniforme de saturación con respecto a otros compuestos, por ejemplo, al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95% de los alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, hidrocarburos y ceras son mono-, di-, tri- o insaturados.

Detección y análisis

En general, los productos de interés producidos a partir de las "biofábricas solares" descritas en este documento se pueden analizar por cualquiera de los métodos analíticos estándar, 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.

Obtención de la huella del Carbono

Los productos a base de carbono producidos biológicamente, por ejemplo, etanol, ácidos grasos, alcanos, isoprenoides, representan una nueva materia prima para los combustibles, tales como alcoholes, diesel y gasolina. Tales biocombustibles no han sido producidos a partir de biomasa, pero utilizan el CO₂ como fuente de carbono. Estos nuevos combustibles se pueden distinguir de combustibles derivados de carbono petroquímico sobre la base de la obtención de la huella isotópica de carbono doble. Tales productos, derivados y mezclas de los mismos se pueden distinguir completamente de sus homólogos derivados de productos petroquímicos sobre la base de 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 vida media de 5730 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 vida media 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 $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ varía ligeramente, pero de forma medible entre fuentes de carbono naturales. Generalmente estas diferencias se expresan como desviaciones de la relación de $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ en un material estándar. El estándar internacional para el carbono es el Pee Dee Belemnite, una forma de caliza hallada en Carolina del Sur, con una fracción de ^{13}C de 0.0112372. Para una fuente de carbono a , la desviación de la relación $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ de la del Pee Dee Belemnite se expresa como:

$\delta a = (R_a/R_s) - 1$, donde R_a = relación $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ en la fuente natural, y R_s = relación $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ en el estándar de Pee Dee Belemnite.

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 Pee Dee Belemnite. La Tabla 1 muestra δ_a y la fracción de ^{14}C para varias fuentes naturales de carbono.

Tabla 1:

Variaciones de $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ en las fuentes naturales de carbono

Fuente	$-\delta a$ (‰)	Referencias
Carbón subterráneo	32.5	Farquhar et al.
Combustible fósil	26	Farquhar et al.
DIC* Oceánico	0-1.5	Goericke et al., Ivlev
CO ₂ Atmosférico	6-8	Ivlev, Farquhar et al.
DIC* de Agua dulce	6-14	Dettman et al.
Pee Dee Belemnite	0	Ivlev

* DIC = carbono inorgánico disuelto

Los procesos biológicos a menudo discriminan entre los isótopos de carbono. La abundancia natural de ^{14}C es muy pequeña, y por lo tanto la discriminación a favor o en contra ^{14}C es difícil de medir. La discriminación 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:

$\delta_p = (R_p/R_s) - 1$, donde 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 estándar Pee Dee Belemnite, el estándar.

La Tabla 2 muestra las desviaciones medidas en la relación $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ 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 de cianobacterias de DIC marino	18-31	16.5-31	Goericke et al., Sakata et al.
Lípido de cianobacterias de DIC marino	39-40	37.5-40	Sakata et al.
Lípidos de algas de DIC marino	17-28	15.5-28	Goericke et al., Abelseon et al.
Biomasa de algas de DIC de agua dulce	17-36	3-30	Marty et al.
Lípido de <i>E. coli</i> a partir de azúcar vegetal	15-27	casi 0	Monson et al.
Lípidos de cianobacterias de carbono fósil	63.5-66	37.5-40	-
Biomasa de cianobacterias de carbono fósil	42.5-57	16.5-31	-

D = discriminación por un proceso biológico en su utilización de ^{12}C vs. ^{13}C (véase el texto)

La Tabla 2 presenta una nueva cantidad, D . Esta es la discriminación por un proceso biológico en su utilización de ^{12}C vs. ^{13}C . Se define D de la siguiente manera: $D = (R_p/R_a) - 1$.

5 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 estándar. 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 estándar. 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 tiene 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.

10 Esto se ha realizado en la Tabla 2 para los lípidos de cianobacterias y la biomasa producida a partir de carbono fósil. Como se muestra en las tablas anteriores, los productos de cianobacterias realizados de carbono fósil (en forma de, por ejemplo, gas de combustión u otras emisiones) tendrán un δ_p más alto que el de los productos biológicos comparables realizados de otras fuentes, distinguiéndolos sobre la base de la composición de la materia a partir de estos otros productos biológicos. Además, cualquier producto derivado exclusivamente de carbono fósil tendrá una fracción insignificante de ^{14}C , mientras que los productos elaborados a partir de carbono sobre el suelo tendrán una fracción ^{14}C de aproximadamente 10^{-12} .

De acuerdo con lo anterior, diversos productos a base de carbono de interés se pueden caracterizar como $-\delta_p$ (‰) de aproximadamente 63.5 a aproximadamente 66 y $-D$ (‰) de aproximadamente 37.5 a aproximadamente 40.

Referencias

- 20 1. Goericke, R., Montoya, J.P., and Fry, B. Physiology of isotopic fractionation in algae and cyanobacteria. Chapter 9 in "Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science", By K. Lajtha and R. H. Michener, Blackwell Publishing, 1994.
2. Monson, K.D. and 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).
- 25 3. Abelson, P.H. and 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., and 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).
- 30 6. Farquhar, G. D., Ehleringer, J. R., and Hubick, K. T. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:503-37 (1989).
7. Marty, J. and Planas, D. Comparison of methods to determine algal ^{13}C in freshwater. *Limnol. Oceanogr.: Methods* 6:51-63 (2008).
- 35 8. Dettman, D.L., Reische, A.K., and 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).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan en este documento con fines ilustrativos y no se pretende que sean restrictivos.

Ejemplo 1

40 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 en dirección 5' (UHR) y la región de homología en dirección 3' 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 estreptomycin y espectinomycin a la construcción integrada. Para la expresión, se diseñó pJB5 con el promotor del casete de resistencia a kanamicina *aph2* y el sitio de unión a ribosomas (RBS). En dirección 3' de este promotor y RBS, se diseñó e insertó 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 desde el gen del alcohol

deshidrogenasa de *Zymomonas mobilis* (*adhII*). Sitios de restricción de *xbaI* flanquean la UHR y la DHR permitiendo la escisión del ADN que se pretende usar para recombinación desde el resto del vector. Se construyó pJB5 por síntesis contractual de DNA2.0 (Menlo Park, CA).

5 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*, se 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, en dirección 3' 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).

15 pJB5-PdcAdhII (TS): Los genes de la piruvato descarboxilasa (*pdC*) desde *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 65 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 una brecha que incluye los sitios *XhoI* y *BamHI* para permitir insertar promotores posteriormente (longitud total de la brecha: 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 los sitios *SpeI* y *PacI* para clonación. 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 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).

25 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 utilizando el kit Quick Blunting (New England Biolabs, MA), y a continuación se ligaron utilizando el kit Quick Ligation (New England Biolabs; Ipswich, MA).

30 pJB5-AdhII: El gen del 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 utilizando el kit Quick Blunting (New England Biolabs, MA) y a continuación se ligaron utilizando el kit Quick Ligation (New England Biolabs; Ipswich, MA).

35 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* en el extremo del gen. Esta construcción 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).

40 pJB5-*metE* (*T. elongatus* BP-1): El gen de la metionina sintasa (*metE*) independiente de vitamina B12 de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (GenBank: NP_681881), se clonó en el plásmido pJB5 mediante el siguiente procedimiento. Una construcción se sintetizó 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* en el extremo del gen. Esta construcción se inserta por digestión de restricción con *NdeI* y *EcoRI* (New England Biolabs; Ipswich, MA) en tanto pJB5 como el inserto seguido por ligación con un kit Quick Ligation (New England Biolabs; Ipswich, MA). La construcción ligada se transformó en *E. coli* competente F'Iq NEB 5-alfa (alta eficacia) (New England Biolabs: Ipswich, MA).

Ejemplo 2

Construcción del plásmido para *Thermosynechococcus elongatus* BP-1

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

55 Se construyeron cuatro plásmidos (pJB518, pJB59, pJB20 y pJB21), todos derivados de pJB5, para permitir la recombinación homóloga en cuatro loci diferentes en el genoma de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. Específicamente, las regiones de 0.5 kb de homología en dirección 5' (UH) y homología en dirección 3' (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, 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 el marco de lectura abierto de *glgA*, que codifica glucógeno sintasa: El fin de esta delección es 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 utilizando ADN polimerasa Phusion™ Hot Start High-Fidelity (desarrollada y fabricada por Finnzymes Oy. Distribuida por New England Biolabs, Ipswitch, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cebador de PCR hacia UH tiene un sitio de restricción *SbfI* 5'-terminal, el cebador de PCR inverso de UH, un sitio de restricción *NotI* 5' terminal, el cebador de PCR hacia 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, Ipswitch, MA) de tanto el vector como el inserto generado por PCR, seguido de un kit Quick Ligation (New England Biolabs; Ipswitch, MA). La construcción ligada se transforma en la *E. coli* competente NEB 5-alfa (alta eficacia) (New England Biolabs; Ipswitch, 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 realizado para la región UH, excepto que se usan las enzimas de restricción *AscI* y *FseI* (New England Biolabs, Ipswitch, 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 (*pdC*) /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 estreptomina. La primera versión del operón comprende los genes *pdC* y *adhII* desde *Zymomonas mobilis* (GenBank: DD161475, M15394) y se diseña con un sitio *NdeI* que abarca el codón de partida de la secuencia codificante *pdC*. Después del gen *pdC* 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, diseñada para codificar versiones relativamente más termoestables de piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa, comprendía el gen *pdC* desde *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 todas las otras formas. 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; Ipswitch, MA) en pJB18, pJB59, pJB20, y pJB21, seguido de ligación con un kit Quick Ligation (New England Biolabs; Ipswitch, MA). De esta manera se construyen ocho plásmidos de operones *pdC-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 *pdC-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 en dirección 5' de los siguientes genes: *cpcC*, *apcA*, *tsr2142*, *psaA*, *rbcL*, *hsp33*, y *trnE_UUC* y dos son promotores: *E. coli*-type *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 diseñados genéticamente que producen etanol

Synechococcus sp. PCC 7002 modificado genéticamente: Cada una de las construcciones como se describe en el ejemplo 1 se integró en el genoma de *Synechococcus* sp. PCC 7002 utilizando el siguiente protocolo. Se cultivó *Synechococcus* 7002 durante 48 horas a partir de colonias en un matraz de agitación incubado a 30 °C al 1% de CO₂ hasta un OD₇₃₀ 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 adicionaron 500 µL de cultivo a un tubo de ensayo con 30 µL de 1-5 µg de ADN preparado a partir de un kit Qiagen Qiaprep Spin Miniprep (Valencia, CA) para cada construcción. Las células se incubaron burbujeando 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 al 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 fueron 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 preferencial 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 a partir de *Moorella thermoacetica* (Número de referencia: CP000232) tuvo codones optimizados para la expresión y se construyó por DNA2.0 y se designó SEQ ID NO: 1 (el aminoácido codificado es SEQ ID NO: 2). La secuencia está flanqueada con CTCGAGTTGGATCC en el extremo 5', que codifica los sitios de restricción *Xho* y *BamHI*, y en el extremo 3' con TTCAAACAGGAATTC en el extremo 3' (similar a pJB5-3) que contiene un sitio *EcoRI* para los fines de clonar en vectores de expresión.

A continuación, se clonó *adhA* de *Moorella* en dirección 3' de dos genes de piruvato descarboxilasa, uno desde *Zymomonas mobilis* (número de referencia: AAV89984) y uno desde *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.

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

Tabla 3

Huésped	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>Moorella adhA</i>
JCC446	pJB136	<i>Z. mobilis pdc</i>	<i>Moorella adhA</i>

JCC1, JCC136, JCC137, JCC445, JCC446 se cultivaron en placas con medio A+ (agar al 1.5 %) con espectinomycinina 100 µg/mL para cepas transgénicas. Se cultivó una única colonia en 10 mL de A+ con espectinomycinina 100 µg/mL en un tubo de ensayo sumergido en un baño a 37 °C con CO₂ al 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 un DO_{730 nm} de 1 es igual a ~0.3 g de CDW), y después se sedimentó por centrifugación (21,000 RCF, 20 °C, 5 minutos), se vuelve a suspender en medio A+ nuevo hasta la concentración original, y después se vuelve a diluir 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 el DO_{730 nm} (diluido 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 las muestras se sedimentaron por centrifugación a 4 °C durante 10 minutos a 21,000 RCF. El sobrenadante se colocó en un nuevo tubo, y se congeló a -80 °C hasta que estuvo listo para su análisis.

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) utilizando un J & W Scientific DB-ALC1 (número de catálogo: 123-9134; longitud: 30 m, diámetro interno, 0.320 mm, espesor de la película: 1.80 µm). Se sometieron 100 µL de cada muestra se sometió a análisis de espacio de cabeza. Se midieron los controles con A+ solo, así como la dilución en serie de estándares 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 diluyeron otra vez desde una DO_{730nm} 5 o mayor a una DO_{730nm} de partida y los puntos temporales se tomaron a las 0, 24, 48, y 72 horas después de la dilución.

Se muestran las densidades ópticas de cultivos de *Synechococcus* sp. de tipo salvaje 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

5 Las concentraciones de etanol de cultivos en el sobrenadante se representan mostrando el aumento de las concentraciones de etanol 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 *Moorella* a las 72 horas (Tabla 5).

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).

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

10 En los 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).

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* (JCC136 y JCC137) 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).

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: A partir 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 utilizando 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 utilizados son espectinomycin más estreptomycin.

Ejemplo 4

Producción de etanol mejorada

Este ejemplo provee una ilustración de cómo la producción de etanol en un organismo diseñado genéticamente se puede mejorar y hacer más eficiente modificando los niveles de expresión y/o identidad de las enzimas implicadas en la producción de etanol. Específicamente, se construyó una serie de plásmidos dirigidos pAQ7 Δ ldh que contienen genes de alcohol deshidrogenasa (*adh*) de *Moorella* bajo el control de diferentes promotores de fuerza. Estos plásmidos se transformaron en JCC445 (véase Tabla 5) y las cepas resultantes se examinaron para la producción de etanol. La transformación de JCC445 por varios plásmidos diferentes se muestra para mejorar la producción de etanol, pero sólo un modelo, Pcl_ *adhAM*, resultó en el aumento de los niveles de etanol, acompañado por una disminución concomitante en los niveles de acetaldehído.

Construcción de la cepa:

Tabla 27

Cepa	huésped +	plásmido (pAQ7-derivado)
JCC445 + 773	JCC445 + 773	Δ ldh_ kan_ PaphII_ <i>adhAM</i>
JCC445 + 782	JCC445 + 782	Δ ldh_ kan_ Pcl_ <i>adhAM</i>

(aka JCC1005)	(SEQ ID NO: 27)

5 Cuatro μg de ADN del plásmido se digirió con *Xma*I y se utilizó para transformar 400 μL de JCC445 ($\text{OD}_{730} = 1.15$) utilizando el protocolo de transformación descrito en este documento. La mezcla de transformación total se extendió sobre placas de A + agar y se incubó a 37 °C (~ 50 μE) en el aire. Después de 24 horas, las placas se subplantaron con
10 crecimiento base se disminuyó y comenzaron a ser visibles las colonias de Km^{R} , momento en el cual las placas se transfirieron a 37 °C (~ 50 μE) + 1% de CO_2 . Después de 3 días, dos colonias de Km^{R} de cada transformación se sembraron en placas de $\text{A}^{+\text{Km}50\text{Sp}100}$ agar para aislamiento de colonias individuales. Las placas sembradas por estrías se incubaron durante 4 días a 37°C (~ 50 μE) en el aire y luego fueron transferidas a 37C (~ 50 μE) + CO_2 al 1% durante 3 días más.

15 Etanol por lotes en matraces: Una sola colonia de un clon desde la placa sembrada por estrías original a partir de cada transformación se inoculó en 5 mL de $\text{A}^{+\text{Km}50\text{Sp}100}$ caldo en un tubo de cultivo de plástico con tapón de 16 mM x 150 mM y se incubaron en la incubadora Infors (37C, 150 rpm, 2% de CO_2) en un ángulo de ~60°. Después de 3 días, los cultivos se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 125 mL de conectado a espuma que contiene 30 mL $\text{JB2.1}^{\text{Km}50\text{Sp}100}$ a un $\text{DO}_{730} = \sim 0.1$. El peso inicial de cada cultivo en matraz se determinó de manera que dH_2O estéril podría ser
20 adicionada en tiempos de muestreo para tener en cuenta la evaporación. En cada punto de muestreo, se eliminaron 300 μL del cultivo y los cultivos se reponían con una cantidad igual de medio JB2.1 fresco. En intervalos de aproximadamente 24 horas, se tomaron muestras para las determinaciones de velocidad de crecimiento y del etanol/acetaldéhid. Las mediciones de OD_{730} y las curvas de crecimiento derivadas se muestran la figura 10. Los niveles de etanol y acetaldéhid en el medio se determinaron como se describe en este documento y los datos se presentan en la figura 11 y la figura 12, respectivamente.

25 Como se puede ver en las figuras, los niveles de etanol fueron más altos en JCC445 + 782, donde adhA_M adicional se expresa bajo el control del promotor lambda cl. Los niveles acumulativos de etanol producidos por esta cepa fueron de aproximadamente 4 g/L. En cualquier momento dado, los niveles medidos de etanol fueron sustancialmente más altos que los medidos en JC445 o JCC445 + 773, en algunos casos, casi dos veces más altos. Además, la misma cepa produce sólo el 50% (o menos) acetaldéhid en comparación con JC445 o JCC445 + 773 (que expresa adhA_M bajo el control del promotor PaphII). Por lo tanto, este ejemplo demuestra no sólo los niveles de etanol mejorados y los niveles
30 reducidos de productos intermedios tóxicos pueden ser el resultado a partir de alteraciones a los promotores que controlan la expresión de adhA_M , sino que también provee un ejemplo específico de una cianobacteria diseñada genéticamente (JCC445 + 773) con mejoradas capacidades de producción de etanol.

Listado informal de secuencias

SEQ ID NO: 1

Gen de *adhA* de *Moorella* con codón optimizado

```

ATGTGGGAAACTAAGATTAATATCAACGAAGTCCGTGAGATCCGCGCGAAAACCACCGTTTACTTTGG
TGTTGGTGCTATCAAGAAAATTGATGATATCGCTCGCGAGTTCAAAGAAAAAGGTTACGATCGCATCA
TCGTGATCACCGGTAAGGCGCTTACAAAAGCGACCGGTGCATGGGAATACATCGTGCCTGCTCTGAAC
AAAAACCAGATTACGTATATCCATTATGATCAGGTGACCCCGAACCCGACCGTAGATCAGGTTGACGA
AGCGACCAAACAGGCCCGTGAATTTGGCGCTCGCGCAGTACTGGCTATTGGTGGCGGTTCCCCGATCG
ACGCAGCCAAATCTGTGGCGGTGCTGCTGTCTTATCCGGACAAAACGCTCGTCAGCTGTACCAGCTG
GAGTTTACCCCGGTAAGCAGCGCCGATCATCGCCATCAACCTGACCCACGGTACGGGCACCGAAGC
GGACCGCTTCGCGGTTGTATCTATCCCGGAGAAGGCCTACAAACCGGCTATCGCTTACGATTGCATCT
ACCCGCTGTA CTATTGACGACCCGGCTCTGATGGTTAAACTGCCGAGCGACCCAGACGGCGTACGTT
AGCGTGGATGCCCTGAACCATGTTGTTGAAGCTGCGACCTCCAAAGTTGCATCTCCGTACACTATTATC
CTGGCAAAGAAACGGTCCGTCATCGCACGCTACCTGCCTCAGGCCCTGTCTCACCCTGCAGACCT
GACCGCGGTTATTACCTCTGTATGCCTCTCTGATCGCCGGTATTGCGTTTGATAACGGCCTGCTGCA
TTTACCCACGCACTGGAACACCCGCTGTCTGCCGTGAAACCTGAACTGGCTCATGGCCTGGGTCTGG
GTATGCTCCTGCCTGCGGTAGTTAAACAATAATTTATCCGGCTACCCCGGAGGTA CTGGCGGAAATCCTG
GAACCAATCGTACCGGATCTGAAAGGCGTTCCGGGCGAGGCTGAGAAAGCGGCGTCTGGCGTGCCGA
AATGGCTGGCTGGTGCAGGCATCACTATGAAACTGAAAGACGCGGGTTTCCAGGCTGAAGATATCGCG
CGTCTGACCGACCTGGCCTTCAACCACTCCATCCCTGGAACCTCTGCTGTCTATGGCACCAGTAACTGCT
GATCGTGAGCGTGTGAAAGCAATTTACCAGGACGCATTTTGA

```

35 SEQ ID NO: 2

ES 2 560 281 T3

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

MWETKININEVREIRAKTTVYFGVGAIKKIDDIAREFKEKGYDRIIVITGKGAYKATGAWEYIVPALNKNQI
TYIHYDQVTPNPTVDQVDEATKQAREFGARAVLAIGGGSPIDAAKSVAVLLSYDPKNARQLYQLEFTPVK
AAPIIAINLTHGTGTEADRFVVSIPKAYKPAIAYDCIYPLYSIDDPALMVKLPSDQTAYVSDALNHVVE
AATSKVASPYTIILAKETVRLIARYLPQALSHPADLTARYLLYASLIAGIAFDNGLLHFTHALEHPLSAVKP
ELAHGLGLGMLLPAVVKQIYPATPEVLAEIFEPIVPDLKGVPGEAKEKAASGVAKWLAGAGITMCLKDAGF
QAEDIARLTDLAFTTPSLELLLSMAPVTDADRERVKAIYQDAF

SEQ ID NO: 27

Secuencia en dirección 5' de adh_M en JCC782

- 5 Secuencia del promotor lambda cl aparece en letras minúsculas claras; A mayúscula es el sitio de inicio de la transcripción; secuencia en cursiva es secuencia UTR 5' rbcL a partir de PCC7002; letras subrayadas, mayúsculas indican primer codón en el gen

taacaccgtgctgtgactattttacctctggcggtgataatggtgcAggatcctttgctggaggaaaaccatATG

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para la producción biogénica de etanol, que comprende: cultivar una cianobacteria diseñada genéticamente en un medio de cultivo en la presencia de luz y CO₂, en donde dicha cianobacteria comprende un gen de la piruvato descarboxilasa recombinante y al menos dos copias de un gen del alcohol deshidrogenasa recombinante que codifica un alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH.
2. El método de la reivindicación 1, en donde al menos un gen del alcohol deshidrogenasa recombinante es extracromosómico.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la expresión del alcohol deshidrogenasa es impulsada por los promotores en al menos dos plásmidos diferentes.
- 10 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los niveles de actividad del alcohol deshidrogenasa expresada recombinantemente y piruvato descarboxilasa en dicha cianobacteria son variados por la expresión diferencial.
5. El método de la reivindicación 4, en donde dicha expresión diferencial se logra mediante la modulación de la fuerza de un promotor que controla la expresión de alcohol deshidrogenasa o piruvato descarboxilasa.
- 15 6. El método de la reivindicación 1, en donde la expresión de al menos una copia de dicho gen del alcohol deshidrogenasa recombinante, es impulsado por un promotor λ .
7. El método de la reivindicación 1, en donde dicha cianobacteria es una cianobacteria termófila.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho gen del alcohol deshidrogenasa recombinante codifica una *Moorella* sp. HUC22-1 adhA.
- 20 9. Una cianobacteria diseñada genéticamente, que comprende un gen de la piruvato descarboxilasa recombinante y al menos dos copias de un gen del alcohol deshidrogenasa recombinante que codifica un alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH.
10. La cianobacteria diseñada genéticamente de la reivindicación 9, en donde al menos un gen del alcohol deshidrogenasa recombinante es extracromosómico.
- 25 11. La cianobacteria diseñada genéticamente de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde la expresión del alcohol deshidrogenasa es impulsada por los promotores en al menos dos plásmidos diferentes.
12. La cianobacteria diseñada genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde los niveles de actividad del alcohol deshidrogenasa expresada recombinantemente y la piruvato descarboxilasa en dicha cianobacteria son variados por la expresión diferencial.
- 30 13. La cianobacteria diseñada genéticamente de la reivindicación 12, en donde dicha expresión diferencial se logra mediante la modulación de la fuerza de un promotor que controla la expresión del alcohol deshidrogenasa o la piruvato descarboxilasa.
14. La cianobacteria diseñada genéticamente de la reivindicación 9, en donde la expresión de al menos una copia de dicho gen del alcohol deshidrogenasa recombinante es impulsada por un promotor λ .
- 35 15. La cianobacteria diseñada genéticamente de la reivindicación 9, en donde dicha cianobacteria carece de un gen de la lactato deshidrogenasa de funcionamiento o actividad de la enzima lactato deshidrogenasa.
16. La cianobacteria diseñada genéticamente de la reivindicación 9, en donde dicha cianobacteria es un termófilo o una cepa de *Synechococcus*.
- 40 17. La cianobacteria diseñada genéticamente de la reivindicación 16, en donde dicha cianobacteria es una cianobacteria termófila.
18. La cianobacteria diseñada genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 17, en donde dicho gen del alcohol deshidrogenasa recombinante codifica una *Moorella* sp. HUC22-1 adhA.

Genes de ejemplo para el diseño de los microorganismos productores del producto a base de carbono, fijadores de CO₂

Producto	Gen	Enzima	Organismo - de Ejemplo	EC N°	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>macC</i>	enoil-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
	<i>adhE</i>	alcohol deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.1,2	butanal + {NADH, NADPH} = 1-butanol
Octano	<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 de Ejemplo	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-desidroquinato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	4.2.3.4	3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-P = 3-desidroquinato
	<i>aroD</i>	3-desidroquinato deshidratasa	<i>Escherichia coli</i>	4.2.1.10	3-desidroquinato = 3-desidro-siquimato
	<i>quiC</i>	3-desidro-siquimato deshidratasa	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	4.2.1.n	3-desidro-siquimato = protocatecuato
	<i>pcaF</i>	β -ceto adipil-CoA sintasa	<i>Rhodococcus sp. RHA1</i>	2.3.1.174	acetil-CoA + succinil-CoA = β -ceto adipil-CoA + CoA
	<i>pcaJ</i>	β -ceto adipato CoA-transferasa	<i>Pseudomonas putida</i>	2.8.3.6	β -ceto adipil-CoA + succinato = β -ceto adipato + succinil-CoA
	<i>pcaL</i>	3-oxoadipato enol-lactona hidrolasa	<i>Rhodococcus sp. RHA1</i>	3.1.1.24	β -ceto adipato = β -ceto adipato enol lactona
	<i>pcaL</i>	4-carboximucopolactona descarboxilasa	<i>Rhodococcus sp. RHA1</i>	4.1.1.44	β -ceto adipato enol lactona + CO ₂ = γ -carboximucopolactona
	<i>pcaB</i>	γ -carboxi-cis,cis-muconato cicloisomerasa	<i>Rhodococcus sp. RHA1</i>	5.5.1.2	γ -carboxi-mucopolactona = 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-dihidroliol deshidrogenasa	<i>Rhodococcus sp. RHA1</i>	1.3.1.n	protocatecuato + CO ₂ + NADPH = DDT

FIGURA 1-B

Producto	Gen	Enzima:	Organismo de Ejemplo	EC N°	Reacción
	<i>tpaAB</i>	tereftalato 1,2-dioxigenasa	<i>Rhodococcus sp. RHA1</i>	1.14.12.15	DDT = tereftalato + NADH + O2
1,3-propanodiol	<i>DAR1</i>	sn-glicerol-3-P deshidrogenasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.1.1.(8,94)	dihidroxiacetona-P + {NADH, NADPH} = sn-glicerol-3-P
	<i>GPP2</i>	sn-glicerol-3-fosfatasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.1.3.21	sn-glicerol-3-P = glicerol
	<i>dhaB1-3</i>	glicerol deshidratasa	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4.2.1.30	glicerol = 3-hidroxiopropanal
	<i>dhaT</i>	1,3-propanodiol oxidoreductasa.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.1.1.202	3-hidroxiopropanal + NADH = 1,3-propanodiol
1,4-butanodiol	<i>sucD</i>	succinil-CoA deshidrogenasa	<i>Glostridium kluuyeri</i>	1.2.1.n	succinil-CoA + NADPH = semialdehido succinico + CoA
	<i>GHBH</i>	4-hidroxiobutirato deshidrogenasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.1.1.2	semialdehido succinico + NADPH = 4-hidroxiobutirato
	<i>gdhA</i>	glutamato deshidrogenasa	<i>Escherichia coli.</i>	1.4.1.4	α-cetoglutarato + NH3+ NADPH = glutamato
	<i>gadA</i>	glutamato descarboxilasa	<i>Escherichia coli</i>	4.1.1.15	glutamato = 4-aminobutirato + CO2
	<i>gabT</i>	4-aminobutirato transaminasa	<i>Escherichia coli</i>	2.6.1.19	4-aminobutirato + α-cetoglutarato = glutamato + semialdehido succinico
	<i>aldH</i>	aldehido deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.n	4-hidroxiobutirato + NADH = 4-hidroxiobutanal
	<i>dhaT</i>	1,3-propanodiol oxidoreductasa	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.1.1.202	4-hidroxiobutanal + NADH = 1,4-butanodiol
PHB	<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-hidroxiobutiliril-CoA
	<i>phaC</i>	PHA sintasa	<i>Ralstonia eutropha</i>	ninguno:	3-hidroxiobutiliril-CoA = PHB + CoA
acrilato	<i>paaf</i>	enoil-CoA hidratasa	<i>Escherichia coli</i>	4.2.1.17	3-hidroxiobutiliril-CoA = acriloil-CoA
	<i>pct</i>	acrilato CoA-transferasa	<i>Ralstonia eutropha</i>	2.8.3.n	acriloil-CoA + acetato = acrilato + acetil-CoA

FIGURA 1-C

Producto	Gen	Enzima.	Organismo de Ejemplo	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 + CO2 = 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 = CO2+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 oleovorans</i>	1.14.15.3	ácido graso + NADPH + O2 = ω-hidroxiácido
		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 + CO2
	<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 citidiltransferasa	<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 de Ejemplo	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-meil-D-eritritol-2,4-ciclo-PP = (E)-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 + NADP
	<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 + 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-poliprenilictransferasa 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-oxobutirato	<i>accBCAD</i>	acetil-CoA carboxilasa	<i>Escherichia coli</i>	6.4.1.2	acetil-CoA + ATP + CO2 = malonil-CoA
γ-valerolactona	(<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-oxobutirato + CoA
	(<i>nc</i>).	2-oxobutirato sintasa	<i>Clostridium pasteurianum</i>	1.2.7.2	propionil-CoA + CO2 + 2 Fdred = 2-oxobutirato + CoA + 2 FDox
	(<i>nc</i>).	2-etilmalato sintasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.3.3.6	2-oxobutirato + acetil-CoA = (R)-2-etilmalato + CoA
		análogo de aconitasa			(R)-2-etilmalato = 3-carboxi-4-hidroxi-3-oxobutirato
		análogo de isocitrato deshidrogenasa			3-carboxi-4-hidroxi-3-oxobutirato = levulinato
	<i>ler</i>	análogo de acetil-CoA reductasa	<i>Ralstonia eutropha</i>		levulinato + NAD(P)H = 4-hidroxi-3-oxobutirato

FIGURA 1-E

Producto	Gen	Enzima	Organismo de Ejemplo	EC Nº	Reacción
	(nc)	1,4-lactonasa	<i>Rattus norvegicus</i>	3.1.1.25	4-hidroxi-pentanoato = γ -valerolactona
	accBCAD	acetil-CoA carboxilasa	<i>Escherichia coli</i>	6.4.1.2	acetil-CoA + ATP + CO ₂ = malonil-CoA
	(nc)	malonil-CoA reductasa bifuncional	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	1.2.1.18, 1.1.1.59	malonil-CoA + 2 NADPH = 3-hidroxi-propionato + CoA
	paaf	enol-CoA hidratasa	<i>Escherichia coli</i>	4.2.1.17	3-hidroxi-propionil-CoA = acrilil-CoA
	A13G06810	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	acetooacetil-CoA reductasa	<i>Ralstonia eutropha</i>	1.1.1.36	3-cetovaleril-CoA + NADPH = (R)-3-hidroxi-valeril-CoA
	crt	3-hidroxi-butiril-CoA deshidratasa	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	4.2.1.55	(R)-3-hidroxi-valeril-CoA = 3-pentenil-CoA
	abiD	vinilacetil-CoA Δ -isomerasa	<i>Clostridium difficile</i>	5.3.3.3	3-pentenil-CoA = 4-hidroxi-pentanoil-CoA
	orfZ	4-hidroxi-butiril-CoA transferasa	<i>Clostridium kluyveri</i>	2.8.3.n	4-hidroxi-pentanoil-CoA + acetato = acetil-CoA + 4-hidroxi-pentanoato
	(nc)	1,4-lactonasa	<i>Rattus norvegicus</i>	3.1.1.25	4-hidroxi-pentanoato = γ -valerolactona
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 semialdehído deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i>	1.2.1.11	L-aspartato-semialdehído = NADPH + L-aspartil-4-fosfato
	dapA	dihidropicolinato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	4.2.1.52	piruvato + L-aspartato-semialdehído = L-2,3-dihidropicolinato
	dapB	dihidropicolinato reductasa	<i>Escherichia can</i>	1.3.1.26	L-2,3-dihidropicolinato + NADPH = tetrahidropicolinato
	dapD	tetrahidropicolinato succinilasa.	<i>Escherichia coli</i>	2.3.1.117	tetrahidropicolinato + succinil-CoA = N-succinil-2-amino-6-cetopimeolato + CoA

FIGURA 1-F

Producto	Gen	Enzima	Organismo de Ejemplo	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 + CO2
	<i>At4g33680</i>	LL-diaminopimelato aminotransferasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2.6.1.83	tetrahidropicolinato + 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 + CO2 + 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-semialdehido
	<i>LYS9, LYS13</i>	aminoadipato semialdehido-glutamato reductasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.5.1.10	L-glutamato + L-2-aminoadipato 6-semialdehido + 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 de Ejemplo	EC N°	Reacción
serina	<i>serA</i>	fostoglicerato deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.95	3-P-D-glicerato = 3-fosfonooxipiruvato + NADH
	<i>serC</i>	fostoserina transaminasa	<i>Escherichia coli</i>	2.6.1.52	orto-P-L-serina + α-cetoglutarato = 3-fosfonooxipiruvato + L-glutamato
aspartato	<i>serB</i>	fostoserina fosfatasa	<i>Escherichia coli</i>	3.1.3.3	orto-P-L-serina = L-serina
	<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-fostato 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-fostato 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-fostato 1,6-fostomutasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5.4.2.8	D-manosa-6-P = D-manosa-1-P
	<i>CYT1</i>	manosa-1-fostato 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-fostato guanililtransferasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2.7.n.n.	GDP-L-galactosa = L-galactosa-1-P
	<i>VTC4</i>	L-galactosa 1-fostato 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-gatactonolactona oxidasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.3.3.12	L-1,4-galactonolactona + O2 = ascorbato + H2O2
	<i>katE</i>	catalasa	<i>Escherichia coli</i>	1.11.1.6	2 H2O2 = O2

FIGURA 1-H

Producto	Gen	Enzima	Organismo de Ejemplo	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>AtTG55880</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 de Ejemplo	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-cetogutarato + 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 de Ejemplo	EG N°	Reacción
	<i>idi</i>	isopentenil-difostato Δ isomerasa	<i>Escherichia coli</i>	5.3.3.2	dimetilalil-PP = isopentenil-PP
		isopentenil-PP pirofostataza			isopentenil-PP = isopentenol
	<i>ERG13</i>	isopentenol diquinasa			isopentenil-PP = isopentenol + ATP
	<i>HMG2</i>	hidroximetilglutaril-CoA sintasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.3.3.10	acetil-CoA + acetacetil-CoA = (S)-3-hidroxi-3H-metilglutaril-CoA + CoA
	<i>ERG12</i>	hidroximetilglutaril-CoA reductasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.1.1.34	(R)-mevalonato + CoA = (S)-3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA + 2 NADPH
	<i>ERG8</i>	mevalonato quinasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.7.1.36	ATP + (R)-mevalonato = (R)-5-P-mevalonato
	<i>MVD1</i>	fosfomevalonato quinasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.7.4.2	ATP + (R)-5-P-mevalonato = (R)-5-PP-mevalonato
lanosterol	<i>dxs</i>	difosfomevalonato descarboxilasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4.1.1.33	ATP + (R)-5-PP-mevalonato = isopentenil-PP + CO ₂
	<i>dxr</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>ispD</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>ispE</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>ispF</i>	4-(citidina 5'-difostato)-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
		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 de Ejemplo	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 pneumoniae</i>	2.3.1.38	acetil-CoA + ACP = acetil-ACP + CoA
* son genes necesarios <i>pfaBCDE</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 de Ejemplo	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-gliceraldehido-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'-P)-2-C-metil-D-eritritol + CMP
	<i>ispF</i>	2-C-metil-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	4.6.1.12	2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclo-PP + NADPH = (E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il-PP + NADPH = isopentenil-PP
	<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 sp. PCC6803</i>	2.5.1.29	dimetilalil-PP + 2 isopentenil-PP = farnesil-PP

FIGURA 1-M

Producto	Gen	Enzima	Organismo de Ejemplo	EC N ^o	Reacción
	<i>crtE</i>	geranilgeranil pirofosfato sintasa	<i>Synechocystis sp.</i> PCC6803	2.5.1.29	isopentenil-PP + farnesil-PP = (trans)-geranilgeranil-PP
	<i>crtB</i>	fitoeno sintasa	<i>Synechocystis sp.</i> PCC6803	2.5.1.32	2 geranilgeranil-PP = fitoeno
	<i>crtI</i>	fitoeno oxidorreductasa	<i>Synechocystis sp.</i> PCC6803	1.14.99.n	fitoeno + 2 NADPH + 2 O ₂ = ζ-caroteno
	<i>crtQ-2</i>	ζ-caroteno oxidorreductasa	<i>Synechocystis sp.</i> 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 succinico + CoA
	<i>GHBDH</i>	4-hidroxitirato deshidrogenasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.1.1.2	semialdehído succinico + NADPH = 4-hidroxitirato
	<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>	4.1.1.5	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 succinico
	<i>aldH</i>	aldehído deshidrogenasa	<i>Escherichia coli</i>	1.1.1.n	4-hidroxitirato + NADH = 4-hidroxitirato
	<i>dhaT</i>	1,3-propanodiol oxidorreductasa	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.1.1.202	4-hidroxitirato + NADH = 1,4-butanodiol
etileno		alcohol deshidratasa		4.2.1.n	1,4-butanodiol = 1,3-butadieno
propileno	<i>accBCAD</i> (<i>nc</i>)	acetil-CoA carboxilasa malonil-CoA reductasa bifuncional	<i>Escherichia coli</i> <i>Chloroflexus aurantiacus</i>	6.4.1.2 1.2.1.18, 1.1.1.59	acetil-CoA + ATP + CO ₂ = malonil-CoA malonil-CoA + 2 NADPH = 3-hidroxi-propionato + CoA
	<i>orfZ</i>	3-hidroxi-propionil-CoA transferasa	<i>Clostridium kluyveri</i>	2.8.3.n	3-hidroxi-propionato + acetil-CoA = 3-hidroxi-propionil-CoA + acetato

FIGURA 1-N

Producto	Gen	Enzima	Organismo de Ejemplo	EC*	Reacción
		3-hidroxi-propionil-CoA deshidratasa	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	4.2.1.17	3-hidroxi-propionil-CoA = acrilil-CoA
		acrilil-CoA reductasa	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	1.3.1.n	acrilil-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 1-0

Succinato y derivados

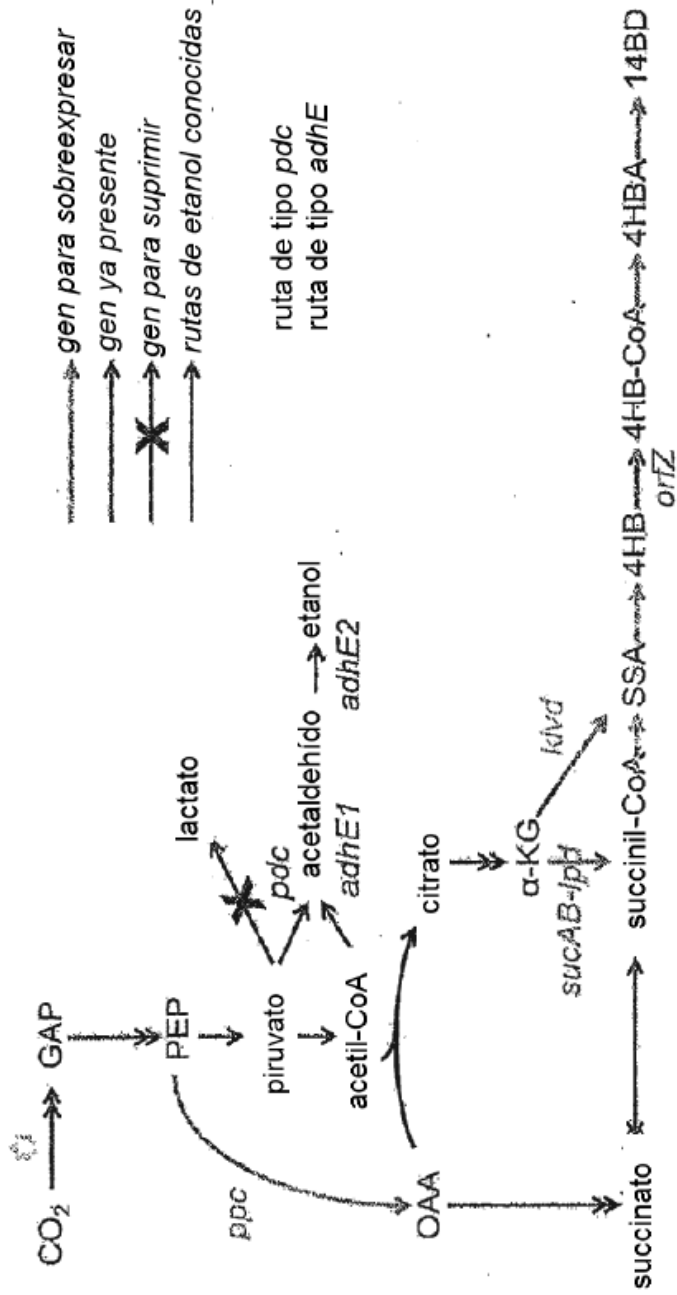


Fig. 2

Fig. 3

Señal: 20080326-08.D\FID1A.ch

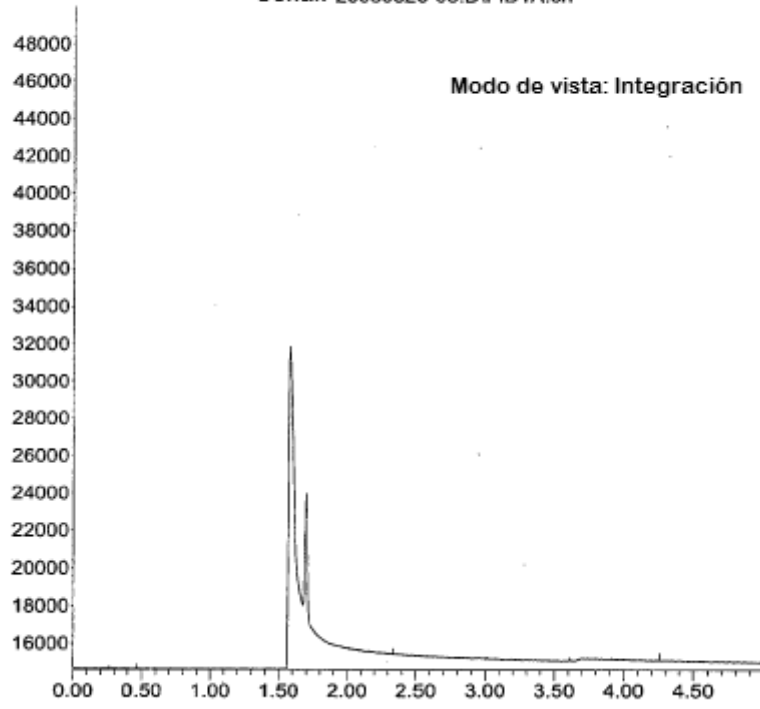


Fig. 4

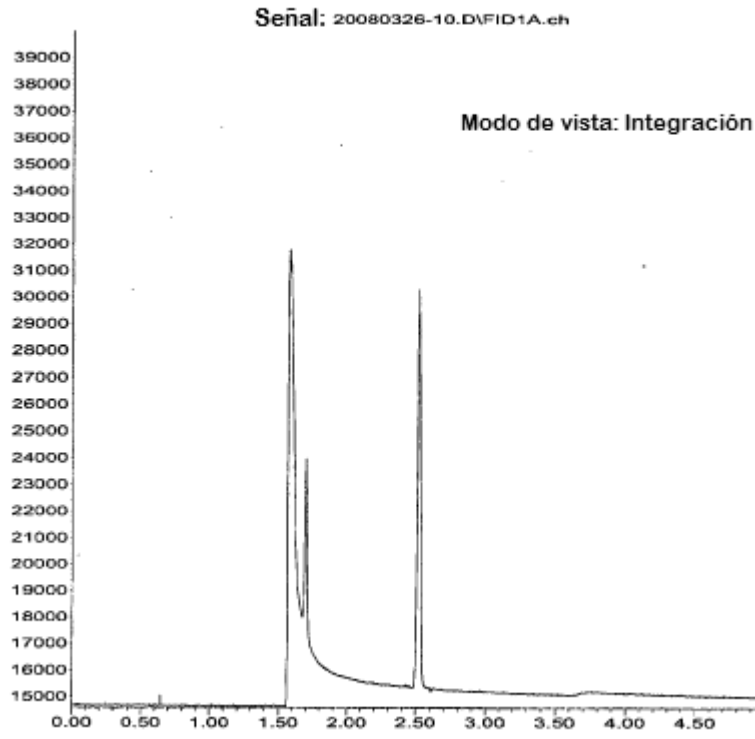


Fig. 5

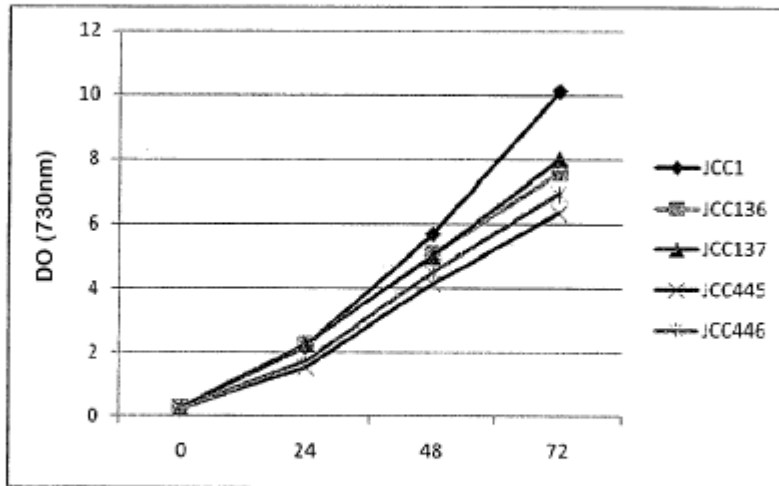


Fig. 6

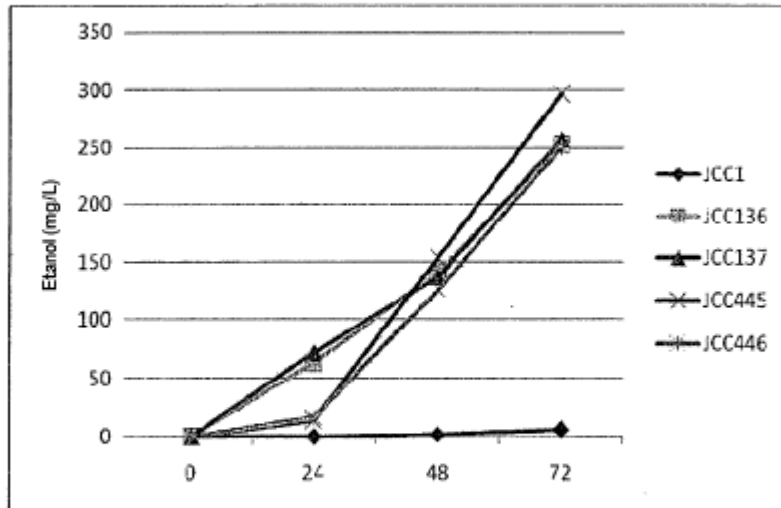


Fig. 7

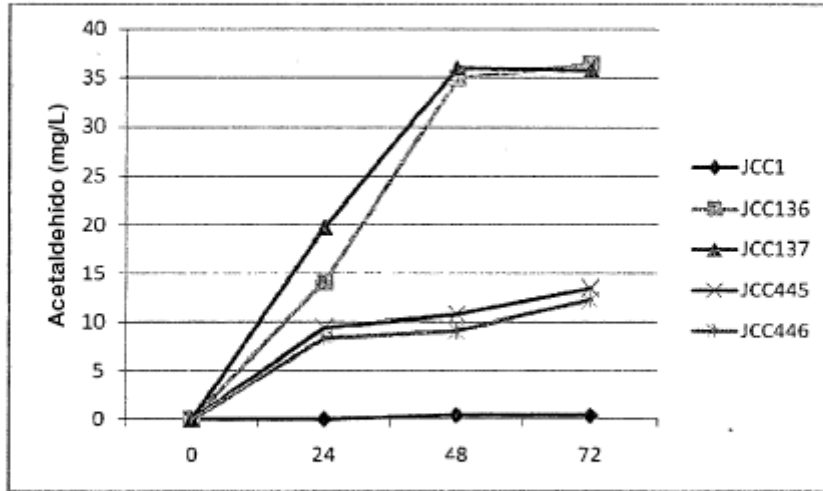


Fig. 8

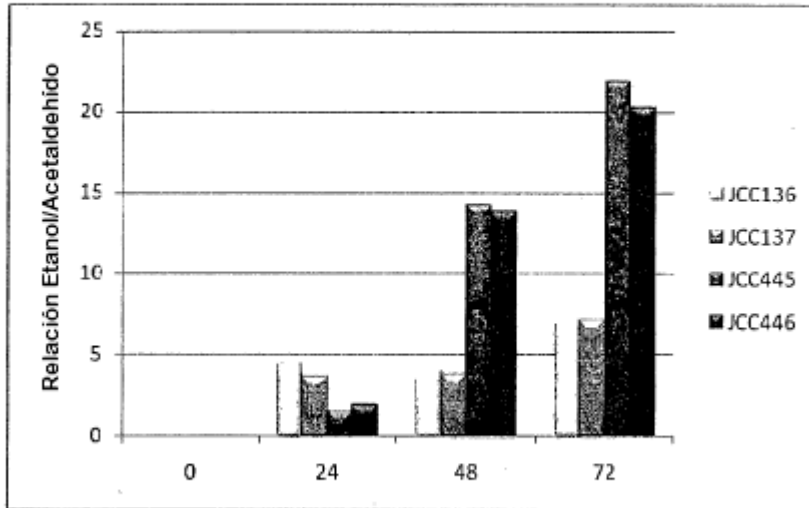


Fig. 9

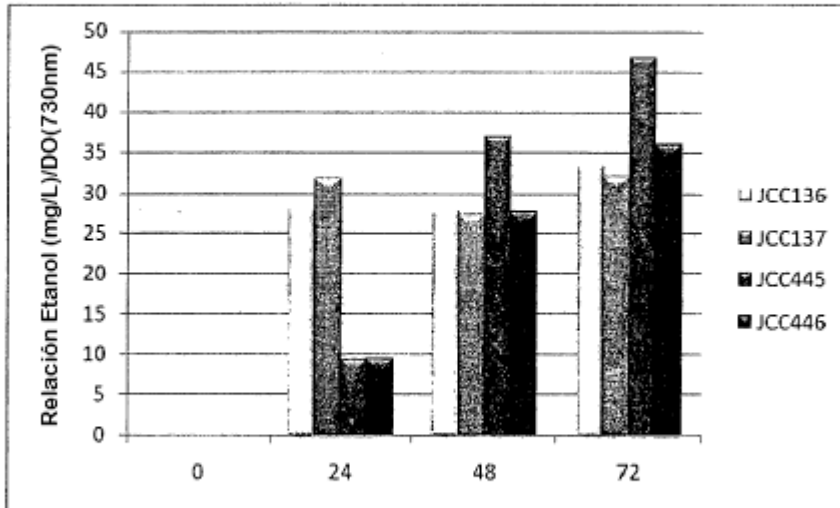


Fig. 10

Curva de crecimiento (DO vs Tiempo) de JCC445 y JCC445 que contiene genes de adh_A adicional en pAQ7

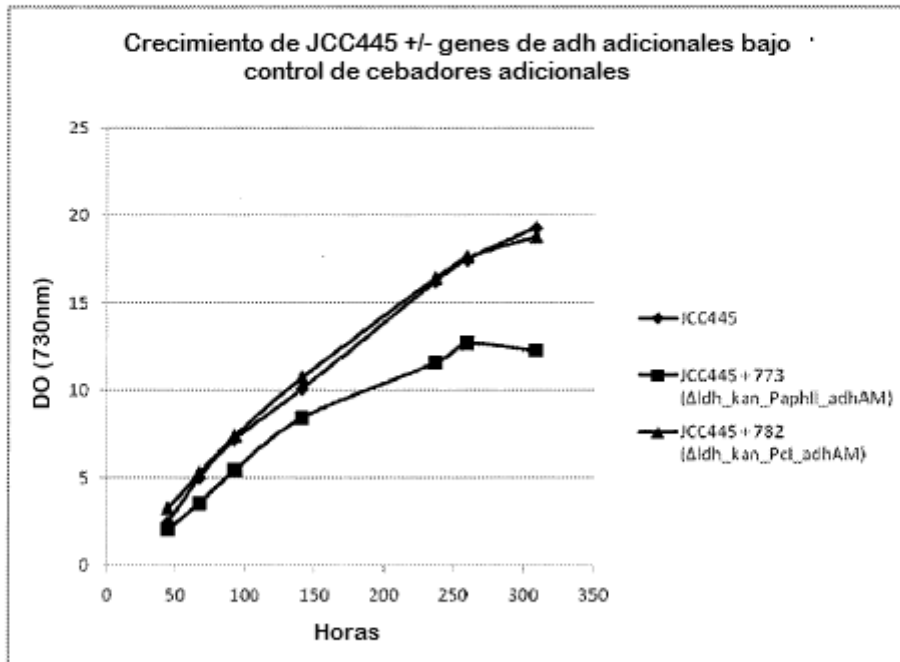


Fig. 11

Producción de etanol (mg/L) de JCC445 y JCC445 que contiene genes de adh adicionales en pAQ7

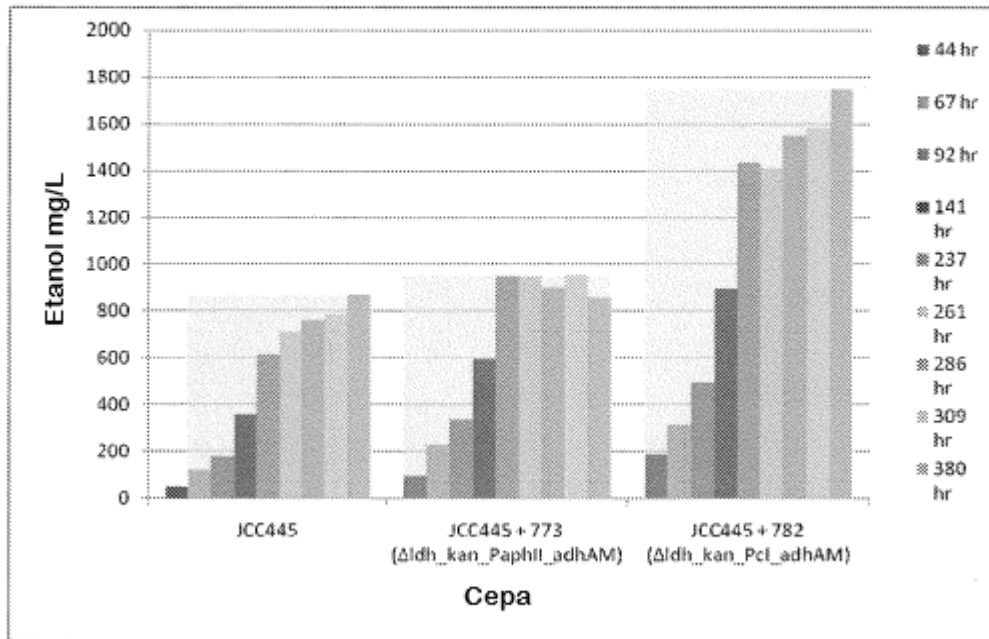


Fig. 12

Producción de acetaldehído (mg/L) de JCC445 y JCC445 que contiene genes de adh adicionales en pAQ7

