

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 749**

51 Int. Cl.:

C10L 1/30 (2006.01)

C12P 7/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2009 PCT/US2009/034801**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2009 WO09105733**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2009 E 09712906 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2250276**

54 Título: **Organismos de diseño para la producción fotobiológica de butanol a partir de dióxido de carbono y agua**

30 Prioridad:

23.02.2008 US 66845

23.02.2008 US 66835

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

18.05.2017

73 Titular/es:

LEE, JAMES WEIFU (100.0%)

904 Lingale Arch

Chesapeake, VA 23322 , US

72 Inventor/es:

LEE, JAMES WEIFU

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 612 749 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

Organismos de diseño para la producción fotobiológica de butanol a partir de dióxido de carbono y agua

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, a la tecnología de producción de energía de biocombustibles con protección de bioseguridad. De modo más específico, la presente invención proporciona una metodología de producción fotobiológica de butanol basada en plantas transgénicas de diseño, tales como algas transgénicas, algas verdeazuladas (cianobacterias y oxiclolorobacterias) o células vegetales que se crean para emplear el poder reductor (NADPH) y la energía (ATP) adquiridos del proceso fotosintético para la síntesis inmediata de butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) directamente a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O).

Antecedentes de la invención

10 El butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), un alcohol de cuatro carbonos, puede emplearse como combustible líquido para hacer funcionar motores, tales como coches. El butanol puede sustituir a la gasolina, y el contenido en energía de ambos combustibles es casi el mismo (110.000 Btu por galón (3,78 litros) para el butanol; 115.000 Btu por galón (3,78 litros) para la gasolina). Además, el butanol tiene propiedades mucho mejores como combustible alternativo cuando se compara con el etanol. Estas incluyen: 1) el butanol tiene un mayor contenido energético (110.000 Btu por galón (3,78 litros) de butanol) que el etanol (84.000 Btu por galón (3,78 litros) de etanol); 2) el butanol es seis veces menos "evaporable" que el etanol y 13,5 veces menos evaporable que la gasolina, haciendo más segura su utilización en forma de un oxigenado y eliminando, con ello, la necesidad de mezclas muy especiales durante el verano y el invierno; 3) el butanol puede transportarse a través de la infraestructura de combustibles existentes, que incluye los oleoductos, mientras que el etanol debe transportarse a través de ferrocarril, barcas o camiones; y 4) el butanol puede emplearse como sustituto de la gasolina litro a litro, por ejemplo, 100% o cualquier otro porcentaje, mientras que el etanol solo puede utilizarse como aditivo para la gasolina hasta aproximadamente 85% (E-85) y, en este caso, solo después de una modificación significativa del motor (mientras que el butanol puede servir al 100% como sustituto de combustible sin tener que modificar el motor del coche concreto).

25 Ya existe un significativo potencial de mercado para el butanol como combustible líquido en los actuales sistemas de transporte y energía. El butanol también se emplea como disolvente industrial. En los EEUU, en la actualidad, el butanol se produce principalmente a partir del petróleo. Históricamente (1900-1950), el biobutanol ha sido fabricado a partir de maíz y melazas en un proceso de fermentación que también produce acetona y etanol y que se ha denominado una fermentación ABE (acetona, butanol, etanol), realizada generalmente con ciertas bacterias productoras de butanol, tales como *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*. Sin embargo, cuando EEUU perdió su suministro barato de azúcar desde Cuba, aproximadamente en 1954, la producción de butanol mediante fermentación disminuyó principalmente debido a que el precio del petróleo bajo por debajo de el del azúcar. En fechas recientes, existe un renovado interés en I+D para producir butanol y/o etanol a partir de biomasa, tal como almidón de maíz, empleando procesos de fermentación con *Clostridium* y/o levaduras. Sin embargo, de modo similar a la situación de la "producción de etanol a partir de almidón de maíz," el proceso de "producción de butanol a partir de almidón de maíz" también requiere una serie de etapas que consumen energía, que incluyen el cultivo de maíz agrícola, la recolección del grano de maíz, el procesamiento del almidón del grano de maíz, y la fermentación del almidón al azúcar al butanol. Es probable que el proceso de "producción de butanol a partir de almidón de maíz" gaste casi tanta energía como el valor energético de su producto, el butanol. Esto no resulta sorprendente, porque el almidón de maíz que puede emplear la tecnología actual representa solo una pequeña fracción de la biomasa del cultivo de maíz, que incluye los tallos, las hojas y las raíces del maíz. Normalmente, los tallos del maíz se dejan en los campos agrícolas, en donde se descomponen lentamente para producir de nuevo CO_2 , debido a que representan materiales de biomasa en gran medida lignocelulósicos que la industria de biorrefinería actual no puede emplear de modo eficaz para la producción de etanol o butanol. Se está investigando la producción de etanol o butanol a partir de materiales de biomasa vegetal lignocelulósicos, un concepto denominado "etanol celulósico" o "butanol celulósico". Sin embargo, la biomasa vegetal ha desarrollado mecanismos eficaces para resistir el asalto a sus azúcares estructurales de la pared celular por parte de organismos del reino microbiano y animal. Esta propiedad supone un recalcitrancia natural que crea barreras a la transformación barata de biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables. Por tanto, uno de los problemas conocidos como "recalcitrancia lignocelulósica" representa una tremenda barrera técnica para la conversión barata de biomasa vegetal en azúcares fermentables. Es decir, debido al problema de la recalcitrancia, las biomásas lignocelulósicas (tales como tallos de maíz, pasto varilla y materiales vegetales leñosos) no pueden convertirse con facilidad en azúcares fermentables para fabricar etanol o butanol sin cierto pretratamiento, que a menudo está asociado con un alto coste de procesamiento. A pesar de más de 50 años de trabajos de I+D sobre el pretratamiento de biomasa lignocelulósica y el procesamiento para la producción butanol fermentativa, el problema de la recalcitrancia lignocelulósica sigue siendo una tremenda barrera técnica que aún no ha sido eliminada. Además, las etapas de cultivo de biomasa lignocelulósica, recolección, procesamiento del pretratamiento y fermentación de la celulosa a azúcar a butanol gastan energía. Por tanto, cualquier nueva tecnología que pudiera sortear estos problemas de cuello de botella de la tecnología de la biomasa sería útil.

60 Las oxifotobacterias (también conocidas como algas verdeazuladas, que incluyen cianobacterias y oxiclolorobacterias)

y las algas (tales como *Chlamydomonas reinhardtii*, *Platymonas subcordiformis*, *Chlorella fusca*, *Dunaliella salina*, *Ankistrodesmus braunii*, y *Scenedesmus obliquus*), que pueden realizar la asimilación fotosintética del CO₂ con emisión de O₂ a partir del agua en un medio de cultivo líquido con una conversión de energía solar en biomasa teórica máxima de aproximadamente 10% presentan un potencial tremendo para convertirse en un recurso energético limpio y renovable. Sin embargo, las plantas verdes fotosintéticas oxigénicas de tipo salvaje, tales como las algas verdeazuladas y las algas eucariotas, no poseen la capacidad de producir butanol directamente a partir de CO₂ y H₂O. La fotosíntesis de tipo salvaje emplea el poder reductor (NADPH) y la energía (ATP) procedentes de la disociación fotosintética del agua y el proceso de transporte de electrones acoplado a un gradiente de protones a través del sistema de membranas tilacoides de las algas para reducir el CO₂ a carbohidratos (CH₂O)_n, tales como almidón, con una serie de enzimas denominadas colectivamente el "ciclo de Calvin" en la región estromática del cloroplasto de las algas o las plantas verdes. El resultado neto del proceso fotosintético de tipo salvaje es la conversión de CO₂ y H₂O en carbohidrato (CH₂O)_n y O₂ empleando la energía del sol según el siguiente proceso de reacción:



Después los carbohidratos (CH₂O)_n se convierten en muchos tipos de materiales celulares complejos (biomasa), que incluyen proteínas, lípidos y celulosa y otros materiales de la pared celular durante el metabolismo y el crecimiento de la célula.

En ciertas algas, tales como *Chlamydomonas reinhardtii*, algunas reservas orgánicas, tales como el almidón, pueden ser metabolizadas lentamente para producir etanol (pero no butanol) a través de una vía metabólica fermentativa secundaria. La vía metabólica fermentativa de las algas es similar al proceso de fermentación de levaduras, mediante el cual el almidón se degrada en azúcares más pequeños, tales como glucosa, que, a su vez, se transforman en piruvato por medio de un proceso de glicólisis. El piruvato después puede convertirse en formiato, acetato y etanol por medio de una serie de etapas metabólicas adicionales (Gfeller y Gibbs (1984), "Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*," *Plant Physiol.*, 75:212-218). La eficacia de este proceso metabólico secundario es bastante limitada, probablemente debido a que solo puede utilizar una pequeña fracción de la reserva orgánica limitada, tal como el almidón en una célula de alga. Además, el proceso metabólico secundario de algas nativo no puede producir butanol.

El documento US 20020042111 describe una cianobacteria genéticamente modificada que presenta una construcción que comprende fragmentos de ADN que codifican las enzimas piruvato descarboxilasa (pdc) y alcohol deshidrogenasa (adh) obtenidas de *Zymomonas mobilis* plásmido pLO1295. Las cianobacterias son capaces de producir etanol en cantidades recuperables de al menos 1,7 μmol de etanol por mg de clorofila por hora.

Tal como se mencionó anteriormente, el butanol presenta muchas mejores propiedades físicas para servir como sustituto de la gasolina como combustible. Por tanto, es necesario un nuevo mecanismo de producción fotobiológica de butanol con una alta eficacia de energía solar a butanol.

La presente invención proporciona unos revolucionarios organismos fotosintéticos de diseño, que son capaces de sintetizar directamente butanol a partir de CO₂ y H₂O empleando la luz solar. El sistema de producción fotobiológica de butanol proporcionado por la presente invención puede sortear todos los problemas de cuello de botella de la tecnología de la biomasa mencionados anteriormente.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos de producción fotobiológica de butanol basados en plantas transgénicas de diseño (tales como algas y oxifotobacterias) o células vegetales. Los organismos fotosintéticos de diseño se crean mediante ingeniería genética, de modo que se domestica el mecanismo de regulación de la fotosíntesis endógeno, y el poder reductor (NADPH) y la energía (ATP) adquiridos de la disociación fotosintética del agua y el proceso de transporte de electrones acoplado a un gradiente de protones se utilizan para la síntesis de butanol (CH₃CH₂CH₂CH₂OH) directamente a partir de dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O). Los métodos de producción fotobiológica de butanol de la presente invención eliminan completamente el problema de la recalcitrancia lignocelulósica sorteando el problema de cuello de botella de la tecnología de la biomasa. Se espera que la tecnología de producción fotosintética de butanol de la presente invención tenga una eficacia de conversión de energía solar a butanol mucho mayor que la tecnología actual.

Una característica fundamental de la presente metodología de producción fotosintética de butanol es crear plantas de diseño (tales como algas) o células vegetales que contengan transgenes que codifican un conjunto de enzimas que pueden actuar sobre un producto intermedio del ciclo de Calvin y convertir el producto intermedio inmediatamente en butanol, en lugar de producir almidón y otros materiales complejos de la biomasa. Por consiguiente, la presente invención proporciona, entre otras cuestiones, métodos para producir butanol basados en una planta o células vegetales de diseño, construcciones de ADN que codifican genes de una vía de producción de butanol de diseño, así como las plantas de diseño y las células vegetales de diseño creadas.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para la producción fotosintética de butanol mediante el cultivo de una planta (tal como un alga de diseño o un alga verdeazulada de diseño) o células vegetales de diseño

en un medio de cultivo líquido, en el que la planta o las células vegetales se modifican genéticamente para que expresen un conjunto de enzimas que actúan sobre un producto intermedio del ciclo de Calvin y convierten el producto intermedio en butanol.

Según la presente invención, una planta de diseño, tal como un alga de diseño o una célula vegetal de diseño para su uso en la producción fotosintética de butanol, puede crearse empleando fundamentalmente cualquier planta, tejido vegetal o célula vegetal como hospedante, con la condición de que dicha planta, tejido vegetal y célula vegetal tenga capacidad fotosintética y pueda cultivarse en un medio líquido. En una realización preferida, se emplea una planta acuática (hidrófitos) para crear una planta de diseño, que incluyen, pero no se limitan a hierbas acuáticas sumergidas (tales como *Hydrilla verticillata*, *Elodea densa*, *Aponogeton boivinianus*, *Hygrophila difformis*), lentejas de agua (tales como *Spirodela polyrrhiza*, *Wolffia globosa*, *Landoltia punctata*), lechugilla de agua (*Pistia stratiotes*), ranúnculos (*Ranunculus*), castaña de agua (*Trapa natans* y *Trapa bicornis*), lirios de agua (tales como *Nymphaea lotus*), jacintos de agua (*Eichhornia crassipes*), praderas marinas (tales como *Heteranthera zosterifolia*), y algas.

En una realización especialmente preferida, se emplean algas como hospedantes para crear algas de diseño para la producción fotosintética de butanol. Las algas adecuadas para su uso en la presente invención pueden ser algas unicelulares o multicelulares (estas últimas incluyen, pero no se limitan a algas marinas, tales como *Ulva latissima* (lechuga de mar), *Ascophyllum nodosum*, y *Porphyra tenera*), e incluyen algas verdes (Chlorophyta), algas rojas (Rhodophyta), algas marrones (Phaeophyta), diatomeas (Bacillariophyta), y algas verdeazuladas (Oxyphotobacteria que incluye Cyanophyta (cianobacterias) y Prochlorophytes (oxiclorobacterias)). Tanto las algas verdeazuladas procariotas (oxifotobacterias) como las algas eucariotas son muy adecuadas para su uso en esta invención. Una especie particularmente preferida de algas para su uso en la presente invención es una especie de alga verde, *Chlamydomonas reinhardtii*, cuyo genoma ha sido recientemente secuenciado.

La selección de las enzimas apropiadas para su uso para crear una vía de producción de butanol de diseño en un hospedante depende del producto intermedio del ciclo de Calvin del cual se bifurca la vía de diseño a partir del ciclo de Calvin. En una realización, la vía de diseño se bifurca desde el punto de la gliceraldehído-3-fosfatasa y la convierte en butanol empleando, por ejemplo, un conjunto de enzimas que consiste en gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa, piruvato quinasa, piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (o piruvato-NADP⁺ oxidoreductasa), tiolasa, 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa, butiraldehído deshidrogenasa, y butanol deshidrogenasa. En esta vía de diseño, para la conversión de dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato en butanol, se generan dos moléculas de NADH a partir de NAD⁺ en la etapa desde el gliceraldehído-3-fosfato hasta el 1,3-difosfoglicerato catalizada por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; mientras, dos moléculas de NADH son convertidas en NAD⁺: una en la etapa catalizada por la 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa para reducir la acetoacetyl-CoA a 3-hidroxi-butiril-CoA, y la otra en la etapa catalizada por la butiril-CoA deshidrogenasa para reducir la crotonil-CoA a butiril-CoA. Por consiguiente, en esta vía de diseño, el número de moléculas de NADH consumidas se equilibra con el número de moléculas de NADH generadas. Además, tanto la etapa catalizada por la butiraldehído deshidrogenasa para reducir la butiril-CoA a butiraldehído como la etapa terminal catalizada por la butanol deshidrogenasa para reducir el butiraldehído a butanol pueden utilizar NADPH, que puede ser regenerado por la disociación fotosintética del agua y el proceso de transporte de electrones acoplado a un gradiente de protones. Por tanto, esta vía de producción de butanol de diseño puede funcionar de modo continuo.

En otro ejemplo, se crea una vía de diseño que parte del producto intermedio 3-fosfoglicerato y lo convierte en butanol empleando, por ejemplo, un conjunto de enzimas que consiste en fosfoglicerato mutasa, enolasa, piruvato quinasa, piruvato-ferredoxina oxidoreductasa, tiolasa, 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa, butiraldehído deshidrogenasa, y butanol deshidrogenasa. Para que esta vía de producción de butanol que se bifurca desde el 3-fosfoglicerato pueda funcionar, es importante utilizar una 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa y una butiril-CoA deshidrogenasa que puedan emplear NADPH, que puede ser suministrado por el proceso de transporte de electrones fotodirigido. Como alternativa, cuando se emplea una 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa y una butiril-CoA deshidrogenasa que solo pueden emplear NADH, en este caso es preferible emplear otra realización que pueda conferir un mecanismo de conversión de NADPH/NADH para suministrar el NADH, convirtiendo NADPH en NADH para facilitar la producción fotosintética de butanol a través de la vía que se bifurca del 3-fosfoglicerato de diseño.

En otro ejemplo, se crea una vía de diseño que parte de la fructosa-1,6-difosfato y la convierte en butanol empleando, por ejemplo, un conjunto de enzimas que consiste en aldolasa, triosa fosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa, piruvato quinasa, piruvato-NADP⁺ oxidoreductasa (o piruvato-ferredoxina oxidoreductasa), tiolasa, 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa, butiraldehído deshidrogenasa, y butanol deshidrogenasa. La adición de otra enzima más al organismo de diseño, la fosfofructosa quinasa, permite la creación otra vía de diseño que se bifurca desde el punto de la fructosa-6-fosfato para la producción de butanol. Al igual que la vía de producción de butanol que se bifurca desde el gliceraldehído-3-fosfato, tanto la vía que se bifurca desde la fructosa-1,6-difosfato como la vía que se bifurca desde la fructosa-6-fosfato pueden generar NADH para su uso en la vía en la etapa catalizada por la 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa para reducir la acetoacetyl-CoA a 3-hidroxi-butiril-CoA, y también en la etapa catalizada por la butiril-CoA deshidrogenasa para reducir la crotonil-CoA a butiril-CoA. En cada una de estas vías de producción de butanol de diseño, el número de moléculas de NADH consumidas se equilibra con el número de

moléculas de NADH generadas; y tanto la butiraldehído deshidrogenasa (que cataliza la etapa que reduce la butiril-CoA a butiraldehído) como la butanol deshidrogenasa (que cataliza la etapa terminal para reducir el butiraldehído a butanol) pueden utilizar NADPH, que puede ser regenerado por la disociación fotosintética del agua y el proceso de transporte de electrones acoplado a un gradiente de protones. Por tanto, estas vías de producción de butanol de diseño pueden funcionar de modo continuo. Puede advertirse que ciertos conjuntos de enzimas de diseño permiten dos o más vías de diseño, es decir, vías que se bifurcan desde dos o más puntos del ciclo de Calvin para la producción de butanol.

Según la presente invención, los ácidos nucleicos que codifican estas enzimas se modifican genéticamente de modo que las enzimas expresadas se insertan en los cloroplastos del hospedante para lograr alcanzar una localización celular diana. La inserción dirigida de las enzimas de la vía de producción de butanol de diseño puede lograrse mediante el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido "señal" estromático, que está dispuesto en un enlace operable con la secuencia de nucleótidos que codifica una enzima de diseño. Son adecuadas una serie de secuencias de péptidos de tránsito para su uso en la inserción dirigida de las enzimas de producción de butanol de diseño en el cloroplasto, que incluyen, pero no se limitan a las secuencias de péptidos de tránsito de las apoproteínas de hidrogenasa (tales como Hyd1), la apoproteína de ferredoxina (Frax1), la apoproteína m de tiorredoxina (Trx2), la apoproteína de glutamina sintasa (Gs2), las apoproteínas de Lhchl, la apoproteína de PSII-T (PsbT), la apoproteína de PSII-S (PsbS), la apoproteína de PSII-W (PsbW), la apoproteína de la subunidad γ de CF₀CF₁ (AtpC), la apoproteína de la subunidad δ de CF₀CF₁ (AtpD), la apoproteína de la subunidad II de CF₀CF₁ (AtpG), las apoproteínas del fotosistema I (PSI) (tales como los genes PsaD, PsaE, PsaF, PsaG, PsaH, y PsaK), y las apoproteínas de la subunidad pequeña (SSU) de rubisco (tal como RbcS2). Las secuencias de péptidos de tránsito preferidas incluyen el péptido de tránsito Hyd1, el péptido de tránsito Frax1, y los péptidos de tránsito de SSU de rubisco (tal como RbcS2).

También según la presente invención, la expresión de la vía de producción de butanol de diseño se controla a través del uso de un promotor externamente inducible, de modo que los transgenes de diseño son expresados de modo inducible bajo ciertas condiciones específicas. En una realización, el promotor inducible empleado para controlar la expresión de los genes de diseño es un promotor que es inducible por anaerobiosis, que incluye, por ejemplo, los promotores del gen de hidrolasa (Hyd1), el gen Cyc6 que codifica la apoproteína del citocromo C₆, y el gen Cpx1 que codifica la coprogeno oxidasa. Otros promotores inducibles para su uso en la presente invención incluyen el promotor de la nitrato reductasa (Nia1), el promotor de la proteína de choque térmico HSP70A, el promotor de Cabll-1, el promotor de Ca1, el promotor de Ca2, los promotores de la nitrito reductasa (*nirA*), los promotores *hox* del gen de hidrogenasa bidireccional, los promotores *groE* que responden a la luz y al calor, los promotores *rbcL* del operón de rubisco, el promotor *smt* inducible por metales (cinc), el promotor *idiA* que responde al hierro, el promotor *crhR* que responde a redox, el promotor *hsp16.6* del gen de choque térmico, el promotor de la proteína del choque térmico pequeña (Hsp), los promotores del gen de anhidrasa carbónica que responden a CO₂, el promotor *cpcB2A2* que responde a la luz verde/roja, los promotores *lexA*, *recA* y *ruvB* que responden a la luz UV, los promotores del gen de la nitrato reductasa (*narB*), y sus combinaciones.

En otro aspecto de la presente invención se proporcionan construcciones de ADN de diseño, que contienen una o más secuencias de nucleótidos que codifican una o más enzimas de la vía de producción de butanol de diseño, cada una de las cuales está colocada en enlace operable con un promotor inducible y con una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de tránsito que se dirige al cloroplasto. Las construcciones pueden contener otras secuencias apropiadas, tales como un gen marcador de selección para facilitar la selección e identificación de los transformantes. Las construcciones de ácidos nucleicos que portan genes de diseño pueden introducirse en un alga, organismo vegetal o tejido o células vegetales hospedantes empleando las técnicas de transformación de genes disponibles, tales como electroporación, transformación natural, conjugación, captación inducida por PEG, y transporte balístico de ADN, y transformación mediada por *Agrobacterium*.

Las plantas de diseño (por ejemplo, algas de diseño), los tejidos vegetales de diseño y las células vegetales de diseño que han sido creados para contener una o más construcciones de diseño forman otra realización de la presente invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona otros métodos para la producción fotosintética potenciada de butanol, las construcciones de diseño relacionadas, y plantas, tejidos y células vegetales de diseño.

En una realización específica, una planta de diseño (por ejemplo, un alga de diseño), un tejido o una célula o células vegetales de diseño que producen butanol de modo fotosintético, tal como se describió anteriormente, se han modificado aún más para que contengan transgenes de diseño para expresar, de modo inducible, una o más enzimas para facilitar la conversión de NADPH/NADH, tal como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺, la NADPH fosfatasa y la NAD quinasa. Como alternativa, la 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa, la butiril-CoA deshidrogenasa, la butiraldehído deshidrogenasa y la butanol deshidrogenasa de la planta, tejido, célula o células vegetales de diseño puede seleccionarse y modificarse de modo que también pueda utilizar NADPH.

En otra realización, una planta, un tejido o una célula o células vegetales de diseño que producen butanol de modo fotosintético se han modificado aún más para inactivar la actividad de síntesis de almidón. En una realización específica, dicha modificación adicional incluye la introducción de una construcción de ADN de diseño que codifica y

expresa de modo inducible una molécula de ARN de interferencia (ARNi) que inhibe específicamente la síntesis de una enzima de la vía de síntesis del almidón, por ejemplo, almidón sintasa, glucosa-1-fosfato adenililtransferasa, glucosa fosfato isomerasa y/o fosfoglucomutasa para la producción fotobiológica potenciada de butanol.

5 En otra realización, una planta, un tejido o una célula o células vegetales de diseño que producen butanol de modo fotosintético se han modificado aún más para que contengan otro conjunto de genes de diseño que facilitan la degradación del almidón y la glicólisis en el estroma. Estos genes de diseño adicionales incluyen, por ejemplo, genes que codifican la amilasa, la almidón fosforilasa, la hexoquinasa, la fosfoglucomutasa, y la glucosa fosfato isomerasa.

10 En otra realización, una vía o vías de producción fotobiológica de butanol se distribuyen en partes en el cloroplasto y en el citoplasma. La distribución de las enzimas de la vía de producción de butanol de diseño entre el cloroplasto y el citoplasma se controla mediante el uso y/o la delección de las secuencias de péptidos de tránsito en las construcciones de ADN de diseño.

15 En otra realización, una vía o vías de producción fotobiológica de butanol se distribuyen totalmente en el citoplasma, como es el caso de las oxifotobacterias (algas verdeazuladas) de diseño, que incluyen cianobacterias de diseño y oxiclolorobacterias de diseño.

20 Esta invención también proporciona una tecnología de producción fotobiológica de butanol con protección de bioseguridad basada en plantas transgénicas, algas, algas verdeazuladas (cianobacterias y oxiclolorobacterias) o células vegetales transgénicas de diseño controlables por medio de la división celular. Los organismos fotosintéticos de diseño controlables por medio de la división celular contienen dos funciones clave: un mecanismo o mecanismos de bioseguridad de diseño y una vía o vías de producción de biocombustible de diseño. La característica o características de bioseguridad de diseño son conferidas por una serie de mecanismos que incluyen: (1) la inserción inducible de canales de protones de diseño en la membrana citoplásmica para inutilizar permanentemente cualquier capacidad de división celular y/o apareamiento, (2) la aplicación selectiva de una proteína reguladora del ciclo de división celular de diseño o ARN de interferencia (ARNi) para inhibir permanentemente el ciclo de división celular y preferiblemente mantener la célula en la fase G₁ o el estado G₀, y (3) el uso innovador de un organismo fotosintético hospedante que requiere una alta cantidad de CO₂ para la expresión de la vía o vías de producción de biocombustible de diseño. La tecnología de control de la división celular de diseño puede ayudar a asegurar la bioseguridad cuando se emplean los organismos de diseño para la producción fotosintética de biocombustible.

30 La presente invención proporciona además un proceso para utilizar un organismo fotosintético de diseño (tal como una cianobacteria o alga de diseño), en combinación con un sistema de reactor fotobiológico y un proceso de separación/recolección de butanol para la producción fotobiológica de butanol y O₂ directamente a partir de CO₂ y H₂O empleando la luz solar. Pueden emplearse fuentes industriales de CO₂ y/o CO₂ atmosférico del entorno en el proceso de producción fotobiológica de butanol.

Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 presenta vías de producción de butanol de diseño que se bifurcan del ciclo de Calvin que emplean el poder reductor (NADPH) y la energía (ATP) adquiridos de la disociación fotosintética del agua y el proceso de transporte de electrones acoplado a un gradiente de protones para reducir el dióxido de carbono (CO₂) a butanol CH₃CH₂CH₂CH₂OH con una serie de reacciones enzimáticas.

La figura 2A presenta una construcción de ADN para un gen o genes de la vía de producción de butanol de diseño.

40 La figura 2B presenta una construcción de ADN para un gen de diseño de conversión de NADPH/NADH para la interconversión de NADPH/NADH.

La figura 2C presenta una construcción de ADN para un gen de un inhibidor o inhibidores de la síntesis de ARNi del glucógeno/almidón de diseño.

45 La figura 2D presenta una construcción de ADN para un gen o genes de la glicólisis de degradación del almidón de diseño.

La figura 2E presenta una construcción de ADN para un gen o genes de la vía de producción de butanol de diseño para la expresión citosólica.

La figura 2F presenta una construcción de ADN para un gen o genes de la vía de producción de butanol de diseño con dos sitios de recombinación para la transformación genética integradora en oxifotobacterias.

50 La figura 2G presenta una construcción de ADN para un gen o genes de control de la bioseguridad de diseño.

La figura 2H presenta una construcción de ADN para un gen o genes del canal de protones de diseño.

La figura 3A ilustra un organismo de diseño controlable por medio de la división celular que contiene dos funciones clave: un mecanismo o mecanismos de bioseguridad de diseño y una vía o vías de producción de biocombustible de

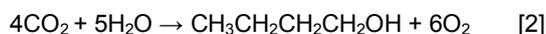
diseño.

La figura 3B ilustra un organismo de diseño controlable por medio de la división celular para la producción fotobiológica de butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) con un mecanismo o mecanismos de bioseguridad de diseño.

- 5 La figura 3C ilustra un organismo de diseño controlable por medio de la división celular para la producción fotobiológica con protección de bioseguridad de otros biocombustibles, tales como etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O).

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención se dirige a una tecnología de producción fotobiológica de butanol basada en organismos fotosintéticos de diseño, tales como plantas, algas y oxifotobacterias o células vegetales transgénicas de diseño. Las plantas, algas y células vegetales de diseño se crean empleando técnicas de ingeniería genética, de modo que se domestica el mecanismo de regulación de la fotosíntesis endógeno, y el poder reductor (NADPH) y la energía (ATP) adquiridos de la disociación fotosintética del agua y el proceso de transporte de electrones acoplado a un gradiente de protones pueden utilizarse para la síntesis inmediata de butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) directamente a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) según el siguiente proceso de reacción:



20 Los métodos de producción fotobiológica de butanol de la presente invención eliminan completamente el problema de la recalcitrancia lignocelulósica sorteando el problema de cuello de botella de la tecnología de la biomasa. Tal como se muestra en la figura 1, el proceso fotosintético en un organismo de diseño emplea de modo eficaz el poder reductor (NADPH) y la energía (ATP) adquiridos de la disociación fotosintética del agua y el proceso de transporte de electrones acoplado a un gradiente de protones para la síntesis inmediata de butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) directamente a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) sin drenaje hacia otra vía para la síntesis de materiales lignocelulósicos no deseados que son muy duros y, a menudo, ineficaces para su uso por la industria de las biorrefinerías. Esta estrategia también es diferente del proceso de "producción de butanol a partir del almidón de maíz" existente. Según esta invención, puede producirse directamente butanol a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) sin tener que atravesar muchas etapas consumidoras de energía, etapas que debe atravesar el proceso de producción etanol a partir de almidón de maíz, que incluyen el cultivo de maíz, la recolección del grano de maíz, el procesamiento del almidón del grano de maíz, y la fermentación del almidón al azúcar al butanol. Como resultado, se espera que la tecnología de producción fotosintética de butanol de la presente invención tenga una eficacia de conversión de energía solar a butanol mucho mayor (más de 10 veces mayor) que la tecnología actual. Suponiendo una eficacia de conversión de energía solar del 10% para el proceso de producción fotosintética de butanol propuesto, la máxima productividad teórica (rendimiento) puede ser de aproximadamente 72.700 kg de butanol por acre (4046,86 m²) por año, lo cual puede mantener a aproximadamente 70 coches (por año por acre (4046,86 m²)). Por tanto, esta invención puede ofrecer a la sociedad una capacidad significativa que ayude a asegurar la seguridad energética. La presente invención también puede ayudar a proteger el entorno del planeta frente a la acumulación peligrosa de CO_2 en la atmósfera, ya que los presentes métodos convierten el CO_2 directamente en energía de butanol limpia.

40 Una característica fundamental de la presente metodología es la utilización de una planta (por ejemplo, un alga o una oxifotobacteria) o células vegetales, la introducción en la planta o las células vegetales de moléculas de ácidos nucleicos que codifican un conjunto de enzimas que pueden actuar sobre un producto intermedio del ciclo de Calvin, y convertir el producto intermedio inmediatamente en butanol, tal como se ilustra en la figura 1, en lugar de que la vía fotosintética de tipo salvaje produzca, como productos finales, almidón y otros materiales celulares complejos (biomasa). Por consiguiente, la presente invención proporciona, entre otras cuestiones, métodos para producir butanol basados en una planta de diseño (tal como un alga de diseño o una oxifotobacteria de diseño), un tejido vegetal de diseño o células vegetales de diseño, construcciones de ADN que codifican genes de una vía de producción de butanol de diseño, así como las algas de diseño, las oxifotobacterias de diseño (que incluyen cianobacterias de diseño), las plantas de diseño, los tejidos vegetales de diseño, y las células vegetales de diseño creadas. Los diversos aspectos de la presente invención se describen con más detalle a continuación.

Organismos fotosintéticos hospedantes

50 Según la presente invención, puede crearse un organismo o célula de diseño para la producción fotosintética de butanol de la invención empleando como hospedante cualquier planta (que incluye algas y oxifotobacterias), tejido vegetal o células vegetales que tengan capacidad fotosintética, es decir, un aparato fotosintético activo y una vía enzimática que capture la energía de la luz a través de la fotosíntesis, empleando esta energía para convertir sustancias inorgánicas en materia orgánica. Preferiblemente, el organismo hospedante debe tener una tasa de fijación fotosintética de CO_2 adecuada, por ejemplo, para mantener la producción fotosintética de butanol a partir de CO_2 y H_2O al menos a aproximadamente 1.450 kg de butanol por acre (4046,86 m²) por año, más preferiblemente a 7.270 kg de butanol por acre (4046,86 m²) por año, o aún más preferiblemente a 72.700 kg de butanol por acre (4046,86 m²) por año.

En una realización preferida, se utiliza una planta acuática para crear una planta de diseño. Las plantas acuáticas, también denominadas plantas hidrófitas, son plantas que viven en entornos acuáticos o sobre entornos acuáticos, tales como en el agua (que incluye sobre o debajo de la superficie del agua) o en un terreno permanentemente saturado. Tal como se emplea en la presente, las plantas acuáticas o algas incluyen, por ejemplo, algas verdeazuladas (cianobacterias y oxiclrobacterias), hierbas acuáticas sumergidas (*Hydrilla verticillata*, *Elodea densa*, *Hippuris vulgaris*, *Aponogeton boivinianus*, *Aponogeton rigidifolius*, *Aponogeton longiplumulosus*, *Didiplis diandra*, *Vesicularia dubyana*, *Hygrophilia augustifolia*, *Micranthemum umbrosum*, *Eichhornia azurea*, *Saururus cernuus*, *Cryptocoryne lingua*, *Hydrotriche hottoniflora*, *Eustralis stellata*, *Vallisneria rubra*, *Hygrophila salicifolia*, *Cyperus helferi*, *Cryptocoryne petchii*, *Vallisneria americana*, *Vallisneria torta*, *Hydrotriche hottoniflora*, *Crassula helmsii*, *Limnophila sessiliflora*, *Potamogeton perfoliatus*, *Rotala wallichii*, *Cryptocoryne becketii*, *Blyxa aubertii*, *Hygrophila difformis*), lentejas de agua (*Spirodela polyrrhiza*, *Wolffia globosa*, *Lemna trisulca*, *Lemna gibba*, *Lemna minor*, *Landoltia punctata*), lechugilla de agua (*Pistia stratiotes*), ranúnculos (*Ranunculus*), castaña de agua (*Trapa natans* y *Trapa bicornis*), lirios de agua (*Nymphaea lotus*, *Nymphaeaceae* y *Nelumbonaceae*), jacintos de agua (*Eichhornia crassipes*), *Bolbitis heudelotii*, *Cabomba* sp., praderas marinas (*Heteranthera zosterifolia*, *Posidoniaceae*, *Zosteraceae*, *Hydrocharitaceae*, y *Cymodoceaceae*). El butanol producido a partir de una planta acuática puede difundirse hacia el agua, permitiendo el crecimiento normal de las plantas y una producción más robusta de butanol a partir de las plantas. Los cultivos líquidos de tejidos de plantas acuáticas (que incluyen, pero no se limitan a algas multicelulares) o células (que incluyen, pero no se limitan a algas unicelulares) también son muy preferidos para su uso, puesto que las moléculas de butanol producidas a partir de una vía de producción de butanol de diseño pueden difundir con facilidad fuera de las células o los tejidos hacia el medio acuoso líquido, en donde pueden actuar como un gran depósito para almacenar el producto de butanol que posteriormente puede recolectarse mediante filtración y/o técnicas de destilación/evaporación.

Aunque las plantas acuáticas o sus células son los organismos hospedantes preferidos para su uso en los métodos de la presente invención, también pueden emplearse tejidos y células de plantas no acuáticas, que sean fotosintéticos y que puedan cultivarse en un medio de cultivo líquido, para crear tejido o células de diseño para la producción fotosintética de butanol. Por ejemplo, también pueden seleccionarse los siguientes tejidos o células de plantas no acuáticas para su uso como organismo hospedante en esta invención: cultivos de tejido de brotes fotoautótrofos de la manzana de madera *Feronia limonia*, cultivos de callos clorofilosos de la planta del maíz *Zea mays*, cultivos de raíces verdes de especies de *Asteraceae* y *Solanaceae*, cultivos de tejidos de parénquima del tallo de la caña de azúcar, cultivos de tejidos del briofito *Physcomitrella patens*, cultivos en suspensión de células fotosintéticas de la planta de soja (*Glycine max*), cultivos fotoautótrofos y fotomixótrofos de células del tabaco verde (*Nicotiana tabacum* L.), cultivos en suspensión de células de *Gisekia pharmaceoides* (una planta C₄), líneas cultivadas en suspensión fotosintéticas de *Amaranthus powellii* Wats., *Datura innoxia* Mill., *Gossypium hirsutum* L., y el híbrido de fusión *Nicotiana tabacum* × *Nicotiana glutinosa* L.

Un “medio líquido” significa agua líquida más cantidades relativamente pequeñas de nutrientes inorgánicos (por ejemplo, N, P, K etc., habitualmente en sus formas salinas) para cultivos fotoautótrofos; y, a veces, también incluye ciertos sustratos orgánicos (por ejemplo, sacarosa, glucosa, o acetato) para cultivos fotomixótrofos y/o fotoheterótrofos.

En una realización especialmente preferida, la planta utilizada en el método de producción de butanol de la presente invención es un alga o un alga verdeazulada. El uso de algas y/o algas verdeazuladas tiene varias ventajas. Pueden cultivarse en un estanque abierto en grandes cantidades y a bajo coste. La recolección y la purificación del butanol de la fase acuosa también pueden realizarse con facilidad mediante destilación/evaporación o separación con membrana.

Las algas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen algas unicelulares y algas multicelulares. Las algas multicelulares que pueden seleccionarse para su uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a algas marinas, tales como *Ulva latissima* (lechuga de mar), *Ascophyllum nodosum*, *Codium fragile*, *Fucus vesiculosus*, *Euclima denticulatum*, *Gracilaria gracilis*, *Hydrodictyon reticulatum*, *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida*, *Saccharina japonica*, *Porphyra yezoensis*, y *Porphyra tenera*. Las algas adecuadas también pueden seleccionarse de las siguientes divisiones de algas: algas verdes (*Chlorophyta*), algas rojas (*Rhodophyta*), algas marrones (*Phaeophyta*), diatomeas (*Bacillariophyta*), y algas verdeazuladas (*Oxyphotobacteria* que incluye *Cyanophyta* y *Prochlorophyta*). Los órdenes adecuados de algas verdes incluyen Ulvales, Ulotrichales, Volvocales, Chlorellales, Schizogoniales, Oedogoniales, Zygnematales, Cladophorales, Siphonales, y Dasycladales. Los géneros adecuados de *Rhodophyta* son *Porphyra*, *Chondrus*, *Cyanidioschyzon*, *Porphyridium*, *Gracilaria*, *Kappaphycus*, *Gelidium* y *Agardhiella*. Los géneros adecuados de *Phaeophyta* son *Laminaria*, *Undaria*, *Macrocystis*, *Sargassum* y *Dictyosiphon*. Los géneros adecuados de *Cyanophyta* (también conocidas como cianobacterias) incluyen, pero no se limitan a *Phoridium*, *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Oscillatoria*, y *Anabaena*. Los géneros adecuados de *Prochlorophyta* (también conocidas como oxiclrobacterias) incluyen, pero no se limitan a *Prochloron*, *Prochlorothrix*, and *Prochlorococcus*. Los géneros adecuados de *Bacillariophyta* son *Cyclotella*, *Cylindrotheca*, *Navicula*, *Thalassiosira*, y *Phaeodactylum*. Las especies preferidas de algas para su uso en la presente invención incluyen *Chlamydomonas reinhardtii*, *Platymonas subcordiformis*, *Chlorella fusca*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella* spp., *Dunaliella salina*, *Dunaliella viridis*, *Dunaliella bardowil*, *Haematococcus pluvialis*, *Parachlorella kessleri*, *Betaphycus gelatinum*, *Chondrus crispus*, *Cyanidioschyzon merolae*, *Cyanidium caldarium*, *Galdieria sulphuraria*, *Gelidiella acerosa*, *Gracilaria changii*, *Kappaphycus alvarezii*, *Porphyra miniata*,

5 *Ostreococcus tauri*, *Porphyra yezoensis*, *Porphyridium* sp., *Palmaria palmata*, *Gracilaria* spp., *Isochrysis galbana*, *Kappaphycus* spp., *Laminaria japonica*, *Laminaria* spp., *Monostroma* spp., *Nannochloropsis oculata*, *Porphyra* spp., *Porphyridium* spp., *Undaria pinnatifida*, *Ulva lactuca*, *Ulva* spp., *Undaria* spp., *Phaeodactylum Tricornutum*, *Navicula saprophila*, *Cryptothecodinium cohnii*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Cyclotella cryptica*, *Euglena gracilis*, *Amphidinium* sp., *Symbiodinium microadriaticum*, *Macrocystis pyrifera*, *Ankistrodesmus braunii*, y *Scenedesmus obliquus*.

10 Las especies preferidas de algas verdeazuladas (oxifotobacterias, que incluyen cianobacterias y oxiclolorobacterias) para su uso en la presente invención incluyen *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Nostoc* sp. PCC 7120, *Synechococcus elongatus* PCC 6301, *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942, *Synechococcus* sp. cepa PCC 7002, *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803, *Prochlorococcus marinus* MED4, *Prochlorococcus marinus* MIT 9313, *Prochlorococcus marinus* NATL1A, *Prochlorococcus* SS120, *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*), *Spirulina pacifica*, *Lyngbya majuscula*, *Anabaena* sp., *Synechocystis* sp., *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus* (MC-A), *Trichodesmium* sp., *Richelia intracellularis*, *Synechococcus* WH7803, *Synechococcus* WH8102, *Nostoc punctiforme*, *Synechococcus* sp. cepa PCC 7943, *Synechocystis* PCC 6714 mutante deficiente en ficocianina PD-1, *Cyanothece* cepa 51142, *Cyanothece* sp. CCY0110, *Oscillatoria limosa*, *Lyngbya majuscula*, *Symploca muscorum*, *Gloeobacter violaceus*, *Prochloron didemni*, *Prochlorothrix hollandica*, *Synechococcus* (MC-A), *Trichodesmium* sp., *Richelia intracellularis*, *Prochlorococcus marinus*, *Prochlorococcus* SS120, *Synechococcus* WH8102, *Lyngbya majuscula*, *Symploca muscorum*, *Synechococcus bigranulatus*, *cryophilic Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Nostoc* sp.-1, *Calothrix parietina*, *thermophilic Synechococcus bigranulatus*, *Synechococcus lividus*, *thermophilic Mastigocladus laminosus*, *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912, *Synechococcus vulcanus*, *Synechococcus* sp. cepa MA4, *Synechococcus* sp. cepa MA19, y *Thermosynechococcus elongatus*.

25 La selección adecuada de organismos fotosintéticos hospedantes según sus trasfondos genéticos y ciertas características especiales también resulta beneficiosa. Por ejemplo, un alga de diseño que produce butanol de modo fotosintético creada a partir de algas criófilas (psicrófilas) que puede crecer sobre la nieve y el hielo y/o a partir de cepas hospedantes tolerantes al frío, tal como *Chlamydomonas* cepa tolerante al frío CCMG1619, que se ha caracterizado como capaz de realizar la disociación fotosintética del agua a una temperatura tan fría como de 4 °C (Lee, Blankinship y Greenbaum (1995), "Temperature effect on production of hydrogen and oxygen by *Chlamydomonas* cold strain CCMP1619 and wild type 137c," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 51/52:379-386), permite la producción fotobiológica de butanol incluso en las estaciones frías o en regiones frías, tales como Canadá. Por otra parte, un alga de diseño creada a partir de un organismo fotosintético termófilo/termotolerante, tal como las algas termófilas *Cyanidium caldarium* y *Galdieria sulphuraria* y/o cianobacterias termófilas (algas verdeazuladas), tales como *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 y *Synechococcus bigranulatus*, puede permitir que la práctica de esta invención se extienda sin problemas hacia las estaciones cálidas o en áreas cálidas, tales como México y la región sudoeste de EEUU, que incluye Nevada, California, Arizona, Nuevo México y Texas, en donde la climatología a menudo puede ser calurosa. Además, un alga de diseño que produce butanol de modo fotosintético creada a partir de un alga marina, tal como *Platymonas subcordiformis*, permite practicar esta invención con agua de mar, mientras que un alga de diseño creada a partir de un alga de agua dulce, tal como *Chlamydomonas reinhardtii*, puede emplear agua dulce. Otras características opcionales de un alga de diseño que produce butanol de modo fotosintético incluyen los beneficios de un menor tamaño del complejo antena de la clorofila, que ha demostrado proporcionar una mayor productividad fotosintética (Lee, Mets, y Greenbaum (2002), "Improvement of photosynthetic efficiency at high light intensity through reduction of chlorophyll antenna size," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98-100: 37-48) y una tolerancia al butanol que permite una producción fotosintética de butanol más robusta y eficaz a partir de CO₂ y H₂O. Mediante el uso de un mutante deficiente en ficocianina de *Synechocystis* PCC 6714, se ha demostrado experimentalmente que la fotoinhibición también puede reducirse reduciendo el contenido en pigmentos recolectores de luz (Nakajima, Tsuzuki, y Ueda (1999), "Reduced photoinhibition of a phycocyanin-deficient mutant of *Synechocystis* PCC 6714", *Journal of Applied Phycology*, 10: 447-452). Estas características opcionales pueden incorporarse en un alga de diseño, por ejemplo, mediante el uso de un mutante tolerante al butanol y/o deficiente en el complejo antena de la clorofila (por ejemplo, *Chlamydomonas reinhardtii* cepa DS521) como organismo hospedante, para la transformación de genes con los genes de la vía de producción de butanol de diseño. Por tanto, en una de las diversas realizaciones, se selecciona un alga hospedante del grupo que consiste en algas verdes, algas rojas, algas marrones, algas verdeazuladas (oxifotobacterias, que incluyen cianobacterias y proclorofitos), diatomeas, algas del medio marino, algas de agua dulce, algas unicelulares, algas multicelulares, algas marinas, cepas de algas tolerantes al frío, cepas de algas tolerantes al calor, mutantes deficientes en el pigmento del complejo antena recolector de luz, cepas de algas tolerantes al butanol, y sus combinaciones.

55 Creación de una vía de producción de butanol de diseño en un hospedante

Selección de las enzimas de diseño apropiadas

60 Una de las características clave de la presente invención es la creación de una vía de producción de butanol de diseño para domesticar y trabajar con los mecanismos fotosintéticos naturales para lograr la síntesis deseable de butanol directamente a partir de CO₂ y H₂O. Los mecanismos fotosintéticos naturales incluyen (1) el proceso de disociación fotosintética del agua y el transporte de electrones acoplado a un gradiente de protones a través de la membrana tilacoide, que produce el poder reductor (NADPH) y la energía (ATP), y (2) el ciclo de Calvin, que reduce el CO₂ mediante el consumo del poder reductor (NADPH) y la energía (ATP).

Según la presente invención, se emplea una serie de enzimas para crear una vía de producción de butanol de diseño que parte de un producto intermedio del ciclo de Calvin y convierte el producto intermedio en butanol, tal como se ilustra en la figura 1. Una “enzima de la vía de producción de butanol de diseño” se define en la presente como una enzima que actúa como catalizador para al menos una de las etapas en una vía de producción de butanol de diseño. Según la presente invención, puede utilizarse una serie de productos intermedios del ciclo de Calvin para crear una o más vías de producción de butanol de diseño; y las enzimas necesarias para una vía de producción de butanol de diseño se seleccionan dependiendo del producto intermedio del ciclo de Calvin del cual se bifurca la vía de producción de butanol de diseño desde el ciclo de Calvin.

En un ejemplo, se crea una vía de diseño que parte del gliceraldehído-3-fosfato y lo convierte en butanol empleando, por ejemplo, un conjunto de enzimas que consiste, tal como como se muestra con las marcas numéricas 01-12 en la figura 1, en gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 01, fosfoglicerato quinasa 02, fosfoglicerato mutasa 03, enolasa 04, piruvato quinasa 05, piruvato-ferredoxina oxidoreductasa 06, tiolasa 07, 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa 08, crotonasa 09, butiril-CoA deshidrogenasa 10, butiraldehído deshidrogenasa 11, y butanol deshidrogenasa 12. En esta vía de diseño que se bifurca desde el gliceraldehído-3-fosfato, para la conversión de dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato en butanol se generan dos moléculas de NADH a partir de NAD⁺ en la etapa desde el gliceraldehído-3-fosfato hasta el 1,3-difosfoglicerato catalizada por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 01; mientras, dos moléculas de NADH son convertidas en NAD⁺: una en la etapa catalizada por la 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa 08 para reducir la acetoacetyl-CoA a 3-hidroxi-butiril-CoA, y la otra en la etapa catalizada por la butiril-CoA deshidrogenasa 10 para reducir la crotonil-CoA a butiril-CoA. Por consiguiente, en esta vía de diseño que se bifurca desde el gliceraldehído-3-fosfato (01-12), el número de moléculas de NADH consumidas se equilibra con el número de moléculas de NADH generadas. Además, tanto la etapa catalizada por la butiraldehído deshidrogenasa 11 (para reducir la butiril-CoA a butiraldehído) como la etapa terminal catalizada por la butanol deshidrogenasa 12 (para reducir el butiraldehído a butanol) pueden utilizar NADPH, que puede ser regenerado por la disociación fotosintética del agua y el proceso de transporte de electrones acoplado a un gradiente de protones. Por tanto, esta vía de producción de butanol de diseño que se bifurca desde el gliceraldehído-3-fosfato puede funcionar de modo continuo.

En otro ejemplo, se crea una vía de diseño que parte del producto intermedio 3-fosfoglicerato y lo convierte en butanol empleando, por ejemplo, un conjunto de enzimas que consiste (tal como como se muestra con las marcas numéricas 03-12 en la figura 1) en fosfoglicerato mutasa 03, enolasa 04, piruvato quinasa 05, piruvato-ferredoxina oxidoreductasa 06, tiolasa 07, 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa 08, crotonasa 09, butiril-CoA deshidrogenasa 10, butiraldehído deshidrogenasa 11, y butanol deshidrogenasa 12. Merece la pena advertir que las últimas diez enzimas (03-12) de la vía de producción de butanol de diseño que se bifurca desde el gliceraldehído-3-fosfato (01-12) son idénticas a las utilizadas en la vía de diseño que se bifurca desde el 3-fosfoglicerato (03-12). En otras palabras, las enzimas de diseño (01-12) de la vía que se bifurca desde el gliceraldehído-3-fosfato permiten la producción de butanol desde el punto del 3-fosfoglicerato y desde el punto del gliceraldehído-3-fosfato del ciclo de Calvin. Sin embargo, estas dos vías tienen características diferentes. A diferencia de la vía de producción de butanol que se bifurca del gliceraldehído-3-fosfato, la vía que se bifurca del 3-fosfoglicerato, que está compuesta por las actividades de tan solo diez enzimas (03-12), no puede generar en sí misma el NADH requerido para su uso en dos lugares: uno en la etapa catalizada por la 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa 08 para reducir la acetoacetyl-CoA a 3-hidroxi-butiril-CoA, y el otro en la etapa catalizada por la butiril-CoA deshidrogenasa 10 para reducir la crotonil-CoA a butiril-CoA. Es decir, si (o cuando) se emplea una 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa y/o una butiril-CoA deshidrogenasa que solo pueden emplear estrictamente NADH, pero no NADPH, esto requiere un suministro de NADH para que la vía que se bifurca desde el 3-fosfoglicerato (03-12) pueda funcionar. Por consiguiente, para que la vía de producción de butanol que se bifurca desde el 3-fosfoglicerato pueda funcionar, es importante utilizar una 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa 08 y una butiril-CoA deshidrogenasa 10 que puedan emplear NADPH, que puede ser suministrado por el proceso de transporte de electrones fotodirigido. Por tanto, una práctica preferida es utilizar una 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa y una butiril-CoA deshidrogenasa que puedan emplear NADPH, o ambos NADPH y NADH (es decir, NAD(P)H) para esta vía de producción de butanol de diseño que se bifurca desde el 3-fosfoglicerato (03-12 en la figura 1). Como alternativa, cuando se emplea una 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa y una butiril-CoA deshidrogenasa que solo pueden emplear NADH, en este caso es preferible emplear otra realización que pueda conferir un mecanismo de conversión de NADPH/NADH (para suministrar el NADH convirtiendo NADPH en NADH, véanse más detalles a continuación en el texto) en el organismo de diseño para facilitar la producción fotosintética de butanol a través de la vía que se bifurca del 3-fosfoglicerato de diseño.

En otro ejemplo, se crea una vía de diseño que parte de la fructosa-1,6-difosfato y la convierte en butanol empleando (tal como como se muestra con las marcas numéricas 20-33 en la figura 1), un conjunto de enzimas que consiste en aldolasa 20, triosa fosfato isomerasa 21, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 22, fosfoglicerato quinasa 23, fosfoglicerato mutasa 24, enolasa 25, piruvato quinasa 26, piruvato-NADP⁺ oxidoreductasa (o piruvato-ferredoxina oxidoreductasa) 27, tiolasa 28, 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa 29, crotonasa 30, butiril-CoA deshidrogenasa 31, butiraldehído deshidrogenasa 32, y butanol deshidrogenasa 33, siendo la aldolasa 20 y la triosa fosfato isomerasa 21 las únicas dos enzimas adicionales con relación a la vía de diseño que se bifurca desde el gliceraldehído-3-fosfato. El uso de una piruvato-NADP⁺ oxidoreductasa 27 (en lugar de piruvato-ferredoxina oxidoreductasa) para catalizar la conversión de una molécula de piruvato en acetyl-CoA permite la producción de un NADPH, que puede utilizarse en alguna otra etapa de la vía de producción de butanol. La adición de otra enzima

más al organismo de diseño, la fosfofructosa quinasa 19, permite la creación otra vía de diseño que se bifurca desde el punto de la fructosa-6-fosfato del ciclo de Calvin para la producción de butanol. Al igual que la vía de producción de butanol que se bifurca del gliceraldehído-3-fosfato, tanto la vía que se bifurca de la fructosa-1,6-difosfato (20-33) como la vía que se bifurca de la fructosa-6-fosfato (19-33) pueden, en sí mismas, generar NADH para su uso en la vía en la etapa catalizada por la 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa 29 para reducir la acetoacetil-CoA a 3-hidroxiacetil-CoA, y en la etapa catalizada por la butiril-CoA deshidrogenasa 31 para reducir la crotonil-CoA a butiril-CoA. En cada una de estas vías de producción de butanol de diseño, el número de moléculas de NADH consumidas se equilibra con el número de moléculas de NADH generadas; y tanto la butiraldehído deshidrogenasa 32 (que cataliza la etapa que reduce la butiril-CoA a butiraldehído) como la butanol deshidrogenasa 33 (que cataliza la etapa terminal para reducir el butiraldehído a butanol) pueden utilizar NADPH, que puede ser regenerado por la disociación fotosintética del agua y el proceso de transporte de electrones acoplado a un gradiente de protones. Por tanto, estas vías de producción de butanol de diseño pueden funcionar de modo continuo.

La tabla 1 lista ejemplos de las enzimas, que incluyen las identificadas anteriormente, para la construcción de las vías de producción de butanol de diseño. A lo largo de esta memoria descriptiva, cuando se menciona una enzima, tal como, por ejemplo, cualquiera de las enzimas listadas en la tabla 1, se incluyen sus isozimas, análogos funcionales y enzimas modificadas de diseño, y sus combinaciones. Estas enzimas pueden seleccionarse para su uso para la construcción de las vías de producción de butanol de diseño (tales como las ilustradas en la figura 1). Las "isozimas o análogos funcionales" se refieren a ciertas enzimas que tienen la misma función catalítica pero que pueden o no tener exactamente las mismas estructuras de proteínas. La característica más fundamental de una enzima es su sitio activo, que cataliza la reacción enzimática. Por tanto, ciertos fragmentos o subunidades de la proteína de la enzima que contienen dicho sitio catalítico activo también pueden seleccionarse para su uso en esta invención. Por diversas razones, algunas de las enzimas naturales contienen no solo la estructura catalítica fundamental, sino también otros componentes estructurales que puede o no resultar deseables para una aplicación concreta. Empleando técnicas de diseño molecular asistido por ordenador, es posible seleccionar la estructura o estructuras catalíticas fundamentales para su uso para la construcción de una construcción de ADN de diseño que codifica una enzima de diseño deseada. Por tanto, en una de las diversas realizaciones, se crea un gen de una enzima de diseño mediante síntesis artificial de una construcción de ADN según un diseño de secuencias moleculares asistido por ordenador. Empleando la estrategia de la biología sintética asistida por ordenador, cualquier secuencia de ADN (y, por tanto, la estructura de su proteína) de una enzima de diseño puede modificarse selectivamente para lograr resultados más deseables por medio del diseño. Por tanto, las expresiones "secuencias modificadas de diseño" y "enzimas modificadas de diseño" se definen en la presente como secuencias de ADN y las proteínas de las enzimas que se modifican por medio del diseño molecular asistido por ordenador. Por ejemplo, cuando se diseña una construcción de ADN para una enzima de diseño dirigida al cloroplasto a partir de la secuencia de una enzima mitocondrial, una práctica preferida consiste en modificar algunas de las estructuras de las proteínas, por ejemplo, cortando selectivamente cierto componente o componentes estructurales, tal como la secuencia de su péptido de tránsito mitocondrial que no es adecuada para la aplicación concreta y/o añadiendo ciertas estructuras de péptidos, tales como una secuencia de péptido de tránsito del cloroplasto exógena (por ejemplo, un péptido de tránsito de la subunidad pequeña de rubisco de 135 pb (RbcS2)), que son necesarias para conferir la capacidad en la inserción dirigida al cloroplasto de la proteína de diseño. Por tanto, una de las diversas realizaciones emplea de modo flexible las enzimas, sus isozimas, análogos funcionales, enzimas modificadas de diseño y/o sus combinaciones en la construcción de la vía o vías de producción de butanol de diseño.

Tal como se muestra en la tabla 1, muchos genes de las enzimas identificadas anteriormente se han clonado y/o secuenciado a partir de diversos organismos. Pueden utilizarse datos de secuencias de ADN genómico y/o ARNm para diseñar y sintetizar las construcciones de ADN de diseño para la transformación de un alga, oxifotobacteria, planta, tejido o células vegetales hospedantes para crear un organismo de diseño para la producción fotobiológica de butanol (figura 1). Sin embargo, debido a las posibles variaciones que, a menudo, están asociadas con diversos organismos fuente y compartimentos celulares con respecto a un organismo hospedante específico y el entorno de sus cloroplastos/tilacoide, en los que la vía o vías de producción de butanol se han de diseño para que trabajen con el ciclo de Calvin, a menudo son necesarios ciertos trabajos de ingeniería molecular en el diseño de la construcción de ADN, que incluyen la optimización de la utilización de codones y la modificación de secuencias, para que una construcción de ADN de diseño (figura 2) funcione bien. Por ejemplo, en la creación de un alga eucariota de diseño que produce butanol, si las secuencias fuente proceden de enzimas citosólicas (secuencias), puede añadirse una secuencia funcional de transporte dirigido al cloroplasto para proporcionar la capacidad para que una enzima codificada por un gen poco clara de diseño se inserte en el cloroplasto de un hospedante para conferir su función para una vía de producción de butanol de diseño. Además, para proporcionar una conmutación para una vía de producción de butanol de diseño, también es importante incluir una secuencia de un promotor inducible funcional, tal como el promotor de un gen de hidrogenasa (Hyd1) o nitrato reductasa (Nia1), o el gen de nitrato reductasa (nirA) en ciertas construcciones de ADN de diseño, tal como se ilustra en la figura 2A, para controlar la expresión del gen o genes de diseño. Además, tal como se mencionó anteriormente, ciertos derivados funcionales o fragmentos de estas enzimas (secuencias), secuencias de péptidos de tránsito que se dirigen al cloroplasto, y secuencias de promotores inducibles también pueden seleccionarse para su uso completo, en parte o en combinaciones entre sí, para crear organismos de diseño según diversas realizaciones de esta invención. La técnica para crear y emplear los organismos de diseño se describe más a fondo a continuación.

ES 2 612 749 T3

La tabla 1 lista ejemplos de enzimas para la construcción de las vías de producción de butanol de diseño.

Enzima	Fuente (organismo)	GenBank n.º de registro, ID JGI de la proteína, o cita
Butanol deshidrogenasa	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> ; <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ; <i>Trichomonas vaginalis</i> ; <i>Aeromonas hydrophila</i> ; <i>Clostridium beijerinckii</i> ; <i>Clostridium acetobutylicum</i>	GenBank: AB257439; AJ508920; AF112135; AF388671; AF157307; M96946, M96945
Butiraldehído deshidrogenasa	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	GenBank: AY251646
Butiril-CoA deshidrogenasa	<i>Clostridium beijerinckii</i> ; <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ; bacteria productora de butirato L2-50; <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	GenBank: AF494018; AB190764; DQ987697; Z92974
Crotonasa	<i>Clostridium beijerinckii</i> ; <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ; bacteria productora de butirato L2-50; <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	GenBank: AF494018; AB190764; DQ987697; Z92974
3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa	<i>Clostridium beijerinckii</i> ; <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ; <i>Ajellomyces capsulatus</i> ; <i>Aspergillus fumigatus</i> ; <i>Aspergillus clavatus</i> ; <i>Neosartorya fischeri</i> ; bacteria productora de butirato L2-50; <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>thermosaccharolyticum</i> ; <i>Thermoanaerobacterium</i>	GenBank: AF494018; AB190764; XM_001537366; XM_741533; XM_001274776; XM_001262361; DQ987697; BT001208; Z92974
Tiolasa	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ; bacteria productora de butirato L2-50; <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	GenBank: AB190764; DQ987697; Z92974
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	citósol de <i>Mesostigma viride</i> ; citósol de <i>Triticum aestivum</i> ; cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Botryotinia fuckeliana</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Zymomonas mobilis</i> ; <i>Karenia brevis</i> ; <i>Ajellomyces capsulatus</i> ; <i>Pichia stipitis</i> ; <i>Pichia guilliermondii</i> ; <i>Kluyveromyces marxianus</i> ; <i>Triticum aestivum</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Zea mays</i> citosólica	GenBank: DQ873404; EF592180; L27668; XM_001549497; J01324; M18802; EU078558; XM_001539393; XM_001386423; XM_001386568; XM_001485596; DQ681075; EF592180; NM_101214; U45857, ZMU45856, U45855
Fosfoglicerato quinasa	cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Plasmodium vivax</i> ; <i>Babesia bovis</i> ; <i>Botryotinia fuckeliana</i> ; <i>Monocercomonoides</i> sp.; <i>Lodderomyces elongisporus</i> ; <i>Pichia guilliermondii</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Helianthus annuus</i> ; <i>Oryza sativa</i> ; <i>Dictyostelium discoideum</i> ; <i>Euglena gracilis</i> ; <i>Chondrus crispus</i> ; <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ; <i>Solanum tuberosum</i>	GenBank: U14912, AF244144; XM_001614707; XM_001610679; XM_001548271; DQ665858; XM_001523843; XM_001484377; NM_179576; DQ835564; EF122488; AF316577; AY647236; AY029776; AF108452; AF073473
Fosfoglicerato mutasa	citoplasma de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Aspergillus fumigatus</i> ;	JGI Chlre2 proteína ID 161689, GenBank: AF268078; XM_747847;

ES 2 612 749 T3

(fosfogliceromutasa)	<i>Coccidioides immitis</i> ; <i>Leishmania braziliensis</i> ; <i>Ajellomyces capsulatus</i> ; <i>Monocercomonoides</i> sp.; <i>Aspergillus clavatus</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Zea mays</i>	XM_749597; XM_001248115; XM_001569263; XM_001539892; DQ665859; XM_001270940; NM_117020; M80912
Enolasa	citoplasma de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Leishmania mexicana</i> ; <i>Lodderomyces elongisporus</i> ; <i>Babesia bovis</i> ; <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ; <i>Pichia guilliermondii</i> ; <i>Spirotrichonympha leidy</i> ; <i>Oryza sativa</i> ; <i>Trimastix pyriformis</i> ; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ; <i>Davidiella tassiana</i> ; <i>Aspergillus oryzae</i> ; <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ; <i>Brassica napus</i> ; <i>Zea mays</i>	GenBank: X66412, P31683; AK222035; DQ221745; XM_001528071; XM_001611873; XM_001594215; XM_001483612; AB221057; EF122486; U09450; DQ845796; AB088633; U82438; D64113; U13799; AY307449; U17973
Piruvato quinasa	citoplasma de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Babesia bovis</i> ; <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ; <i>Trichomonas vaginalis</i> ; <i>Pichia guilliermondii</i> ; <i>Pichia stipitis</i> ; <i>Lodderomyces elongisporus</i> ; <i>Coccidioides immitis</i> ; <i>Trimastix pyriformis</i> ; <i>Glycine max</i> (soja)	JGI Chlre3 proteína ID 138105; GenBank: AK229638; AY949876, AY949890, AY949888; XM_001612087; XM_001594710; XM_001329865; XM_001487289; XM_001384591; XM_001528210; XM_001240868; DQ845797; L08632
Fosfofructosa quinasa	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Ajellomyces capsulatus</i> ; <i>Yarrowia lipolytica</i> ; <i>Pichia stipitis</i> ; <i>Dictyostelium discoideum</i> ; <i>Tetrahymena thermophila</i> ; <i>Trypanosoma brucei</i> ; <i>Plasmodium falciparum</i> ; <i>Spinacia oleracea</i>	JGI Chlre2 proteína ID 159495; GenBank: NM_001037043, NM_179694, NM_119066, NM_125551; XM_001537193; AY142710; XM_001382359, XM_001383014; XM_639070; XM_001017610; XM_838827; XM_001347929; DQ437575
Fructosa-difosfato aldolasa	cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; citoplasma de <i>Fragaria × ananassa</i> ; <i>Homo sapiens</i> ; <i>Babesia bovis</i> ; <i>Trichomonas vaginalis</i> ; <i>Pichia stipitis</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i>	GenBank: X69969; AF308587; NM_005165; XM_001609195; XM_001312327, XM_001312338; XM_001387466; NM_120057, NM_001036644
Triosa fosfato isomerasa	<i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ; <i>Chlorella pyrenoidosa</i> ; <i>Pichia guilliermondii</i> ; <i>Euglena intermedia</i> ; <i>Euglena longa</i> ; <i>Spinacia oleracea</i> ; <i>Solanum chacoense</i> ; <i>Hordeum vulgare</i> ; <i>Oryza sativa</i>	GenBank: NM_127687, AF247559; AY742323; XM_001587391; AB240149; XM_001485684; DQ459379; AY742325; L36387; AY438596; U83414; EF575877
Glucosa-1-fosfato adenililtransferasa	<i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Zea mays</i> ; <i>Chlamydia trachomatis</i> ; <i>Solanum tuberosum</i> (patata); <i>Shigella flexneri</i> ; <i>Lycopersicon esculentum</i>	GenBank: NM_127730, NM_124205, NM_121927, AY059862; EF694839, EF694838; AF087165; P55242; NP_709206; T07674
Almidón sintasa	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Phaseolus vulgaris</i> ; <i>Oryza sativa</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Colocasia esculenta</i> ; <i>Amaranthus cruentus</i> ; <i>Parachlorella kessleri</i> ; <i>Triticum aestivum</i> ; <i>Sorghum bicolor</i> ; <i>Astragalus membranaceus</i> ; <i>Perilla frutescens</i> ; <i>Zea mays</i> ; <i>Ipomoea</i>	GenBank: AF026422, AF026421, DQ019314, AF433156; AB293998; D16202, AB115917, AY299404; AF121673, AK226881; NM_101044; AY225862, AY142712; DQ178026; AB232549; Y16340; AF168786; AF097922; AF210699; AF019297;

ES 2 612 749 T3

	<i>batatas</i>	AF068834
Alfa-amilasa	células de alerurona de <i>Hordeum vulgare</i> ; <i>Trichomonas vaginalis</i> ; <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; gen de amilasa termoestable de <i>Dictyoglomus thermophilum</i>	GenBank: J04202; XM_001319100; EF143986; AY324649; NM_129551; X07896
Beta-amilasa	<i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Hordeum vulgare</i> ; <i>Musa acuminata</i>	GenBank: NM_113297; D21349; DQ166026
Almidón fosforilasa	raíz de cultivares híbridos de cítricos; cloroplasto de <i>Solanum tuberosum</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Triticum aestivum</i> ; <i>Ipomoea batatas</i>	Genbank: AY098895; P53535; NM_113857, NM_114564; AF275551; M64362
Fosfoglucomutasa	plástido de <i>Oryza sativa</i> ; <i>Ajellomyces capsulatus</i> ; <i>Pichia stipitis</i> ; <i>Lodderomyces elongisporus</i> ; <i>Aspergillus fumigatus</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Populus tomentosa</i> ; <i>Oryza sativa</i> ; <i>Zea mays</i>	GenBank: AC105932, AF455812; XM_001536436; XM_001383281; XM_001527445; XM_749345; NM_124561, NM_180508, AY128901; AY479974; AF455812; U89342, U89341
Glucosa fosfato (glucosa-6-fosfato) isomerasa	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Pichia stipitis</i> ; <i>Ajellomyces capsulatus</i> ; citosol de <i>Spinacia oleracea</i> ; citoplasma de <i>Oryza sativa</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Zea mays</i>	JGI Chhre3 proteína ID 135202; GenBank: M21696; XM_001385873; XM_001537043; T09154; P42862; NM_123638, NM_118595; U17225
Hexoquinasa (glucoquinasa)	<i>Ajellomyces capsulatus</i> ; <i>Pichia stipitis</i> ; <i>Pichia angusta</i> ; <i>Thermosynechococcus elongates</i> ; <i>Babesia bovis</i> ; <i>Solanum chacoense</i> ; <i>Oryza sativa</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i>	GenBank: XM_001541513; XM_001386652, AY278027; XM_001386035; NC_004113; XM_001608698; DQ177440; DQ116383; NM_112895
NADP(H) fosfatasa	<i>Methanococcus jannaschii</i>	The Journal Of Biological Chemistry, 280, (47):39200-39207 (2005)
NAD quinasa	<i>Babesia bovis</i> ; <i>Trichomonas vaginalis</i>	GenBank: XM_001609395; XM_001324239
Piruvato-NADP ⁺ oxidorreductasa	<i>Peranema trichophorum</i> ; <i>Euglena gracilis</i>	GenBank: EF114757; AB021127, AJ278425
Piruvato-ferredoxina oxidorreductasa	<i>Mastigamoeba balamuthi</i> ; <i>Desulfovibrio africanus</i> ; <i>Entamoeba histolytica</i> ; <i>Trichomonas vaginalis</i> ; <i>Cryptosporidium parvum</i> ; <i>Cryptosporidium baileyi</i> ; <i>Giardia lamblia</i> ; <i>Entamoeba histolytica</i> ; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> ; <i>Clostridium pasteurianum</i>	GenBank: AY101767; Y09702; U30149; XM_001582310, XM_001313670, XM_001321286, XM_001307087, XM_001311860, XM_001314776, XM_001307250; EF030517; EF030516; XM_764947; XM_651927; AB042412; Y17727

Transporte dirigido de enzimas a la región estromática de los cloroplastos

Se sabe que algunas de las enzimas de diseño analizadas anteriormente, tal como piruvato-ferredoxina oxidorreductasa, tiolasa, 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa, butiraldehído deshidrogenasa, y butanol deshidrogenasa, actúan en ciertas bacterias especiales, tales como *Clostridium*; pero, en general, los cloroplastos de plantas de tipo salvaje no poseen estas enzimas para que funcionen con el ciclo de Calvin. Por tanto, en una de las diversas realizaciones para crear un organismo eucariota de diseño que produce butanol, los ácidos nucleicos de diseño que codifican estas enzimas se expresan en el cloroplasto o cloroplastos de una célula hospedante. Esto puede lograrse mediante el transporte de un gen o genes de la vía de producción de butanol de diseño hacia el genoma del cloroplasto de la célula hospedante eucariota, generalmente empleando una

5

10

pistola de genes. Hasta cierto punto, la genética molecular de los cloroplastos es similar a la de las cianobacterias. Después de ser introducida en el cloroplasto, una construcción de ADN de diseño que contiene un par de sitios de recombinación apropiados, tal como se ilustra en la figura 2F, puede incorporarse en el genoma del cloroplasto a través de un proceso natural de recombinación doble de ADN homólogo.

5 En otra realización, los ácidos nucleicos que codifican estas enzimas se modifican genéticamente de modo que las enzimas expresadas se insertan en los cloroplastos para que funcionen con el ciclo de Calvin que se desarrolla allí. Dependiendo del trasfondo genético de un organismo hospedante concreto, algunas de las enzimas de diseño analizadas anteriormente, tal como la fosfoglicerato mutasa y la enolasa, pueden existir a ciertos niveles de fondo en su forma nativa en un cloroplasto de tipo salvaje. Sin embargo, por diversas razones, que a menudo incluyen la incapacidad de controlarlas, algunas de las enzimas de fondo del cloroplasto pueden o no ser suficientes para actuar como una parte significativa de la vía o vías de producción de butanol de diseño. Además, resulta que una serie de promotores inducibles útiles actúan en el genoma nuclear. Por ejemplo, tanto el promotor de la hidrogenasa (Hyd1) como el promotor de la nitrato reductasa (Nia1), que pueden utilizarse para controlar la expresión de las vías de producción de butanol de diseño, se localizan en el genoma nuclear de *Chlamydomonas reinhardtii*, cuyo genoma ha sido recientemente secuenciado. Por tanto, en una de las diversas realizaciones, se prefiere utilizar genes de diseño que pueden ser codificados por el genoma nuclear, para conferir una vía de producción de butanol conmutable. Por consiguiente, también es necesario que los ácidos nucleicos que codifican estas enzimas se modifiquen genéticamente con una modificación de secuencia apropiada, de modo que las enzimas se expresen de modo controlable y se inserten en los cloroplastos para crear una vía de producción de butanol de diseño.

20 Según una de las diversas realizaciones, es mejor expresar las enzimas de la vía de producción de butanol de diseño solo en los cloroplastos (en la región estromática), exactamente donde la acción de las enzimas es necesaria para permitir la producción fotosintética de butanol. Si se expresan sin un mecanismo de inserción dirigido a los cloroplastos, las enzimas simplemente se quedarían en el citosol y no serían capaces de interactuar directamente con el ciclo de Calvin para la producción de butanol. Por tanto, además de las características distintivas obvias en los diseños de vías y las estrategias asociadas, otra distinción significativa es que una de las diversas realizaciones emplea, de modo innovador, un mecanismo dirigido a cloroplastos para la inserción genética de muchas enzimas de la vía de producción de butanol de diseño en el cloroplasto para que interactúen directamente con el ciclo de Calvin para la producción fotobiológica de butanol.

30 Empleando un mecanismo dirigido al estroma del cloroplasto, las células no solo pueden producir butanol, sino que también pueden crecer y regenerarse cuando se devuelven a ciertas condiciones bajo las cuales la vía de diseño está inactivada, tales como bajo condiciones aerobias cuando se emplean genes de la vía de producción de butanol controlados por el promotor de la hidrogenasa. Las algas, plantas o células vegetales de diseño que contienen mitocondrias normales deberían ser capaces de emplear el poder reductor (NADH) de reservas orgánicas y/o de algún sustrato orgánico exógeno, tal como acetato o azúcar, para suministrar energía a las células inmediatamente después de volver a las condiciones aerobias. Por consiguiente, cuando las algas, plantas o células vegetales de diseño vuelven a las condiciones aerobias después de su uso bajo condiciones anaerobias para la producción fotosintética de butanol, las células dejarán de producir las enzimas de la vía de producción de butanol y comenzarán a restablecer la capacidad fotoautótrofa normal sintetizando nuevos cloroplastos funcionales. Por tanto, es posible emplear estos organismos vegetales/algas de diseño modificadas genéticamente para ciclos repetidos de crecimiento fotoautótrofo bajo condiciones aerobias normales y la producción eficaz de butanol directamente a partir de CO₂ y H₂O bajo ciertas condiciones de producción de butanol de diseño específicas, tales como bajo condiciones anaerobias y/o en presencia de nitrato cuando se emplea una vía de producción de butanol controlada por un promotor de Nia1.

45 La inserción dirigida de enzimas de la vía de producción de butanol de diseño puede lograrse mediante el uso de una secuencia de ADN que codifica un péptido "señal" estromático. Un péptido señal (de tránsito) de una proteína estromática dirige el transporte y la inserción de una proteína recién sintetizada en el estroma. Según una de las diversas realizaciones, una secuencia de ADN de transporte dirigida específica se coloca preferiblemente entre el promotor y la secuencia de una enzima de la vía de producción de butanol de diseño, tal como se muestra en una construcción de ADN de diseño (figura 2A). Esta secuencia de transporte dirigida codifica un péptido señal (de tránsito) que se sintetiza como parte de la apoproteína de una enzima en el citosol. El péptido de tránsito guía la inserción de una apoproteína de una enzima de la vía de producción de butanol de diseño desde el citosol hacia el cloroplasto. Después de que la apoproteína se inserte en el cloroplasto, el péptido de tránsito se escinde de la apoproteína, que entonces se convierte en una enzima activa.

55 Son adecuadas una serie de secuencias de péptidos de tránsito para su uso en la inserción dirigida de las enzimas de la vía de producción de butanol de diseño en el cloroplasto, que incluyen, pero no se limitan a las secuencias de péptidos de tránsito de: las apoproteínas de hidrogenasa (tales como HydA1 (Hyd1) y HydA2, GenBank n.º de registro AJ308413, AF289201, AY090770), la apoproteína de ferredoxina (Frx1, n.os de registro L10349, P07839), la apoproteína m de tiorredoxina (Trx2, X62335), la apoproteína de glutamina sintasa (Gs2, Q42689), las apoproteínas de LhcII (AB051210, AB051208, AB051205), la apoproteína de PSII-T (PsbT), la apoproteína de PSII-S (PsbS), la apoproteína de PSII-W (PsbW), la apoproteína de la subunidad y de CF₀CF₁ (AtpC), la apoproteína de la subunidad ð de CF₀CF₁ (AtpD, U41442), la apoproteína de la subunidad II de CF₀CF₁ (AtpG), las apoproteínas del fotosistema I (PSI) (tales como de los genes Psad, PsaE, PsaF, PsaG, PsaH, y PsaK), las apoproteínas de SSU de rubisco (tales

como RbcS2, X04472). A lo largo de esta memoria descriptiva, cuando se menciona una secuencia de péptido de tránsito, tal como, por ejemplo, cualquiera de las secuencias de péptidos de tránsito descritas anteriormente, se incluyen sus análogos funcionales, secuencias de diseño modificadas y sus combinaciones. Un “análogo funcional” o “secuencia de diseño modificada” en este contexto se refiere a una secuencia de péptido derivada o modificada (por ejemplo, mediante sustitución conservadora, delección o adición moderada de aminoácidos, o modificación de las cadenas laterales de aminoácidos) basada en una secuencia nativa del péptido de tránsito, tales como las identificadas anteriormente, que tiene la misma función que la secuencia nativa del péptido de tránsito, es decir, realizar la inserción dirigida de una enzima deseada.

En ciertas realizaciones específicas, se emplean las siguientes secuencias de péptidos de tránsito para guiar la inserción de las enzimas de la vía de producción de butanol de diseño hacia la región estromática del cloroplasto: el péptido de tránsito de Hyd1 (que tiene la secuencia de aminoácidos: msalylkpca aysirgsscr arqvaprapl aastvrvala tleaparrlg nvacaa (SEQ ID NO: 54)), los péptidos de tránsito de RbcS2 (que tienen la secuencia de aminoácidos: maaviakssv saavarpars svrpmaalkp avkaapvaap aqanq (SEQ ID NO: 55)), el péptido de tránsito de ferredoxina (que tiene la secuencia de aminoácidos: mamamrs (SEQ ID NO: 56)), el péptido de tránsito de la subunidad δ de CF₀CF₁ (que tiene la secuencia de aminoácidos: mlaaksiagp rafkasavra apkagrtrtv vma (SEQ ID NO: 57)), sus análogos, derivados funcionales, secuencias de diseño y sus combinaciones.

Uso de una conmutación genética para controlar la expresión de una vía de producción de butanol de diseño

Otra característica clave de la invención es la aplicación de un conmutador genético para controlar la expresión de una vía o vías de producción de butanol de diseño, tal como se ilustra en la figura 1. La conmutabilidad se logra empleando un promotor externamente inducible, de modo que los transgenes de diseño son expresados de modo inducible bajo ciertas condiciones específicas. Preferiblemente, el promotor empleado para controlar la expresión de los genes de diseño en un hospedante se origina del propio hospedante o de un organismo muy próximo. Las actividades y la inducibilidad de un promotor en una célula hospedante pueden ensayarse colocando el promotor delante de un gen indicador, introduciendo esta construcción de indicador en el tejido o en células del hospedante mediante cualquier técnica de transporte de ADN conocida, y evaluar la expresión del gen indicador.

En una realización preferida, el promotor inducible empleado para controlar la expresión de los genes de diseño es un promotor que es inducible por anaerobiosis, es decir, es activo bajo condiciones anaerobias, pero inactivo bajo condiciones aerobias. Un alga/organismo vegetal de diseño puede realizar la fotosíntesis autótrofa empleado CO₂ como fuente de carbono bajo condiciones aerobias, y cuando el cultivo del organismo de diseño se cultiva y está listo para la producción fotosintética de butanol se aplicarán las condiciones anaerobias para activar el promotor y los genes de diseño que codifican una vía o vías de producción de butanol de diseño.

Una serie de promotores que se activan bajo condiciones anaerobias son adecuados para su uso en la presente invención. Por ejemplo, pueden emplearse los promotores de los genes de la hidrogenasa (HydA1 (Hyd1) y HydA2, GenBank n.º de registro: AJ308413, AF289201, AY090770) de *Chlamydomonas reinhardtii*, que son activos bajo condiciones anaerobias, pero inactivos bajo condiciones aerobias, como conmutador genético eficaz para controlar la expresión de los genes de diseño en un alga hospedante, tal como *Chlamydomonas reinhardtii*. De hecho, las células de *Chlamydomonas* contienen varios genes nucleares que son inducidos de modo coordinado bajo condiciones anaerobias. Estos incluyen el propio gen estructural de la hidrogenasa (Hyd1), el gen Cyc6 que codifica la apoproteína del citocromo C₆, y el gen Cpx1 que codifica la coprogeno oxidasa. Las regiones reguladoras para estos dos últimos genes han sido bien caracterizadas, y una región de aproximadamente 100 pb ha demostrado ser suficiente para conferir la regulación por anaerobiosis en construcciones de genes sintéticas (Quinn, Barraco, Ericksson y Merchant (2000), “Coordinate copper- and oxygen-responsive Cyc6 and Cpx1 expression in *Chlamydomonas* is mediated by the same element”, *J. Biol. Chem.*, 275:6080-6089). Aunque los anteriores promotores de algas inducibles pueden resultar adecuados para su uso en otros hospedantes vegetales, en especial en plantas muy próximas a las algas, pueden obtenerse promotores de los genes homólogos de estas otras plantas, que incluyen plantas superiores, y emplearse para controlar la expresión de los genes de diseño en estas plantas.

En otra realización, el promotor inducible empleado en la presente invención es un promotor de la nitrato reductasa de algas (Nia1), que es inducible por el crecimiento en un medio que contienen nitrato y resulta reprimido en un medio deficiente en nitrato, pero que contiene amonio (Loppes y Radoux (2002), “Two short regions of the promoter are essential for activation and repression of the nitrate reductase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*,” *Mol. Genet. Genomics*, 268:42-48). Por tanto, puede seleccionarse el promotor de Nia1 (n.º de registro de gen AF203033) para su uso para controlar la expresión de los genes de diseño en un alga según los niveles de concentración de nitrato y amonio en un medio de cultivo. Otros promotores inducibles que también pueden seleccionarse para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, el promotor de la proteína de choque térmico HSP70A (n.º de registro: DQ059999, AY456093, M98823; Schroda, Blocker, Beek (2000), The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*, *Plant Journal*, 21:121-131), el promotor del gen CabII-1 (n.º de registro M24072), el promotor del gen Ca1 (n.º de registro P20507), y el promotor del gen Ca2 (n.º de registro P24258).

En el caso de las algas verdeazuladas (oxifotobacterias, que incluyen cianobacterias y oxiclrobacterias), también existen una serie de promotores inducibles que pueden seleccionarse para su uso en la presente invención. Por ejemplo, pueden emplearse los promotores de los genes *hox* de hidrogenasa bidireccionales de respuesta anaerobia

de *Nostoc* sp. PCC 7120 (GenBank: BA000019), *Prochlorothrix hollandica* (GenBank: U88400; promotor del operón *hoxUYH*), *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803 (CyanoBase: sll1220 y sll1223), *Synechococcus elongatus* PCC 6301 (CyanoBase: syc1235_c), *Arthrospira platensis* (GenBank: ABC26906), *Cyanothece* sp. CCY0110 (GenBank: ZP_01727419) y *Synechococcus* sp. PCC 7002 (GenBank: AAN03566), que son activos bajo condiciones anaerobias, pero inactivos bajo condiciones aerobias (Sjoholm, Oliveira, y Lindblad (2007), "Transcription and regulation of the bidirectional hydrogenase in the Cyanobacterium *Nostoc* sp. strain PCC 7120," *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17): 5435-5446), como conmutador genético eficaz para controlar la expresión de los genes de diseño en un hospedante de oxifotobacteria, tal como *Nostoc* sp. PCC 7120, *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803, *Synechococcus elongatus* PCC 6301, *Cyanothece* sp. CCY0110, *Arthrospira platensis*, o *Synechococcus* sp. PCC 7002.

En otra realización, para crear organismos de diseño para la producción de butanol conmutable, tales como oxifotobacterias de diseño conmutables, el promotor inducible seleccionado para su uso es un promotor de la nitrato reductasa (*nirA*), que es inducible por el crecimiento en un medio que contienen nitrato y resulta reprimido en un medio deficiente en nitrato, pero que contiene amonio (Qi, Hao, Ng, Slater, Baszis, Weiss, y Valentin (2005), "Application of the *Synechococcus nirA* promoter to establish an inducible expression system for engineering the *Synechocystis* tocopherol pathway," *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10):5678-5684; Maeda, Kawaguchi, Ohe, y Omata (1998) "cis-Acting sequences required for NtcB-dependent, nitrite-responsive positive regulation of the nitrate assimilation operon in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942," *Journal of Bacteriology*, 180(16):4080-4088). Por tanto, pueden seleccionarse secuencias del promotor *nirA* para su uso para controlar la expresión de los genes de diseño en una serie de oxifotobacterias según los niveles de concentración de nitrato y amonio en un medio de cultivo. Las secuencias del promotor *nirA* que pueden seleccionarse y modificarse para su uso incluyen, pero no se limitan a los promotores *nirA* de las siguientes oxifotobacterias: *Synechococcus elongatus* PCC 6301 (GenBank: AP008231, región 355890-255950), *Synechococcus* sp. (GenBank: X67680.1, D16303.1, D12723.1, y D00677), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (GenBank: NP_442378, BA000022, AB001339, D63999-D64006, D90899-D90917), *Anabaena* sp. (GenBank: X99708.1), *Nostoc* sp. PCC 7120 (GenBank: BA000019.2 y AJ319648), *Plectonema boryanum* (GenBank: D31732.1), *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (GenBank: P39661, CP000100.1), *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (GenBank: BAC08901, NP_682139), *Phormidium laminosum* (GenBank: CAA79655, Q51879), *Mastigocladus laminosus* (GenBank: ABD49353, ABD49351, ABD49349, ABD49347), *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (GenBank: YP_325032), *Prochlorococcus marinus* cepa. MIT 9303 (GenBank: YP_001018981), *Synechococcus* sp. WH 8103 (GenBank: AAC17122), *Synechococcus* sp. WH 7805 (GenBank: ZP_01124915), y *Cyanothece* sp. CCY0110 (GenBank: ZP_01727861).

En otra realización, un promotor inducible seleccionado para su uso es el promotor *groE* del gen de chaperona de respuesta a la luz y al calor, que puede ser inducido por el calor y/o la luz [Kojima y Nakamoto (2007), "A novel light-and heat-responsive regulation of the *groE* transcription in the absence of HrcA or CIRCE in cyanobacteria," *FEBS Letters*, 581:1871-1880). Están disponibles una serie de promotores *groE*, tales como los promotores *groES* y *groEL* (chaperonas) para su uso como promotor inducible para controlar la expresión de las enzimas de la vía de producción de butanol de diseño. Las secuencias del promotor *groE* que pueden seleccionarse y modificarse para su uso en una de las diversas realizaciones incluyen, pero no se limitan a los promotores *groES* y/o *groEL* de las siguientes oxifotobacterias: *Synechocystis* sp. (GenBank: D12677.1), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (GenBank: BA000022.2), *Synechococcus elongatus* PCC 6301 (GenBank: AP008231.1), *Synechococcus* sp. (GenBank: M58751.1), *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (GenBank: CP000100.1), *Nostoc* sp. PCC 7120 (GenBank: BA000019.2), *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (GenBank: CP000117.1), *Anabaena* sp. L-31 (GenBank: AF324500); *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (CyanoBase: tll0185, tll0186), *Synechococcus vulcanus* (GenBank: D78139), *Oscillatoria* sp. NKBG091600 (GenBank: AF054630), *Prochlorococcus marinus* MIT9313 (GenBank: BX572099), *Prochlorococcus marinus* cepa MIT 9303 (GenBank: CP000554), *Prochlorococcus marinus* cepa. MIT 9211 (GenBank: ZP_01006613), *Synechococcus* sp. WH8102 (GenBank: BX569690), *Synechococcus* sp. CC9605 (GenBank: CP000110), *Prochlorococcus marinus* subsp. *marinus* cepa CCMP1375 (GenBank: AE017126), y *Prochlorococcus marinus* MED4 (GenBank: BX548174).

Otros promotores inducibles que también pueden seleccionarse para su uso en la presente invención incluyen por ejemplo, el promotor *smt* inducible por metales (cinc) de *Synechococcus* PCC 7942 (Erbe, Adams, Taylor y Hall (1996), "Cyanobacteria carrying an *smt-lux* transcriptional fusion as biosensors for the detection of heavy metal cations," *Journal of Industrial Microbiology*, 17:80-83); el promotor *idiA* de respuesta al hierro de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Michel, Pistorius, y Golden (2001), "Unusual regulatory elements for iron deficiency induction of the *idiA* gene of *Synechococcus elongatus* PCC 7942," *Journal of Bacteriology*, 183(17):5015-5024); el promotor *crhR* de cianobacterias de respuesta a redox (Patterson-Fortin, Colvin y Owtrim (2006), "A LexA-related protein regulates redox-sensitive expression of the cyanobacterial RNA helicase, *crhR*," *Nucleic Acids Research*, 34(12):3446-3454); el promotor *hsp16.6* del gen de respuesta al choque térmico de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Fang y Barnum (2004), "Expression of the heat shock gene *hsp16.6* and promoter analysis in the Cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803," *Current Microbiology*, 49:192-198); el promotor de la proteína del choque térmico pequeña (Hsp), tal como como el promotor *hspA* del gen de *Synechococcus vulcanus* (Nakamoto, Suzuki, y Roy (2000), "Constitutive expression of a small heat-shock protein confers cellular thermotolerance and thermal protection to the photosynthetic apparatus in cyanobacteria," *FEBS Letters*, 483:169-174); los promotores de respuesta a CO₂ de genes de anhidrasa carbónica de oxifotobacterias (GenBank: EAZ90903, EAZ90685, ZP_01624337, EAW33650,

ABB17341, AAT41924, CAO89711, ZP_00111671, YP_400464, AAC44830; y CyanoBase: all2929, PMT1568 slr0051, slr1347, and syc0167_c); los promotores del gen de la nitrato reductasa (*narB*) (tales como GenBank n.^{os} de registro: BAC08907, NP_682145, AAO25121; ABI46326, YP_732075, BAB72570, NP_484656); los promotores de respuesta a luz verde/roja, tales como el promotor *cpcB2A2* regulado por la luz de *Fremyella diplosiphon* (Casey y Grossman (1994), "In vivo and in vitro characterization of the light-regulated *cpcB2A2* promoter of *Fremyella diplosiphon*", *Journal of Bacteriology*, 176(20):6362-6374); y los promotores de respuesta a la luz UV de cianobacterias) de los genes *lexA*, *recA* y *ruvB* (Domain, Houot, Chauvat, y Cassier-Chauvat (2004), "Function and regulation of the cyanobacterial genes *lexA*, *recA* and *ruvB*: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation," *Molecular Microbiology*, 53(1):65-80).

Además, en una de las diversas realizaciones, también pueden seleccionarse ciertos promotores "semiinducibles" o constitutivos para su uso en combinación con un promotor o promotores inducibles para la construcción de una vía o vías de producción de butanol de diseño. Por ejemplo, también pueden seleccionarse los promotores del operón de rubisco oxifotobacteriana, tales como los genes *rbcL* (GenBank: X65960, ZP_01728542, Q3M674, BAF48766, NP_895035, 0907262A; CyanoBase: PMT1205, PMM0550, Pro0551, tll1506, SYNW1718, glr2156, alr1524, slr0009), que presentan cierta dependencia de la luz pero que pueden considerarse casi como promotores constitutivos, para su uso en combinación con un promotor o promotores inducibles, tales como los promotores *nirA*, *hox*, *ylo* *groE*, para la construcción de una vía o vías de producción de butanol de diseño.

A lo largo de esta memoria descriptiva, cuando se menciona un promotor inducible, tal como, por ejemplo, cualquiera de los promotores inducibles descritos anteriormente, se incluyen sus análogos, derivados funcionales, secuencias de diseño y sus combinaciones. Un "análogo funcional" o "secuencia de diseño modificada" en este contexto se refiere a una secuencia de promotor derivada o modificada (por ejemplo, mediante sustitución, delección o adición moderada o modificación de nucleótidos) basada en una secuencia nativa de un promotor, tales como los identificados anteriormente, que conserva la función de la secuencia nativa del promotor.

Construcciones de ADN y transformación en organismos hospedantes

Se generan construcciones de ADN para introducir genes de la vía de producción de butanol de diseño en un alga, planta, tejido o células vegetales hospedantes. Es decir, una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima de la vía de producción de butanol de diseño se coloca en un vector, en enlace operable con un promotor, preferiblemente un promotor inducible, y en enlace operable con una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de péptido de tránsito que se dirige al cloroplasto apropiada. En una realización preferida, se preparan construcciones de ácidos nucleicos para que contengan los elementos colocados en la siguiente orientación 5' (cadena arriba) a 3' (cadena abajo): un promotor externamente inducible, una secuencia de transporte dirigido de tránsito, y un ácido nucleico que codifica una enzima de la vía de producción de butanol de diseño, y preferiblemente una secuencia de fin de la transcripción apropiada. Pueden colocarse uno o más genes de diseño (construcciones de ADN) en un vector genético. Se muestra un ejemplo de dicha construcción en la figura 2A. Tal como se muestra en la realización ilustrada en la figura 2A, un transgén de la vía de producción de butanol de diseño es una construcción de ácido nucleico que comprende: a) un cebador directo de PCR; b) un promotor externamente inducible; c) una secuencia de transporte dirigido de tránsito; d) una secuencia que codifica una enzima de la vía de producción de butanol de diseño con una secuencia de fin de la transcripción apropiada; y e) un cebador inverso de PCR.

Según diversas realizaciones, cualquiera de los componentes a) hasta e) de esta construcción de ADN se ajustan para que se adapten a ciertas condiciones específicas. En la práctica, cualquiera de los componentes a) hasta e) de esta construcción de ADN se aplican totalmente o en parte y/o en cualquier combinación ajustada para lograr resultados más deseables. Por ejemplo, cuando se emplea un promotor de hidrogenasa de alga como promotor inducible en la construcción de ADN de la vía de producción de butanol de diseño, un alga de diseño transgénica que contenga esta construcción de ADN podrá realizar la fotosíntesis autótrofa empleando el CO₂ del aire ambiental como fuente de carbono y crecerá con normalidad bajo condiciones aerobias, tal como en un estanque abierto. Cuando se cultiva el cultivo de algas y esté preparado para la producción de butanol, el transgén o transgenes de diseño pueden ser expresados mediante inducción bajo condiciones anaerobias, debido al uso del promotor de hidrogenasa. La expresión del gen o genes de diseño provoca que un conjunto de enzimas de la vía de producción de butanol de diseño actúen con el ciclo de Calvin para la producción fotobiológica de butanol (figura 1).

Los dos cebadores de PCR son un cebador directo de PCR (cebador FD ["forward"] de PCR) localizado al comienzo (el extremo 5') de la construcción de ADN, y un cebador inverso de PCR (cebador RE ["reverse"] de PCR) localizado en el otro extremo (el extremo 3'), tal como se muestra en la figura 2A. Esta pareja de cebadores de PCR se diseña para proporcionar cierta comodidad cuando sea necesaria para una amplificación por PCR relativamente fácil de la construcción de ADN de diseño, que es útil no solo durante y después de sintetizar la construcción de ADN de diseño en preparación para la transformación génica, sino también después de transportar la construcción de ADN de diseño hasta el genoma de un alga hospedante para la verificación del gen de diseño en los transformantes. Por ejemplo, después de lograr la transformación del gen de diseño en una célula hospedante de *Chlamydomonas reinhardtii-arg7* empleando las técnicas de electroporación y selección de complementación de arginino succinato liasa (*arg7*), los transformantes resultantes después pueden analizarse mediante un ensayo de ADN con PCR de su ADN nuclear empleando esta pareja de cebadores de PCR para verificar si el gen completo de la vía de producción de butanol de diseño (la construcción de ADN) se ha incorporado con éxito en el genoma de un transformante

concreto. Cuando el ensayo por PCR del ADN nuclear de un transformante puede generar un producto de PCR que se aparea con la secuencia y el tamaño del ADN previsto según la construcción de ADN de diseño, se verifica la incorporación correcta del gen o genes de diseño en el genoma del transformante.

5 Por tanto, las diversas realizaciones también indican que el método asociado crea, de modo eficaz, las algas, plantas o células vegetales transgénicas de diseño para la producción fotobiológica de butanol. Este método, en una de las realizaciones, incluye las siguientes etapas: a) seleccionar un alga, planta, tejido vegetal o célula vegetal hospedante apropiado con respecto a su trasfondo genético y ciertas características especiales con relación a la producción de butanol; b) introducir las construcciones de ácidos nucleicos de los genes de diseño en el genoma de dicha alga, planta, tejido vegetal o célula vegetal hospedante; c) verificar la incorporación de los genes de diseño en el alga, planta, tejido vegetal o célula vegetal transformado con ensayos de ADN con PCR empleando dichos cebadores de PCR de la construcción de ADN de diseño; d) medir y verificar las características del organismo de diseño, tales como la expresión inducible de los genes de la vía del butanol de diseño para la producción fotosintética de butanol a partir de dióxido de carbono y agua por medio de ensayos de ARNm, proteínas y características de producción de butanol según las características de diseño específicas de la construcción o construcciones de ADN (figura 2A).

La anterior realización del método para crear el organismo transgénico de diseño para la producción fotobiológica de butanol también puede aplicarse repetidas veces para una pluralidad de ciclos operativos para lograr los resultados más deseables. En diversas realizaciones, cualquiera de las etapas a) hasta d) de este método descrito anteriormente se ajustan para que se adapten a ciertas condiciones específicas. En diversas realizaciones, cualquiera de las etapas a) hasta d) de este método se aplican totalmente o en parte y/o en cualquier combinación ajustada.

Los ejemplos de genes de la vía de producción de butanol de diseño (construcciones de ADN) se muestran en las listas de secuencias. SEQ ID NO:1 presenta una construcción de ADN detallada de un gen de butanol deshidrogenasa de diseño (1809 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nitrato reductasa *Nia1* de 262 pb (21-282), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (283-417), una secuencia codificadora de enzima (418-1566) seleccionada y modificada a partir de una secuencia de la butanol deshidrogenasa de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (AB257439), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1567-1789), y un cebador RE de PCR (1790-1809). El promotor de *Nia1* de 262 pb (secuencia de ADN 21-282) se emplea como ejemplo de un promotor inducible para controlar la expresión de un gen de butanol deshidrogenasa de la vía de producción de butanol de diseño (secuencia de ADN 418-1566). El péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (secuencia de ADN 283-417) se emplea como ejemplo para guiar la inserción de la enzima de diseño (secuencia de ADN 418-1566) hacia el cloroplasto del organismo hospedante. El terminador de *RbcS2* (secuencia de ADN 1567-1789) se emplea para que la transcripción y la traducción del gen de diseño se termine de modo adecuado para producir la apoproteína de diseño (péptido de tránsito de *RbcS2*-butanol deshidrogenasa) según se desea. Debido a que el promotor de *Nia1* es un ADN nuclear que solo puede controlar la expresión de genes nucleares, el gen de la vía de producción de butanol sintética en este ejemplo se diseña según la utilización de codones del genoma nuclear de *Chlamydomonas*. Por tanto, en este caso, el gen de la enzima de diseño se transcribe en el núcleo. Su ARNm es translocado de modo natural hacia el citosol, en donde el ARNm es traducido en una apoproteína que consiste en el péptido de tránsito de *RbcS2* (que se corresponde con la secuencia de ADN 283-417) y su C-terminal está unido al N-terminal de la proteína de la butanol deshidrogenasa (que se corresponde con la secuencia de 418-1566). El péptido de tránsito de la apoproteína guía su transporte a través de las membranas del cloroplasto y hacia el área del estroma, en donde el péptido de tránsito se escinde de la apoproteína. Entonces la butanol deshidrogenasa resultante reanuda su función como enzima para la vía de producción de butanol de diseño en el cloroplasto. Los dos cebadores de PCR (secuencias 1-20 y 1790-1809) se seleccionan y se modifican a partir de la secuencia del gen de la actina humano y pueden aparearse entre sí. El empleo de BLAST con las secuencias frente a *Chlamydomonas* no encontró secuencias homólogas en GenBank. Por tanto, pueden utilizarse como cebadores de PCR apropiados en ensayos de ADN con PCR para la verificación del gen de diseño en las algas transformadas.

SEQ ID NO:2 presenta el ejemplo 2 para una construcción de ADN de butiraldehído deshidrogenasa de diseño (2067 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nitrato reductasa *Nia1* de 262 pb (21-282), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (283-417), una secuencia que codifica la butiraldehído deshidrogenasa (418-1824) seleccionada y modificada a partir de una secuencia de la butiraldehído deshidrogenasa de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (AY251646), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1825-2047), y un cebador RE de PCR (2048-2067). Esta construcción de ADN es similar al ejemplo 1, SEQ ID NO:1, excepto que se emplea una secuencia que codifica la butiraldehído deshidrogenasa (418-1824) seleccionada y modificada a partir de una secuencia de la butiraldehído deshidrogenasa de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (AY251646).

SEQ ID NO:3 presenta el ejemplo 3 para una construcción de butiril-CoA deshidrogenasa de diseño (1815 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nitrato reductasa de 262 pb (21-282), un sitio *Xho I* *NdeI* de 9 pb (283-291), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (292-426), una secuencia que codifica la butiril-CoA deshidrogenasa (427-1563) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una butiril-CoA deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii* (AF494018), un sitio *XbaI* de 9 pb (1564-1572), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1573-1795), y un cebador RE de PCR (1796-1815) en el extremo 3'. Esta construcción de ADN es similar a la del ejemplo 1, SEQ ID NO:1, excepto que se empleó una secuencia que codifica la butiril-CoA deshidrogenasa

- (427-1563) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una butiril-CoA deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii* (AF494018) y que se añaden los sitios de restricción Xho I NdeI y XbaI para hacer que componentes clave, tales como la secuencia de transporte dirigido (292-426) y la secuencia de la enzima de diseño (427-1563) formen una unidad modular que puede ser reemplazada de modo flexible cuando sea necesario para ahorrar costes de síntesis génica y potenciar la productividad del trabajo. Nótese que no es necesario que la enzima sean la butiril-CoA deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii*; también pueden seleccionarse para su uso una serie de enzimas butiril-CoA deshidrogenasas (tales como las listadas en la tabla 1), incluyendo sus isozimas, enzimas modificadas de diseño, y análogos funcionales procedentes de otras fuentes, tales como *Butyrivibrio fibrisolvens*, bacteria productora de butirato L2-50, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*.
- 5
- 10 SEQ ID NO:4 presenta el ejemplo 4 para una construcción de ADN de crotonasa de diseño (1482 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nitrato reductasa de 262 pb (21-282), un sitio Xho I NdeI de 9 pb (283-291), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (292-426), una secuencia que codifica la crotonasa (427-1209) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una crotonasa de *Clostridium beijerinckii* (Genbank: AF494018), una secuencia que codifica el marcador Lumio de 21 pb (1210-1230), un sitio XbaI de 9 pb (1231-1239)
- 15 que contiene un codón de fin, un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1240-1462), y un cebador RE de PCR (1463-1482) en el extremo 3'. Esta construcción de ADN es similar al ejemplo 3, SEQ ID NO:3, excepto que se emplea una secuencia que codifica la crotonasa (427-1209) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una crotonasa de *Clostridium beijerinckii* (Genbank: AF494018) y que se añade una secuencia que codifica un marcador Lumio de 21 pb (1210-1230) en el extremo C-terminal de la secuencia de enolasa. La secuencia del marcador Lumio de 21 pb (1210-1230) se emplea en este caso para codificar una secuencia del péptido Lumio Gly-Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys (SEQ ID NO:58), que puede convertirse en fluorescente cuando se trata con un reactivo Lumio que está disponible en el mercado en Invitrogen [<https://catalog.invitrogen.com>]. La tecnología de marcaje molecular con Lumio se basa en un derivado biarsénico acoplado a EDT (1,2-etanditiol) (el reactivo Lumio) de la fluoresceína que se une a una secuencia de tetracisteína modificada (Kepppetipola, Coffman, *et al.* (2003), Rapid detection of in vitro expressed proteins using Lumio™ technology, *Gene Expression*, 25:3:7-11). La secuencia de tetracisteína consiste en Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys (SEQ ID NO:59), en la que Xaa es cualquier aminoácido que no sea cisteína, tal como Pro o Gly en este ejemplo. El reactivo Lumio unido a EDT permite la rotación libre de los átomos de arsénico que extingue la fluorescencia de la fluoresceína. La formación de enlaces covalentes entre los tioles de los grupos arsénico de Lumio y las tetracisteínas evita la rotación libre de los átomos de arsénico que libera la fluorescencia de la fluoresceína (Griffin, Adams, y Tsien (1998), "Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells", *Science*, 281:269-272). Esto también permite la visualización de las proteínas marcadas con tetracisteína mediante la formación de imágenes moleculares fluorescentes. Por tanto, el uso del marcador Lumio de esta manera permite controlar y/o seguir el rastro de la crotonasa de diseño cuando se expresa para verificar si la enzima de la vía de producción de butanol de diseño en efecto se transporta hacia el cloroplasto de un organismo hospedante, tal como se ha de diseño. El marcador Lumio (un péptido corto de 7 aminoácidos) que está unido al extremo C-terminal de la proteína de crotonasa en este ejemplo debe tener un efecto mínimo sobre la función de la enzima de diseño, pero debe permitir que la molécula de la enzima de diseño se visualice cuando se trate con el reactivo Lumio. El uso del marcador Lumio es totalmente opcional. Si el marcador Lumio afecta de alguna manera a la función de la enzima de diseño, este marcador puede ser delecionado en el diseño de la secuencia de ADN.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40 SEQ ID NO:5 presenta el ejemplo 5 para una construcción de ADN de 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa de diseño (1367 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nitrato reductasa de 84 pb (21-104), un sitio Xho I NdeI de 9 pb (105-113), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (114-248), una secuencia que codifica la 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa (249-1094) seleccionada/modificada a partir de la secuencia de una 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii* (Genbank: AF494018), una secuencia del marcador Lumio de 21 pb (1095-1115), un sitio XbaI de 9 pb (1116-1124), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1125-1347), y un cebador RE de PCR (1348-1367). Esta construcción de ADN es similar al ejemplo 4, SEQ ID NO:4, excepto que se emplea un promotor de nitrato reductasa de 84 pb (21-104) y una secuencia que codifica la 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa (249-1094) seleccionada/modificada a partir de la secuencia de una 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii* (Genbank: AF494018). El promotor de nitrato reductasa de 84 pb se crea de modo artificial uniendo dos regiones de secuencia parcialmente homóloga (-231 a -201 y -77 a -25 con respecto al sitio de inicio de la transcripción) del promotor de *Nia1* nativo de *Chlamydomonas reinhardtii*. Estudios experimentales han demostrado que la secuencia de 84 pb es más activa que el promotor de *Nia1* nativo (Loppes y Radoux (2002), "Two short regions of the promoter are essential for activation and repression of the nitrate reductase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*," *Mol. Genet. Genomics*, 268:42-48). Por tanto, este también es un ejemplo en el que pueden seleccionarse secuencias sintéticas funcionales, análogos, derivados funcionales y/o secuencias modificadas de diseño, tales como la secuencia sintética de 84 pb, para su uso según diversas realizaciones en esta invención.
- 45
- 50
- 55
- 60 SEQ ID NO:6 presenta el ejemplo 6 para una construcción de ADN de tiolasa de diseño (1721 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nitrato reductasa de 84 pb (21-104), un sitio Xho I NdeI de 9 pb (105-113), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (114-248), una secuencia que codifica la tiolasa (248-1448) seleccionada/modificada a partir de la secuencia de una tiolasa de *Butyrivibrio fibrisolvens* (AB190764), una secuencia del marcador Lumio de 21 pb (1449-1469), un sitio XbaI de 9 pb (1470-1478), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1479-1701), y un cebador RE de PCR (1702-1721). Esta construcción de ADN también es similar al ejemplo

4, SEQ ID NO:4, excepto que se emplea una secuencia que codifica la tiolasa (249-1448) y un promotor de Nia1 sintético de 84 pb (21-104). Este es otro ejemplo en el que también pueden seleccionarse secuencias sintéticas funcionales para su uso en las construcciones de ADN de diseño.

5 SEQ ID NO:7 presenta el ejemplo 7 para una construcción de ADN de piruvato-ferredoxina oxidorreductasa de diseño (4211 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nitrato reductasa de 84 pb x 2 (21-188), un sitio Xho I NdeI de 9 pb (189-197), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (198-332), una secuencia que codifica la piruvato-ferredoxina oxidorreductasa (333-3938) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una piruvato-ferredoxina oxidorreductasa de *Mastigamoeba balamuthi* (GenBank: AY101767), una secuencia del marcador Lumio de 21 pb (3939-3959), un sitio XbaI de 9 pb (3960-3968), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (3969-4191), y un cebador RE de PCR (4192-4211). Esta construcción de ADN también es similar al ejemplo 10 4, SEQ ID NO:4, excepto que se emplea un promotor de Nia1 de 84 pb x 2 y una secuencia que codifica la piruvato-ferredoxina oxidorreductasa (333-3938) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una piruvato-ferredoxina oxidorreductasa de *Mastigamoeba balamuthi* (GenBank: AY101767). El promotor de Nia1 de 84 pb x 2 se construye como una duplicación en tándem de la secuencia del promotor de Nia1 sintético de 84 pb presentado 15 en la anterior SEQ ID NO:6. Los ensayos experimentales han demostrado que el promotor de Nia1 de 84 pb x 2 sintético es aún más potente que la secuencia de 84 pb, que es más activa que el promotor de Nia1 nativo (Loppes y Radoux (2002), "Two short regions of the promoter are essential for activation and repression of the nitrate reductase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*," *Mol. Genet. Genomics*, 268:42-48). El uso de este tipo de secuencias de promotores inducibles con diversas potencias de promotor también ayuda a ajustar los niveles de expresión de las 20 enzimas de diseño para la vía o vías de producción de butanol de diseño.

SEQ ID NO:8 presenta el ejemplo 8 para una construcción de ADN de piruvato quinasa de diseño (2021 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nitrato reductasa de 84 pb (21-104), un sitio Xho I NdeI de 9 pb (105-113), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (114-248), una secuencia que codifica la 25 piruvato quinasa (249-1748) seleccionada/modificada a partir de la secuencia de una piruvato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank: AY949876), una secuencia del marcador Lumio de 21 pb (1749-1769), un sitio XbaI de 9 pb (1770-1778), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1779-2001), y un cebador RE de PCR (2002-2021). Esta construcción de ADN es similar al ejemplo 6, SEQ ID NO:6, excepto que se emplea una secuencia que codifica la piruvato quinasa (249-1748).

SEQ ID NO:9 presenta el ejemplo 9 para un gen de enolasa de diseño (1815 pb) que consiste en un cebador FD de 30 PCR (secuencia 1-20), un promotor de nitrato reductasa de 262 pb (21-282), un sitio Xho I NdeI de 9 pb (283-291), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (292-426), una secuencia que codifica la enolasa (427-1542) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una enolasa citosólica de *Chlamydomonas reinhardtii* (Genbank: X66412, P31683), una secuencia que codifica el marcador Lumio de 21 pb (1507-1527), un sitio XbaI de 9 pb (1543-1551) que contiene un codón de fin, un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1552-1795), y un cebador RE 35 de PCR (1796-1815) en el extremo 3'. Esta construcción de ADN es similar al ejemplo 3, SEQ ID NO:3, excepto que se emplea una secuencia que codifica la enolasa (427-1542) seleccionada y modificada a partir de las secuencias de una enolasa citosólica de *Chlamydomonas reinhardtii*.

SEQ ID NO:10 presenta el ejemplo 10 para una construcción de ADN de fosfoglicerato mutasa de diseño (2349 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nitrato reductasa de 262 pb (21-282), un sitio 40 Xho I NdeI de 9 pb (283-291), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (292-426), una secuencia que codifica la fosfoglicerato mutasa (427-2097) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una fosfoglicerato mutasa citosólica de *Chlamydomonas reinhardtii* (JGI Chlr2 ID de la proteína 161689, Genbank: AF268078), un sitio XbaI de 9 pb (2098-2106), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (2107-2329), y un cebador RE de PCR (2330-2349) en el extremo 3'. Esta construcción de ADN es similar al ejemplo 3, SEQ ID NO:3, excepto que se emplea una secuencia 45 que codifica la fosfoglicerato mutasa (427-2097) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una fosfoglicerato mutasa citosólica *Chlamydomonas reinhardtii*.

SEQ ID NO:11 presenta el ejemplo 11 para una construcción de ADN de fosfoglicerato quinasa de diseño (1908 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nitrato reductasa Nia1 de 262 pb (21-282), una 50 secuencia que codifica la fosfoglicerato quinasa (283-1665) seleccionada de una secuencia de fosfoglicerato quinasa del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* que incluye su péptido señal del cloroplasto y la secuencia de la enzima madura (GenBank: U14912), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1666-1888), y un cebador RE de PCR (1889-1908). Esta construcción de ADN es similar al ejemplo 1, SEQ ID NO:1, excepto que se emplea una secuencia que codifica la fosfoglicerato quinasa (283-1665) seleccionada de una secuencia de fosfoglicerato 55 quinasa del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* que incluye su péptido señal del cloroplasto y la secuencia de la enzima madura. Por tanto, este también es un ejemplo en el que también puede utilizarse la secuencia de una enzima de cloroplasto codificada en el núcleo, tal como la fosfoglicerato quinasa del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*, en el diseño y la construcción de un gen de la vía de producción de butanol de diseño y, cuando resulte apropiado, con un promotor inducible apropiado, tal como el promotor de Nia1 (secuencia de ADN 21-282).

SEQ ID NO:12 presenta el ejemplo 12 para un gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de diseño (1677 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nitrato reductasa Nia1 de 262 pb (21-282), un 60 péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (283-417), una secuencia codificadora de enzima (418-1434) seleccionada y

modificada a partir de una secuencia (ARNm) de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa citosólica de *Mesostigma viride* (GenBank n.º de registro DQ873404), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1435-1657), y un cebador RE de PCR (1658-1677). Esta construcción de ADN es similar al ejemplo 1, SEQ ID NO:1, excepto que se emplea una secuencia codificadora de enzima (418-1434) seleccionada y modificada a partir de una secuencia (ARNm) de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa citosólica de *Mesostigma viride* (GenBank n.º de registro DQ873404).

SEQ ID NO:13 presenta el ejemplo 13 para una construcción de ADN de fosfoglicerato mutasa unida al promotor de HydA1 de diseño (2351 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de HydA1 de 282 pb (21-302), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (303-437), una secuencia que codifica la fosfoglicerato mutasa (438-2108) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una fosfoglicerato mutasa citosólica de *Chlamydomonas reinhardtii* (JGI Chlre2 ID de proteína 161689, Genbank: AF268078), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (2109-2331), y un cebador RE de PCR (2332-2351). Esta construcción de ADN de diseño es bastante similar al ejemplo 1, SEQ ID NO:1, excepto que se emplea un promotor de HydA1 de 282 pb (21-302) y una secuencia que codifica la fosfoglicerato mutasa (438-2108) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una fosfoglicerato mutasa citosólica de *Chlamydomonas reinhardtii*. Se ha demostrado que el promotor de HydA1 de 282 pb (21-302) es activo por medio de ensayos experimentales en el laboratorio del inventor. El uso del promotor de HydA1 (21-302) permite la activación de la expresión de la enzima de diseño empleando condiciones de cultivo anaerobias.

Con el mismo principio de emplear un promotor anaerobio inducible y una secuencia de transporte dirigido al cloroplasto que la que se muestra en SEQ ID NO:13 (ejemplo 13), SEQ ID NO:14-23 muestran los ejemplos 14-23 de genes de diseño. Brevemente, SEQ ID NO:14 presenta el ejemplo 14 para una construcción de ADN de enolasa de diseño (1796 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de HydA1 de 282 pb (21-302), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (303-437), una secuencia que codifica la enolasa (438-1553) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una enolasa citosólica de *Chlamydomonas reinhardtii* (Genbank: X66412, P31683), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1554-1776), y un cebador RE de PCR (1777-1796).

SEQ ID NO:15 presenta el ejemplo 15 para una construcción de ADN de piruvato quinasa controlada por el promotor de HydA1 de diseño que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de HydA1 de 282 pb (21-302), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (303-437), una secuencia que codifica la piruvato quinasa (438-1589) seleccionada/modificada a partir de la secuencia de una piruvato quinasa citosólica de *Chlamydomonas reinhardtii* (JGI Chlre3 ID de proteína 138105), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1590-1812), y un cebador RE de PCR (1813-1832).

SEQ ID NO:16 presenta el ejemplo 16 para una construcción de ADN de piruvato-ferredoxina oxidoreductasa de diseño (4376 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de HydA1 de 282 pb (21-302), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (303-437), una secuencia que codifica la piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (438-4133) seleccionada/modificada a partir de la secuencia de una piruvato-ferredoxina oxidoreductasa de *Desulfovibrio africanus* (GenBank n.º de registro Y09702), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (4134-4356), y un cebador RE de PCR (4357-4376).

SEQ ID NO:17 presenta el ejemplo 17 para una construcción de ADN de piruvato-NADP⁺ oxidoreductasa unida al promotor de HydA1 de diseño (6092 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de HydA1 de 282 pb (21-302), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (303-437), una secuencia que codifica la piruvato-NADP⁺ oxidoreductasa (438-5849) seleccionada/modificada a partir de la secuencia de una piruvato-NADP⁺ oxidoreductasa de *Euglena gracilis* (GenBank n.º de registro AB021127), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (5850-6072), y un cebador RE de PCR (6073-6092).

SEQ ID NO:18 presenta el ejemplo 18 para una construcción de ADN de tiolasa unida al promotor de HydA1 de diseño (1856 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de HydA1 de 282 pb (21-302), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (303-437), una secuencia que codifica la tiolasa (438-1613) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una tiolasa de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (GenBank Z92974), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1614-1836), y un cebador RE de PCR (1837-1856).

SEQ ID NO:19 presenta el ejemplo 19 para una construcción de ADN de 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa unida al promotor de HydA1 de diseño (1550 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de HydA1 de 282 pb (21-302), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (303-437), una secuencia que codifica la 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa (438-1307) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (GenBank Z92974), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1308-1530), y un cebador RE de PCR (1531-1550).

SEQ ID NO:20 presenta el ejemplo 20 para una construcción de ADN de crotonasa unida al promotor de HydA1 de diseño (1457 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de HydA1 de 282 pb (21-302), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (303-437), una secuencia que codifica la crotonasa (438-1214) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una crotonasa de *Thermoanaerobacterium*

thermosaccharolyticum (GenBank Z92974), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1215-1437), y un cebador RE de PCR (1438-1457).

SEQ ID NO:21 presenta el ejemplo 21 para una construcción de ADN de butiril-CoA deshidrogenasa unida al promotor de HydA1 de diseño (1817 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de HydA1 de 282 pb (21-302), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (303-437), una secuencia que codifica la butiril-CoA deshidrogenasa (438-1574) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una butiril-CoA deshidrogenasa de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (GenBank Z92974), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1575-1797), y un cebador RE de PCR (1798-1817).

SEQ ID NO: 22 presenta el ejemplo 22 para una construcción de ADN de butiraldehído deshidrogenasa unida al promotor de HydA1 de diseño (2084 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de HydA1 de 282 pb (21-302), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (303-437), una secuencia que codifica la butiraldehído deshidrogenasa (438-1841) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una butiraldehído deshidrogenasa de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (GenBank AY251646), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1842-2064), y un cebador RE de PCR (2065-2084).

SEQ ID NO: 23 presenta el ejemplo 23 para una construcción de ADN de butanol deshidrogenasa unida al promotor de HydA1 de diseño (1733 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de HydA1 de 282 pb (21-302), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (303-437), una secuencia que codifica la butanol deshidrogenasa (438-1490) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una butanol deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii* (GenBank AF157307), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1491-1713), y un cebador RE de PCR (1714-1733).

Con el mismo principio de emplear un promotor sintético de *Nia1* de 84 pb x 2 y un mecanismo de transporte dirigido al cloroplasto según se mencionó previamente, SEQ ID NO:24-26 muestran más ejemplos de construcciones de ADN de enzimas de diseño. Brevemente, SEQ ID NO:24 presenta el ejemplo 24 para una construcción de ADN de fructosa-difosfato aldolasa de diseño que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de NR de 84 pb x 2 (21-188), una secuencia que codifica la fructosa-difosfato aldolasa (189-1313) seleccionada/modificada a partir de la secuencia de una fructosa-difosfato aldolasa de cloroplasto de *C. reinhardtii* (GenBank: X69969), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1314-1536), y un cebador RE de PCR (1537-1556).

SEQ ID NO: 25 presenta el ejemplo 24 para una construcción de ADN de triosa-fosfato isomerasa de diseño que incluye un promotor de NR de 84 pb x 2 (21-188), una secuencia que codifica la triosa-fosfato isomerasa (189-1136) seleccionada y modificada a partir de una secuencia de la triosa-fosfato isomerasa de cloroplasto de *Arabidopsis thaliana* (GenBank: AF247559), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1137-1359), y un cebador RE de PCR (1360-1379).

SEQ ID NO: 26 presenta el ejemplo 26 para una construcción de ADN de fosfofructosa quinasa de diseño que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de NR de 84 pb x 2 (21-188), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (189-323), una secuencia que codifica la fosfofructosa quinasa (324-1913) seleccionada/modificada a partir de la secuencia de una 6-fosfofructoquinasa de *Arabidopsis thaliana* (GenBank: NM_001037043), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1914-2136), y un cebador RE de PCR (2137-2156).

Las construcciones de ácidos nucleicos, tales como las presentadas en los anteriores ejemplos, pueden incluir otras secuencias apropiadas, tales como un gen marcador de selección y una secuencia de marcador biomolecular opcional (tal como el marcador Lumio descrito en el ejemplo 4, SEQ ID NO:4). Los marcadores seleccionables que pueden seleccionarse para su uso en las construcciones incluyen marcadores que confieren resistencia a la kanamicina, la higromicina, la espectinomina, la estreptomina, la sulfonilurea, la gentamicina, el cloranfenicol, entre otros, todos los cuales han sido clonados y están disponibles para los expertos en la técnica. Como alternativa, el marcador seleccionable es un gen marcador de nutrición que puede complementar una deficiencia en el organismo hospedante. Por ejemplo, puede utilizarse el gen que codifica la argininosuccinato liasa (*arg7*) como gen marcador de selección en la construcción de diseño, que permite la identificación de los transformantes cuando se emplean células de *Chlamydomonas reinhardtii arg7-* (menos) como células hospedantes.

Las construcciones de ácidos nucleicos que portan genes de diseño pueden introducirse en un alga, alga verdeazulada, planta, tejidos o células vegetales hospedantes empleando las técnicas de transformación de genes disponibles, tales como electroporación, captación inducida por PEG, y transporte balístico de ADN, y transformación mediada por *Agrobacterium*. Con el objetivo de transportar una construcción de diseño a células de algas, pueden seleccionarse las técnicas de electroporación, esferas de vidrio y pistola de genes biológica para su uso como métodos preferidos; y se prefiere un alga con células individuales o una estructura de talo sencilla para su uso en la transformación. Los transformantes pueden ser identificados y ensayados basándose en técnicas habituales.

Los diversos genes de diseño pueden introducirse en células hospedantes de modo secuencial de una manera discontinua, o de modo simultáneo empleando una construcción o en una transformación. Por ejemplo, las diez construcciones de ADN mostradas en SEQ ID NO:13-16 (o 17) y 18-23 para la vía de producción de butanol de diez

enzimas que se bifurca desde el 3-fosfoglicerato pueden introducirse en un vector genético, tal como p389-Arg7 con un único marcador de selección (Arg7). Por tanto, mediante el uso de un plásmido de esta manera es posible transportar las diez construcciones de ADN (genes de diseño) a un hospedante de *Chlamydomonas reinhardtii*-arg7 que requiera arginina (CC-48) en una sola transformación para la expresión de la vía de producción de butanol que se bifurca desde el 3-fosfoglicerato (03-12 en la figura 1). Cuando sea necesario, un transformante que contenga las diez construcciones de ADN puede transformarse aún más para introducir más genes de diseño en su ADN genómico con otro marcador de selección, tal como estreptomycin. Mediante el uso de combinaciones de diversas construcciones de ADN de enzimas de diseño, tales como las presentadas en SEQ ID NO:1-26 en la transformación genética con un organismo hospedante apropiado, pueden construirse diversas vías de producción de butanol, tales como las ilustradas en la figura 1. Por ejemplo, las construcciones de ADN de diseño de SEQ ID NO:1-12 pueden seleccionarse para la construcción de una vía de producción de butanol que se bifurca desde el gliceraldehído-3-fosfato (01-12 en la figura 1); las construcciones de ADN de diseño de SEQ ID NO:1-12, 24 y 25 pueden seleccionarse para la construcción de una vía de producción de butanol que se bifurca desde la fructosa-1,6-difosfato (20-33); y las construcciones de ADN de diseño de SEQ ID NO: 1-12 y 24-26 pueden seleccionarse para la construcción de una vía de producción de butanol que se bifurca desde la fructosa-6-fosfato (19-33).

Otras modificaciones del hospedante para potenciar la producción fotosintética de butanol

Un mecanismo de conversión de NADPH/NADH

Según la vía o vías de producción fotosintética de butanol, para producir una molécula de butanol a partir de 4CO_2 y $5\text{H}_2\text{O}$ es probable que se necesiten 14 ATP y 12 NADPH, siendo ambos generados por la disociación fotosintética del agua y la fotofosforilación a través de la membrana tilacoide. Para que la vía de producción de butanol que se bifurca desde el 3-fosfoglicerato (03-12 en la figura 1) pueda funcionar, una práctica preferida es emplear una o más enzimas de la vía de producción de butanol que puedan utilizar NADPH que es generado por el proceso de transporte de electrones fotodirigido. La butanol deshidrogenasa (GenBank n.º de registro: AB257439) y la butiraldehído deshidrogenasa de (GenBank: AY251646) *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* son ejemplos de una enzima de la vía de producción de butanol que es capaz de aceptar NADP(H) o NAD(H). Esta enzima de la vía de producción de butanol que puede emplear ambos NADPH y NADH (es decir, NAD(P)H) también puede seleccionarse para su uso en esta vía de producción de butanol que se bifurca desde el 3-fosfoglicerato y también en cualquier otra de las vías de producción de butanol de diseño (figura 1). La butiril-CoA deshidrogenasa (GenBank n.º de registro: AF494018) y la 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa (GenBank: AF494018) de *Clostridium beijerinckii* son ejemplos de una enzima de la vía de producción de butanol que solo puede aceptar NAD(H). Cuando se emplea una enzima de la vía de producción de butanol que solo utiliza NADH, puede ser necesario un mecanismo de conversión de NADPH/NADH para que esta vía de producción de butanol que se bifurca desde el 3-fosfoglicerato funcione correctamente. Sin embargo, dependiendo del trasfondo genético de un organismo hospedante, puede existir un mecanismo de conversión entre NADPH y NADH en el hospedante, de modo que tanto NADPH como NADH puedan ser utilizados de modo intercambiable en el organismo. Además, se sabe que el NADPH puede convertirse en NADH por medio de una actividad NADPH-fosfatasa (Pattanayak y Chatterjee (1998) "Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate phosphatase facilitates dark reduction of nitrate: regulation by nitrate and ammonia," *Biologia Plantarum*, 41(1):75-84) y que el NAD puede convertirse en NADP por medio de una actividad NAD quinasa (Muto, Miyachi, Usuda, Edwards y Bassham (1981), "Light-induced conversion of nicotinamide adenine dinucleotide to nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in higher plant leaves," *Plant Physiology*, 68(2):324-328; Matsumura-Kadota, Muto, Miyachi (1982), "Light-induced conversion of NAD^+ to NADP^+ in *Chlorella* cells," *Biochimica Biophysica Acta*, 679(2):300-300). Por tanto, cuando se desee una conversión de NADPH/NADH potenciada, el hospedante puede ser genéticamente modificado para potenciar las actividades NADPH fosfatasa y NAD quinasa. Así, en una de las diversas realizaciones, la planta de diseño, el alga o la célula vegetal de diseño contiene además transgenes adicionales de diseño (figura 2B) para que expresen, de modo inducible, una o más enzimas para facilitar la interconversión de NADPH/NADH, tal como la NADPH fosfatasa y la NAD quinasa (GenBank: XM_001609395, XM_001324239), en la región estromática del cloroplasto del alga.

Otra realización que puede proporcionar un mecanismo de conversión de NADPH/NADH es a través de la selección adecuada de un punto de bifurcación apropiado en el ciclo de Calvin del cual se bifurque una vía de producción de butanol de diseño. Para conferir este mecanismo de conversión de NADPH/NADH por medio del diseño de una vía según esta realización, una práctica preferida consiste en bifurcar una vía de producción de butanol de diseño en el punto o después del punto de la gliceraldehído-3-fosfato del ciclo de Calvin, tal como se muestra en la figura 1. En estas vías de diseño, la conversión de NADPH/NADH se logra fundamentalmente por medio de un mecanismo de dos etapas: 1) el uso de la etapa con la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa del ciclo de Calvin, que emplea NADPH para reducir el 1,3-difosfoglicerato a gliceraldehído-3-fosfato; y 2) el uso de la etapa con la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 01 dependiente de NAD^+ de la vía de diseño, que produce NADH cuando oxida el gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-difosfoglicerato. El resultado neto de las dos etapas descritas anteriormente es la conversión de NADPH en NADH, que puede suministrar el poder reductor necesario en forma de NADH para la vía o vías de producción de butanol de diseño. Para la etapa 1), normalmente resulta suficiente el uso de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH del ciclo de Calvin en el organismo hospedante. Por consiguiente, la introducción de una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 01 dependiente de NAD^+ de diseño para que trabaje con la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH del ciclo de Calvin puede conferir la función de un mecanismo de conversión de NADPH/NADH, que es necesario para que la vía de

producción de butanol que se bifurca desde el 3-fosfoglicerato (03-12 en la figura 1) funcione correctamente. Por esta razón, la construcción de ADN de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (ejemplo 12, SEQ ID NO:12) se emplea también como un gen de diseño de conversión de NADPH/NADH (figura 2B) para apoyar a la vía de producción de butanol que se bifurca desde el 3-fosfoglicerato (03-12 en la figura 1) en una de las diversas realizaciones. Esto también explica por qué es importante emplear una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 01 dependiente de NAD^+ para conferir este mecanismo de conversión de NADPH/NADH de dos etapas para la vía o vías de producción de butanol de diseño. Por tanto, en una de las diversas realizaciones, también es una práctica preferida emplear una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , sus isozimas, derivados funcionales, análogos, enzimas modificadas de diseño y/o sus combinaciones en la vía o vías de producción de butanol de diseño, tal como se ilustra en la figura 1.

Técnicas de ARNi para domesticar aún más el mecanismo de regulación de la fotosíntesis

En otra realización de la presente invención, la planta o célula hospedante se modifica aún más para domesticar el ciclo de Calvin de modo que el hospedante pueda producir directamente butanol como combustible líquido, en lugar de sintetizar almidón (glucógeno en el caso de las oxifotobacterias), celulosas y lignocelulosas que a menudo no son eficaces y resultan duras para que la industria de la biorrefinería las use. Según una de las diversas realizaciones, la inactivación de la actividad de síntesis de almidón se logra reprimiendo la expresión de cualquiera de las enzimas clave, tales como la almidón sintasa (glucógeno sintasa en el caso de las oxifotobacterias) 13, glucosa-1-fosfato (G-1-P) adenililtransferasa 14, fosfoglucomutasa 15, y hexosa-fosfato isomerasa 16 de la vía de síntesis de almidón que conecta con el ciclo de Calvin (figura 1).

La introducción de un factor genéticamente transmisible que puede inhibir la actividad de síntesis de almidón que compite con la vía o vías de producción de butanol de diseño por los productos del ciclo de Calvin puede potenciar aún más la producción fotosintética de butanol. En una realización específica, un inhibidor que es genéticamente codificado (figura 2C) para la vía de síntesis de almidón competitiva es una molécula de ARN de interferencia (ARNi), que inhibe específicamente la síntesis de una enzima de la vía de síntesis del almidón, por ejemplo, almidón sintasa 16, glucosa-1-fosfato (G-1-P) adenililtransferasa 15, fosfoglucomutasa 14 y/o hexosa-fosfato isomerasa 13, tal como se muestra con las marcas numéricas 13-16 en la figura 1. Las secuencias de ADN que codifican el ARNi de la almidón sintasa, el ARNi de la glucosa-1-fosfato (G-1-P) adenililtransferasa, el ARNi de una fosfoglucomutasa y/o el ARNi de una G-P-isomerasa, respectivamente, pueden diseñarse y sintetizarse basándose en técnicas de ARN de interferencia conocidas por los expertos en la técnica (Liszewski (1 de junio, 2003), Progress in RNA interference, *Genetic Engineering News*, vol. 23, n.º 11, pp. 1-59). En términos generales, una molécula de ARN de interferencia (ARNi) es antisentido, pero complementaria con un ARNm normal de una proteína (gen) concreta, de modo que dicha molécula de ARNi puede unirse específicamente con el ARNm normal del gen concreto, inhibiendo (bloqueando) con ello la traducción del ARNm específico de gen en la proteína (Fire, Xu, Montgomery, Kostas, Driver, Mello (1998), "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*", *Nature*, 391(6669):806-811; Dykxhoorn, Novina, Sharp (2003), "Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4(6):457-467).

Los ejemplos de construcciones de ADN del ARNi de la síntesis de almidón de diseño (figura 2C) se muestran en SEQ ID NO:27 y 28 listadas. Brevemente, SEQ ID NO: 27 presenta el ejemplo 27 para una construcción de ADN del ARNi de la almidón sintasa controlada por el promotor de Nia1 de diseño (860 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de Nia1 de 262 pb (21-282), una secuencia de ARNi de la almidón sintasa (283-617) que consiste en un codón de inicio atg y una secuencia de complemento inverso de dos fragmentos de secuencia exclusivos de una secuencia de ARNm de la almidón sintasa de *Chlamydomonas reinhardtii* (GenBank: AF026422), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (618-850), y un cebador RE de PCR (851-860). Debido al uso de un promotor de Nia1 (21-282), este gen del ARNi de la síntesis de almidón de diseño se diseña para ser expresado solo cuando sea necesario potenciar la producción fotobiológica de butanol en presencia de su inductor específico, el nitrato (NO_3^-), que puede añadirse al medio de cultivo como fertilizante para la inducción de los organismos de diseño. La secuencia de ARNi de la almidón sintasa (283-617) se diseña para que se una con el ARNm normal del gen de la almidón sintasa, y así bloquea su traducción en una almidón sintasa funcional. La inhibición de la actividad almidón/glucógeno sintasa en 16 de esta manera se realiza para canalizar más productos fotosintéticos del ciclo de Calvin hacia la vía o vías de producción de butanol que se bifurcan del ciclo de Calvin, tal como la vía de producción de butanol que se bifurca desde el gliceraldehído-3-fosfato 01-12, según se ilustra en la figura 1.

SEQ ID NO:28 presenta el ejemplo 28 para una construcción de ADN del ARNi de la almidón sintasa controlada por el promotor de HydA1 (1328 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de HydA1 de 282 pb (21-302), una secuencia de ARNi de la almidón sintasa de diseño (303-1085), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1086-1308), y un cebador RE de PCR (1309-1328). La secuencia de ARNi de la almidón sintasa de diseño (303-1085) comprende: un fragmento sentido de 300 pb (303-602) seleccionado de las primeras 300 pb de la secuencia codificadora exclusiva de una secuencia de ARNm de la almidón sintasa de *Chlamydomonas reinhardtii* (GenBank: AF026422), un bucle similar a un intrón de diseño de 183 pb (603-785), y una secuencia antisentido de 300 pb (786-1085) complementaria con las primeras 300 pb de la secuencia codificadora de una secuencia de ARNm de la almidón sintasa de *Chlamydomonas reinhardtii* (GenBank: AF026422). Esta secuencia de ARNi de la almidón sintasa de diseño (303-1085) se diseña para que inhiba la síntesis de la almidón sintasa por medio de los siguientes dos mecanismos. En primer lugar, la secuencia de ARNi complementaria antisentido de 300 pb (que se

corresponde con la secuencia de ADN 786-1085) se une con el ARNm normal del gen de la almidón sintasa, bloqueando así su traducción en una almidón sintasa funcional. En segundo lugar, la secuencia de ARNi complementaria antisentido de 300 pb (que se corresponde con la secuencia de ADN 786-1085) también puede unirse con el homólogo sentido de 300 pb (que se corresponde con la secuencia de ADN 303-602) en la misma molécula de ARNi de diseño, formando una estructura de ARN bicatenario similar a una horquilla con la secuencia similar a un intrón de diseño de 183 pb (603-785) como un bucle. Estudios experimentales han demostrado que este tipo de ARN bicatenario similar a una horquilla también puede activar el silenciamiento postranscripcional de genes (Fuhrmann, Stahlberg, Govorunova, Rank y Hegemann (2001), *Journal of Cell Science*, 114:3857-3863). Debido al uso de un promotor de HydA1 (21-302), este gen del ARNi de la síntesis de almidón de diseño se diseña par ser expresado solo bajo condiciones anaerobias cuando sea necesario para potenciar la producción fotobiológica de butanol mediante la canalización de más productos fotosintéticos del ciclo de Calvin hacia la vía o vías de producción de butanol, tales como 01-12, 03-12, y/o 20-33, según se ilustra en la figura 1.

Genes de la glicólisis y la degradación del almidón de diseño

En otra realización de la presente invención, la producción fotobiológica de butanol se potencia mediante la incorporación de un conjunto adicional de genes de diseño (figura 2D) que pueden facilitar la degradación y glicólisis del almidón/glucógeno en combinación con el gen o genes de producción de butanol de diseño (figura 2A). Estos genes de diseño adicionales para la degradación del almidón incluyen, por ejemplo, genes que codifican, para 17: la amilasa, la almidón fosforilasa, la hexoquinasa, la fosfoglucomutasa y, para 18: la glucosa fosfato isomerasa (G-P-isomerasa), tal como se ilustra en la figura 1. Los genes de la glicólisis de diseño codifican enzimas de la glicólisis dirigidas al cloroplasto: glucosa fosfato isomerasa 18, fosfofructosa quinasa 19, aldolasa 20, triosa fosfato isomerasa 21, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 22, fosfoglicerato quinasa 23, fosfoglicerato mutasa 24, enolasa 25, y piruvato quinasa 26. Los genes de la glicólisis y degradación del almidón de diseño, en combinación con cualquiera de las vías de producción de butanol mostradas en la figura 1, pueden formar otras vías partir del almidón/glucógeno hasta el butanol (17-33). Por consiguiente, la coexpresión de los genes de la glicólisis y la degradación del almidón de diseño con los genes de la vía de producción de butanol puede potenciar también la producción fotobiológica de butanol. Por tanto, esta realización representa otra estrategia para domesticar el ciclo de Calvin para una producción fotobiológica potenciada de butanol. En este caso, algunos de los productos del ciclo de Calvin fluyen a través de la vía de síntesis de almidón (13-16), seguida de la vía del almidón/glucógeno hasta el butanol (17-33), tal como se muestra en la figura 1. En este caso, el almidón/glucógeno actúa como depósito de almacenamiento transitorio de los productos del ciclo de Calvin antes de que puedan convertirse en butanol. Este mecanismo es bastante útil para maximizar el rendimiento de producción de butanol en ciertos casos. Por ejemplo, con una alta intensidad de luz solar, tal como alrededor del mediodía, la tasa de fijación fotosintética del CO₂ del ciclo de Calvin puede ser tan alta que exceda la máxima tasa de capacidad de una vía o vías de producción de butanol; el uso de los mecanismos de síntesis de almidón permite el almacenamiento temporal del exceso de productos fotosintéticos para ser utilizados más tarde también para la producción de butanol.

La figura 1 también ilustra el uso de una vía del almidón/glucógeno hasta el butanol de diseño con enzimas de diseño (marcadas como 17 a 33) en combinación con una vía o vías de producción de butanol de diseño que se bifurcan del ciclo de Calvin, tal como la vía de producción de butanol que se bifurca desde el gliceraldehído-3-fosfato 01-12, para una producción fotobiológica potenciada de butanol. Similar a los beneficios de emplear las vías de producción de butanol de diseño que se bifurcan del ciclo de Calvin, el uso de la vía del almidón/glucógeno hasta el butanol de diseño (17-33) también puede ayudar a convertir los productos fotosintéticos en butanol antes de que los azúcares se conviertan en otras biomoléculas complejas, tales como biomasas lignocelulósicas, que no pueden ser empleadas con facilidad por las industrias de la biorrefinería. Por tanto, el uso apropiado de la vía o vías de producción de butanol de diseño que se bifurcan del ciclo de Calvin (tales como 01-12, 03-12, y/o 20-33) y/o la vía del almidón/glucógeno hasta el butanol de diseño (17-33), puede representar una tecnología revolucionaria que, entre otras cuestiones, puede sortear de modo eficaz los problemas de cuello de botella de la actual tecnología de biomasa, que incluyen el problema de la "recalcitrancia lignocelulósica".

Otra característica es que la actividad de la vía de producción de butanol de diseño que se bifurca del ciclo de Calvin (tal como 01-12, 03-12, y/o 20-33) puede aparecer predominantemente durante los días en que haya luz, porque emplea un producto intermedio del ciclo de Calvin que requiere un suministro de poder reductor (NADPH) y energía (ATP) generado por la disociación fotosintética del agua y el proceso de transporte de electrones acoplado a la translocación de protones activado por la luz a través del sistema de las membranas tilacoides. La vía del almidón/glucógeno hasta el butanol de diseño (17-33) que puede utilizar el superávit de azúcar que ha sido almacenado como almidón/glucógeno durante la fotosíntesis, puede funcionar no solo durante el día, sino también por la noche. Por consiguiente, el uso de una vía de producción de butanol de diseño que se bifurca del ciclo de Calvin (tales como 01-12, 03-12, y/o 20-33) junto con una vía o vías del almidón/glucógeno hasta el butanol de diseño (17-33), tal como se ilustra en la figura 1, permite la producción de butanol durante el día y la noche.

Debido a que la expresión de la vía o vías del almidón/glucógeno hasta el butanol de diseño y la vía o vías de producción de butanol de diseño que se bifurcan del ciclo de Calvin están controladas por el uso de un promotor inducible, tal como un promotor de hidrogenasa anaerobio, este tipo de organismos de diseño también son capaces de crecer de modo fotoautótrofo bajo condiciones aerobias (normales). Cuando los organismos fotosintéticos de diseño se cultivan y están listos para la producción fotobiológica de butanol, las células entonces se colocan bajo

condiciones inductoras específicas, tales como bajo condiciones anaerobias [o el uso de un desplazamiento de fertilizante desde amonio a nitrato, si se emplea la vía o vías de producción de butanol controladas por el promotor *Nia1/nirA* de diseño] para la producción potenciada de butanol, tal como se muestra en las figuras 1 y 3.

Se muestran ejemplos de genes de degradación del almidón (glucógeno) en las SEQ ID NO:29-33 listadas. Brevemente, SEQ ID NO:29 presenta el ejemplo 29 para una construcción de ADN de amilasa de diseño (1889 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de NR de 84 pb x 2 (21-188), un sitio *Xho I NdeI* de 9 pb (189-197), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (198-332), una secuencia que codifica la amilasa (333-1616) seleccionada y modificada a partir de una alfa-amilasa de la cebada (GenBank: J04202A my46 expresión ensayada en células de aleurona), una secuencia del marcador Lumio de 21 pb (1617-1637), un sitio *XbaI* de 9 pb (1638-1646), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1647-1869), y un cebador RE de PCR (1870-1889).

SEQ ID NO:30 presenta el ejemplo 30 para una construcción de ADN de almidón fosforilasa de diseño (3089 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de NR de 84 pb x 2 (21-188), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (189-323), una secuencia que codifica la almidón fosforilasa (324-2846) seleccionada y modificada a partir de una secuencia de almidón fosforilasa de raíces de cítricos (GenBank: AY098895, expresión ensayada en raíces de cítricos), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (2847-3069), y un cebador RE de PCR (3070-3089).

SEQ ID NO:31 presenta el ejemplo 31 para una construcción de ADN de hexosa quinasa de diseño (1949 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de NR de 84 pb x 2 (21-188), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (189-323), una secuencia que codifica la hexosa quinasa (324-1706) seleccionada y modificada a partir de una secuencia de ARNm de hexoquinasa de *Ajellomyces capsulatus* (Genbank: XM_001541513), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1707-1929), y un cebador RE de PCR (1930-1949).

SEQ ID NO:32 presenta el ejemplo 32 para una construcción de ADN de fosfoglucomutasa de diseño (2249 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de NR de 84 pb x 2 (21-188), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (189-323), una secuencia que codifica la fosfoglucomutasa (324-2006) seleccionada y modificada a partir de una secuencia de fosfomutasa de *Pichia stipitis* (GenBank: XM_001383281), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (2007-2229), y un cebador RE de PCR (2230-2249).

SEQ ID NO:33 presenta el ejemplo 33 para una construcción de ADN de glucosa-fosfato isomerasa de diseño (2231 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de NR de 84 pb x 2 (21-188), un péptido de tránsito de *RbcS2* de 135 pb (189-323), una secuencia que codifica la glucosa-fosfato isomerasa (324-1988) seleccionada y modificada a partir de una secuencia de glucosa-fosfato isomerasa de *S. cerevisiae* (GenBank: M21696), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (1989-2211), y un cebador RE de PCR (2212-2231).

Los genes de la degradación del almidón de diseño, tales como los que aparecen en SEQ ID NO:29-33, pueden seleccionarse para su uso en combinación con cualquiera de los genes de la vía de producción de butanol de diseño para la construcción de diversas vías de producción de butanol de la degradación del almidón de diseño, tales como las vías mostradas en figura 1. Por ejemplo, los genes de diseño que aparecen en SEQ ID NO:1-12, 24-26, y 29-33 pueden seleccionarse para la construcción de una vía de producción de butanol desde el almidón controlada por el promotor de *Nia1* que incluye las siguientes enzimas de diseño: amilasa, almidón fosforilasa, hexoquinasa, fosfoglucomutasa, glucosa-fosfato isomerasa, fosfofructosa quinasa, fructosa difosfato aldolasa, triosa fosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa, piruvato quinasa, piruvato-NADP⁺ oxidorreductasa (o piruvato-ferredoxina oxidorreductasa), tiolasa, 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa, butiraldehído deshidrogenasa, y butanol deshidrogenasa. Esta vía del almidón/glucógeno hasta el butanol 17-33 puede emplearse por sí sola y/o en combinaciones con otra vía o vías de producción de butanol, tales como la vía de producción de butanol que se bifurca desde el 3-fosfoglicerato 03-12, según se ilustra en la figura 1.

45 *Distribución de las vías de producción de butanol de diseño entre el cloroplasto y el citoplasma*

En otra realización de la presente invención, la productividad fotobiológica del butanol se potencia mediante una distribución seleccionada de la vía o vías de producción de butanol de diseño entre el cloroplasto y el citoplasma en una célula vegetal eucariota. Es decir, no todas las vías de producción de butanol de diseño (figura 1) deben funcionar en el cloroplasto; cuando sea necesario, parte de las vías de producción de butanol de diseño pueden funcionar también en el citoplasma. Por ejemplo, en una de las diversas realizaciones, una parte significativa de la actividad de la vía del almidón hasta el butanol de diseño, desde la dihidroxiacetona fosfato hasta el butanol (21-33), se diseña para que se produzca en el citoplasma, mientras que las etapas desde el almidón hasta la dihidroxiacetona fosfato (17-20) se producen en el cloroplasto. En este ejemplo, el enlace entre las partes en el cloroplasto y en el citoplasma de la vía de diseño se logra mediante el uso de un translocador de triosa fosfato-fosfato, que facilita la translocación de la dihidroxiacetona a través de la membrana del cloroplasto. Mediante el uso del translocador de triosa fosfato-fosfato, también se permite el funcionamiento de la vía de producción de butanol de diseño que se bifurca desde el gliceraldehído-3-fosfato no solo en el cloroplasto, sino también en el citoplasma. La parte del citoplasma de la vía de producción de butanol de diseño pueden construirse mediante el uso de genes de la vía de producción de butanol de diseño (construcciones de ADN de la figura 2A), omitiéndose su secuencia de

transporte dirigido al cloroplasto, tal como se muestra en la 2E.

Oxifotobacterias de diseño con vías de producción de butanol de diseño en el citoplasma

- En organismos fotosintéticos procariotas, tales como algas verdeazuladas (oxifotobacterias, que incluyen cianobacterias y oxiclolorobacterias), que generalmente contienen membranas tilacoides fotosintéticas pero no una estructura de cloroplasto, el ciclo de Calvin se localiza en el citoplasma. En este caso especial, la vía o vías de producción de butanol de diseño completas (figura 1) que incluyen, pero no se limitan a la vía de producción de butanol que se bifurca desde la gliceraldehído-3-fosfato (01-12), la vía de producción de butanol que se bifurca desde el 3-fosfoglicerato (03-12), la vía que se bifurca desde la fructosa-1,6-difosfato (20-33), la vía que se bifurca desde la fructosa-6-fosfato (19-33), y las vías desde el almidón (o glucógeno) hasta el butanol (17-33) se ajustan en su diseño para que funcionen con el ciclo de Calvin en el citoplasma de un alga verdeazulada. La construcción de las vías de producción de butanol de diseño del citoplasma puede lograrse mediante el uso de genes de la vía de producción de butanol de diseño (construcciones de ADN de la figura 2A), omitiéndose su secuencia de transporte dirigido al cloroplasto. Cuando la secuencia de transporte dirigido al cloroplasto se omite en la construcción o construcciones de ADN de diseño, tal como se ilustra en la figura 2E, el gen o genes de diseño se transcriben y se traducen en las enzimas de diseño en el citoplasma, en donde se introducen en la vía o vías de producción de butanol de diseño. El gen o genes de diseño pueden incorporarse en el ADN cromosómico y/o plasmídico en un alga verdeazulada hospedante (oxifotobacterias, que incluyen cianobacterias y oxiclolorobacterias) empleando las técnicas de la transformación de genes conocidas por los expertos en la técnica. Una práctica preferida consiste en integrar los genes de diseño a través de una transformación integradora en el ADN cromosómico, que habitualmente proporciona mejor estabilidad genética a los genes de diseño. En las oxifotobacterias, tales como cianobacterias y oxiclolorobacterias, la transformación integradora puede lograrse a través de un proceso de recombinación doble de ADN homólogo en el ADN cromosómico del hospedante, empleando una construcción de ADN según se ilustra en la figura 2F, que generalmente consiste, desde 5' cadena arriba hasta 3' cadena abajo, en: un sitio de recombinación 1, un gen o genes de la vía de producción de butanol de diseño, y un sitio de recombinación 2. Este tipo de construcciones de ADN (figura 2F) pueden introducirse en las oxifotobacterias (algas verdeazuladas) con una serie de técnicas de transformación genética disponibles, que incluyen electroporación, transformación natural y/o conjugación. Los organismos transgénicos de diseño creados a partir de algas verdeazuladas también se denominan algas verdeazuladas de diseño (oxifotobacterias de diseño, que incluyen cianobacterias de diseño y oxiclolorobacterias de diseño).
- Se muestran ejemplos de genes de la vía de producción de butanol de oxifotobacterias de diseño en las SEQ ID NO:34-45 listadas. Brevemente, SEQ ID NO:34 presenta el ejemplo 34 para una construcción de ADN de butanol deshidrogenasa de oxifotobacterias de diseño (1709 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nitrato reductasa (*nirA*) de 400 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21-420), una secuencia codificadora de enzima (421-1569) seleccionada y modificada a partir de una secuencia de la butanol deshidrogenasa de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (AB257439), un terminador de *rbcS* de 120 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (1570-1689), y un cebador RE de PCR (1690-1709) en el extremo 3'.
- SEQ ID NO:35 presenta el ejemplo 35 para una construcción de ADN de butiraldehído deshidrogenasa de oxifotobacterias de diseño (1967 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nitrato reductasa (*nirA*) de 400 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21-420), una secuencia codificadora de enzima (421-1827) seleccionada y modificada a partir de una secuencia de la butiraldehído deshidrogenasa de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (AY251646), un terminador de *rbcS* de 120 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (1828-1947), y un cebador RE de PCR (1948-1967) en el extremo 3'.
- SEQ ID NO:36 presenta el ejemplo 36 para una construcción de ADN de butiril-CoA deshidrogenasa de oxifotobacterias de diseño (1602 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nitrato reductasa de 305 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21-325), una secuencia que codifica la butiril-CoA deshidrogenasa (326-1422) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una butiril-CoA deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii* (AF494018), un terminador de *rbcS* de 120 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (1423-1582), y un cebador RE de PCR (1583-1602) en el extremo 3'.
- SEQ ID NO:37 presenta el ejemplo 37 para una construcción de ADN de crotonasa de oxifotobacterias de diseño (1248 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nitrato reductasa de 305 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21-325), una secuencia que codifica la crotonasa (326-1108) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una crotonasa de *Clostridium beijerinckii* (GenBank: AF494018), un terminador de *rbcS* de 120 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (1109-1228), y un cebador RE de PCR (1229-1248).
- SEQ ID NO:38 presenta el ejemplo 38 para una construcción de ADN de 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa de oxifotobacterias de diseño (1311 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de *nirA* de 305 pb procedente de (21-325), una secuencia que codifica la 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa (326-1171) seleccionada/modificada a partir de la secuencia de una 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii* (GenBank: AF494018), un terminador de *rbcS* de 120 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (1172-1291), y un cebador RE de PCR (1292-1311).

SEQ ID NO:39 presenta el ejemplo 39 para una construcción de ADN de tiolasa de oxifotobacterias de diseño (1665 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nirA de 305 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21-325), una secuencia que codifica la tiolasa (326-1525) seleccionada/modificada a partir de una secuencia de tiolasa de *Butyrivibrio fibrisolvens* (AB190764), un terminador de *rbcS* de 120 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (1526-1645), y un cebador RE de PCR (1646-1665).

SEQ ID NO:40 presenta el ejemplo 40 para una construcción de ADN de piruvato-ferredoxina oxidorreductasa de oxifotobacterias de diseño (4071 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nirA de 305 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21-325), una secuencia que codifica la piruvato-ferredoxina oxidorreductasa (326-3931) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una piruvato-ferredoxina oxidorreductasa de *Mastigamoeba balamuthi* (GenBank: AY101767), un terminador de *rbcS* de 120 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (3932-4051), y un cebador RE de PCR (4052-4071).

SEQ ID NO:41 presenta el ejemplo 41 para una construcción de ADN de piruvato quinasa de oxifotobacterias de diseño (1806 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nirA de 305 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21-325), una secuencia que codifica la piruvato quinasa (326-1666) seleccionada/modificada a partir de una piruvato quinasa de *Thermoproteus tenax* (GenBank: AF065890), un terminador de *rbcS* de 120 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (1667-1786), y un cebador RE de PCR (1787-1806) en el extremo 3'.

SEQ ID NO:42 presenta el ejemplo 42 para una construcción de ADN de enolasa de oxifotobacterias de diseño (1696 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nirA de 231 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21-251), una secuencia que codifica la enolasa (252-1556) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una enolasa citosólica de *Chlamydomonas reinhardtii* (GenBank: X66412, P31683), un terminador de *rbcS* de 120 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (1557-1676), y un cebador RE de PCR (1677-1696) en el extremo 3'.

SEQ ID NO:43 presenta el ejemplo 43 para una construcción de ADN de fosfoglicerato mutasa de oxifotobacterias de diseño (2029 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nirA de 231 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21-251), una secuencia que codifica la fosfoglicerato mutasa (252-1889) seleccionada/modificada a partir de las secuencias de una fosfoglicerato mutasa de *Pelotomaculum thermopropionicum* SI (GenBank: YP_001213270), un terminador de *rbcS* de 120 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (1890-2009), y un cebador RE de PCR (2010-2029) en el extremo 3'.

SEQ ID NO:44 presenta el ejemplo 44 para una construcción de ADN de fosfoglicerato quinasa de oxifotobacterias de diseño (1687 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nirA de 231 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21-251), una secuencia que codifica la fosfoglicerato quinasa (252-1433) seleccionada a partir de una fosfoglicerato quinasa de *Pelotomaculum thermopropionicum* SI (BAF60903), un terminador de *rbcS* de 234 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (1434-1667), y un cebador RE de PCR (1668-1687).

SEQ ID NO:45 presenta el ejemplo 45 para una construcción de ADN de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de oxifotobacterias de diseño (1514 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de nirA de 305 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21-325), una secuencia codificadora de enzima (326-1260) seleccionada y modificada a partir de una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD de *Blastochloris viridis* (CAC80993), un terminador de *rbcS* de 234 pb de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (1261-1494), y un cebador RE de PCR (1495-1514).

Los genes de oxifotobacterias de diseño, tales como los que aparecen en SEQ ID NO:34-45, pueden seleccionarse para su uso completos, en parte y/o en combinación con diversos otros genes de la vía de producción de butanol de diseño para la construcción de diversas otras vías de producción de butanol en oxifotobacterias de diseño, tales como las vías mostradas en figura 1. Por ejemplo, los genes de diseño que aparecen en SEQ ID NO:34-45 pueden seleccionarse para la construcción de una vía de producción de butanol se bifurca desde el la gliceraldehído-3-fosfatasa controlada por el promotor de nirA de oxifotobacterias (01-12) que comprende las siguientes enzimas de diseño: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD 01, fosfoglicerato quinasa 02, fosfoglicerato mutasa 03, enolasa 04, piruvato quinasa 05, piruvato-ferredoxina oxidorreductasa (o piruvato-NADP⁺ oxidorreductasa) 06, tiolasa 07, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa 08, crotonasa 09, butiril-CoA deshidrogenasa 10, butiraldehído deshidrogenasa 11, y butanol deshidrogenasa 12. El uso de estos genes de la vía de producción de butanol de oxifotobacterias de diseño (SEQ ID NO:34-45) en una cianobacteria termófila y/o termotolerante puede representar una oxifotobacteria productora de butanol termófila y/o termotolerante. Por ejemplo, el uso de estos genes de diseño (SEQ ID NO:34-45) en una cianobacteria termófila/termotolerante, tal como *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, puede representar una cianobacteria productora de butanol termófila/termotolerante de diseño, tal como *Thermosynechococcus productora de butanol de diseño*.

Otras modificaciones del hospedante para ayudar a asegurar la bioseguridad

La presente también proporciona métodos de producción fotosintética de biocombustible con protección de

bioseguridad basados en plantas transgénicas o células vegetales de diseño que se controlan por medio de la división celular (tales como algas y oxifotobacterias). El organismo fotosintético de diseño controlable por medio de la división celular (figura 3) se crea mediante el uso de un gen o genes de control de la bioseguridad de diseño (figura 2G) junto con el gen o genes de la vía de producción de butanol de diseño (figuras 2A-2F), de modo que su división celular y la función de apareamiento pueden detenerse de modo controlable para proporcionar mejores características de bioseguridad.

En una de las diversas realizaciones, una característica fundamental es que el organismo controlable por medio de la división celular de diseño (tal como un alga, una célula vegetal o una oxifotobacteria) contiene dos funciones clave (figura 3A): un mecanismo o mecanismos de bioseguridad de diseño y una vía o vías de producción de biocombustible de diseño. Tal como se muestra en la figura 3B, la característica o características de bioseguridad de diseño son conferidas por una serie de mecanismos que incluyen: (1) la inserción inducible de canales de protones de diseño en la membrana citoplásmica para inutilizar permanentemente cualquier capacidad de división celular y de apareamiento, (2) la aplicación selectiva de una proteína reguladora del ciclo de división celular de diseño o ARN de interferencia (ARNi) para inhibir permanentemente el ciclo de división celular y preferiblemente mantener la célula en la fase G₁ o el estado G₀, y (3) el uso innovador de un organismo fotosintético hospedante que requiere una alta cantidad de CO₂ para la expresión de la vía o vías de producción de biocombustible de diseño. Los ejemplos de la vía o vías de producción de biocombustibles de diseño incluyen la vía o vías de producción de butanol de diseño, que actúan con el ciclo de Calvin para sintetizar un biocombustible, tal como butanol, directamente a partir de dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O). La tecnología de control de la división celular de diseño puede ayudar a asegurar la bioseguridad cuando se emplean los organismos de diseño para la producción fotosintética de biocombustibles. Por consiguiente, esta realización proporciona, entre otras cuestiones, métodos con protección de bioseguridad para producir biocombustibles basados en un alga, cianobacteria, oxicrobacteria, planta o célula vegetal productora de biocombustible de diseño controlable por medio de la división celular.

En una de las diversas realizaciones, se crea una célula vegetal o alga eucariota que produce butanol de diseño controlable por medio de la división celular mediante la introducción de un gen del canal de protones de diseño (figura 2H) en un alga o célula vegetal hospedante (figura 3B). SEQ ID NO: 46 presenta el ejemplo 46 para una construcción de ADN detallada de un gen del canal de protones controlada por el promotor Nia1 de diseño (609 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de Nia1 de 262 pb (21-282), una secuencia que codifica el canal de protones de melitina (283-366), un terminador de *RbcS2* de 223 pb (367-589), y un cebador RE de PCR (590-609).

La expresión del gen del canal de protones de diseño (figura 2H) es controlada por un promotor inducible, tal como el promotor de la nitrato reductasa (Nia1), que también puede utilizarse para controlar la expresión de un gen o genes de la vía de producción de biocombustible de diseño. Por tanto, antes de inducir la expresión del gen o genes de diseño, el organismo de diseño puede crecer de modo fotoautótrofo empleando CO₂ como fuente de carbono y H₂O como fuente de electrones, igual que el organismo de tipo salvaje. Cuando el cultivo del organismo de diseño se cultiva y está listo para la producción fotobiológica de biocombustible, el cultivo celular se coloca bajo condiciones inductoras específicas (tales como la adición de nitrato en el medio de cultivo, si se emplea el promotor de la nitrato reductasa (Nia1) como promotor inducible) para inducir la expresión del gen del canal de protones de diseño y del gen o genes de la vía de producción de biocombustible de diseño. La expresión del gen del canal de protones se diseña para que se produzca a través de su transcripción en el núcleo y su traducción en el citosol. Debido al diseño molecular específico, los canales de protones expresados se insertan automáticamente en la membrana citoplásmica, pero dejan intacta a la membrana tilacoide fotosintética. La inserción de los canales de protones de diseño en la membrana citoplásmica colapsa el gradiente de protones a través de la membrana citoplásmica, de modo que la división celular y la función de apareamiento quedan permanentemente inutilizadas. Sin embargo, la membrana tilacoide fotosintética dentro del cloroplasto se mantiene intacta (funcional), de modo que las enzimas de la vía de producción de biocombustible de diseño expresadas en la región estromática pueden trabajar con el ciclo de Calvin para la producción fotobiológica de biocombustibles a partir de CO₂ y H₂O. Es decir, cuando el gen del canal de protones de diseño y el gen o genes de la vía de producción de biocombustible de diseño se activan, el organismo de diseño se convierte en una célula que no puede reproducirse para la producción fotosintética dedicada de biocombustibles. Debido a que la división celular y la función de apareamiento están permanentemente inutilizadas (muertas) en esta etapa, el cultivo de organismos de diseño ya no es una materia viva, excepto por su función catalítica para la conversión fotoquímica de CO₂ y H₂O en un biocombustible. Ya no es capaz de aparearse ni de intercambiar material genético con ninguna otra célula, aunque se pusiera en contacto de alguna forma con una célula de tipo salvaje, tal como sería el caso de una liberación accidental hacia el entorno.

Según una de las diversas realizaciones, el promotor de la nitrato reductasa (Nia1) o el promotor de la nitrito reductasa (*nirA*) son promotores inducibles preferidos para su uso para controlar la expresión de los genes de diseño. En presencia de amonio (pero no de nitrato) en el medio de cultivo, por ejemplo, un organismo de diseño con un gen del canal de protones de diseño controlado por el promotor de Nia1 y un gen o genes de la vía de producción de biocombustible puede crecer de modo fotoautótrofo empleando CO₂ como fuente de carbono y H₂O como fuente de electrones, igual que el organismo de tipo salvaje. Cuando el cultivo del organismo de diseño se cultiva y está listo para la producción fotobiológica de biocombustible, la expresión del gen del canal de protones de diseño y el gen o genes de la vía de producción de biocombustible de diseño puede ser inducida entonces mediante la adición de algún fertilizante de nitrato al medio de cultivo. El nitrato está muy presente en suelos y en casi toda el agua

superficial del planeta. Por tanto, aunque un organismo de diseño controlado por el promotor de *Nia1* se liberase accidentalmente hacia el entorno natural, pronto moriría puesto que el entorno activaría la expresión del gen del canal de protones de diseño controlado por el promotor de *Nia1*, que inserta canales de protones en la membrana citoplásmica y, con ello, mata a la célula. Es decir, un organismo fotosintético de diseño con un gen del canal de protones controlado por el promotor de *Nia1* está programado para morir en cuanto detecta nitrato en el entorno. Esta característica de los organismos de diseño controlables por la división celular con un gen del canal de protones controlado por el promotor de *Nia1* proporciona una característica de bioseguridad añadida.

La técnica de la construcción de genes de canales de protones (figura 2H) con una secuencia de transporte dirigido a la membrana tilacoide ha sido descrita recientemente [James W. Lee (2007), Designer proton-channel transgenic algae for photobiological hydrogen production, publicación internacional PCT n.º: WO 2007/134340 A2]. En la presente invención para crear un organismo de diseño controlable por medio de la división celular, la secuencia de transporte dirigido a la membrana tilacoide debe omitirse en el diseño del gen del canal de protones. Por ejemplo, los componentes fundamentales de un gen del canal de protones de diseño controlado por el promotor de *Nia1* pueden ser simplemente un promotor de *Nia1* unido a una secuencia que codifica un canal de protones (sin ninguna secuencia de transporte dirigido a la membrana tilacoide), de modo que el canal de protones se insertará en la membrana citoplásmica, pero no en la membrana tilacoide fotosintética.

Según una de las diversas realizaciones, una práctica preferida es emplear el mismo promotor inducible, tal como el promotor de *Nia1*, para controlar la expresión del gen del canal de protones de diseño y los genes de la vía de producción de biocombustible de diseño. De esta forma, la vía o vías de producción de biocombustible de diseño pueden ser expresadas de modo inducible simultáneamente con la expresión del gen del canal de protones de diseño que detiene ciertas funciones celulares, que incluyen la división celular y el apareamiento.

En una de las diversas realizaciones, un promotor inducible que puede emplearse en esta realización de bioseguridad de diseño se selecciona del grupo que consiste en promotores de hidrogenasa [*HydA1* (*Hyd1*) y *HydA2*, n.º de registro: AJ308413, AF289201, AY090770], el promotor del gen *Cyc6*, el promotor del gen *Cpx1*, el promotor de la proteína de choque térmico *HSP70A*, el promotor del gen *CabII-1* (n.º de registro M24072), el promotor del gen *Ca1* (n.º de registro P20507), el promotor del gen *Ca2* (n.º de registro P24258), el promotor de la nitrato reductasa (*Nia1*), los promotores del gen de la nitrito reductasa (*nirA*), los promotores *hox* del gen de hidrogenasa bidireccional, los promotores *groE* que responden a la luz y al calor, los promotores *rbcL* del operón de rubisco, el promotor *smt* inducible por metales (cinc), el promotor *idiA* que responde al hierro, el promotor *crhR* que responde a redox, el promotor *hsp16.6* del gen de choque térmico, el promotor de la proteína del choque térmico pequeña (*Hsp*), los promotores del gen de anhidrasa carbónica que responden a CO_2 , el promotor *cpcB2A2* que responde a la luz verde/roja, los promotores *lexA*, *recA* y *ruvB* que responden a la luz UV, los promotores del gen de la nitrato reductasa (*narB*), y sus combinaciones.

En otra realización, se crea un organismo fotosintético controlable por medio de la división celular mediante el uso de un mutante deficiente en anhidrasa carbónica o un mutante que requiere una alta cantidad de CO_2 como organismo hospedante, para crear el organismo de producción de biocombustible de diseño. Los mutantes que requieren una alta cantidad de CO_2 que pueden seleccionarse para su uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a: *Chlamydomonas reinhardtii* mutante deficiente en anhidrasa carbónica 12-1C (CC-1219 cal mt-), *Chlamydomonas reinhardtii* mutante *cia3* (*Plant Physiology*, 2003, 132:2267-2275), el mutante que requiere una alta cantidad de CO_2 M3 de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942, o las células deficientes en carboxisomas de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Plant Biol.* (Stuttg.), 2005, 7:342-347) que carece del mecanismo de concentración de CO_2 y puede crecer de modo fotoautótrofo solo bajo un nivel elevado de concentración de CO_2 , tal como CO_2 al 0,2-3%.

Bajo un nivel de concentración atmosférica de CO_2 (380 ppm), los mutantes deficientes en anhidrasa carbónica o que necesitan una alta cantidad de CO_2 habitualmente no pueden sobrevivir. Por tanto, en este caso, el concepto clave es que un organismo de producción de biocombustible de diseño que requiere una alta cantidad de CO_2 que carezca del mecanismo de concentración de CO_2 se cultivará y empleará para la producción fotobiológica de biocombustibles siempre bajo un nivel elevado de concentración de CO_2 (CO_2 al 0,2-5%) en un biorreactor sellado con alimentación de CO_2 . Este organismo transgénico de diseño no puede sobrevivir cuando se expone a un nivel de concentración atmosférico de CO_2 (380 ppm = CO_2 al 0,038%) porque su mecanismo de concentración de CO_2 (CCM) para la fijación fotosintética eficaz del CO_2 está deteriorado debido a la mutación. Aunque dicho organismo de diseño se liberase accidentalmente al entorno natural, sus células pronto no serán capaces de dividirse o de aparearse, y morirán con rapidez por privación de carbono, puesto que no pueden realizar con eficacia la fijación fotosintética del CO_2 a la concentración atmosférica de CO_2 (380 ppm). Por tanto, el uso de dicho mutante que requiere una alta cantidad de CO_2 como organismo hospedante para la transformación génica de un gen o genes de la vía de producción de biocombustible de diseño representa otra forma de crear los organismos de diseño controlables por la división celular previstos para la producción fotobiológica con protección de bioseguridad de biocombustibles a partir de CO_2 y H_2O . En este caso, no se requiere un gen del canal de protones de diseño.

En otra realización, se crea un organismo de diseño controlable por medio de la división celular (figura 3B) mediante el uso de un gen regulador del ciclo de la división celular de diseño como gen de control de la bioseguridad (figura 2G) que pueden controlar la expresión de genes del ciclo de división de la célula (*cdc*) en el organismo hospedante,

de modo que pueden desactivar, de modo inducible, sus funciones reproductivas, tales como inactivar permanentemente la división celular y la capacidad de apareamiento tras una inducción específica del gen de diseño.

Desde el punto de vista biológico, es la expresión de los genes *cdc* naturales lo que controla el crecimiento celular y el ciclo de división de la célula en cianobacterias, algas y células de plantas superiores. La función más básica del ciclo celular es duplicar, de modo preciso, la enorme cantidad de ADN en los cromosomas durante la fase S (S de síntesis) y después segregar con precisión las copias en dos células hijas genéticamente idénticas durante la fase M (M de mitosis). La mitosis comienza generalmente con la condensación de los cromosomas: las hebras de ADN duplicadas, compactadas en cromosomas alargados, se condensan en cromosomas mucho más compactos necesarios para su segregación. El envuelta nuclear se degrada, y los cromosomas replicados (cada uno consiste en un par de cromátidas hermanas) se unen a los microtúbulos del huso mitótico. A medida que avanza la mitosis, la célula se detiene brevemente en un estado denominado metafase, en el que los cromosomas se alinean en el ecuador del huso mitótico, listos para la segregación. La segregación repentina de las cromátidas hermanas marca el comienzo de la anafase, durante la cual los cromosomas se mueven hacia polos opuestos del huso, en donde se descondensan y vuelven a formar núcleos intactos. La célula después se divide en dos mediante dos divisiones citoplásmicas (citoquinesis) y entonces se completa la división de la célula. Nótese que la mayoría de las células requieren mucho más tiempo para crecer y duplicar su masa de proteínas y orgánulos que el que requieren para replicar su ADN (la fase S) y dividirse (la fase M). Por tanto, existen dos fases vacías: una fase a G_1 entre la fase M y la fase S, y una fase G_2 entre la fase S y la mitosis. Como resultado, el ciclo de las células eucariotas tradicionalmente se divide en cuatro fases secuenciales: G_1 , S, G_2 , y M. Desde el punto de vista fisiológico, las dos fases vacías también proporcionan tiempo a la célula para que controle el entorno interno y externo para asegurarse de que las condiciones son adecuadas y la preparación se ha completado antes de que la célula se comprometa al considerable trastorno que supone la fase S y la mitosis. La fase G_1 es especialmente importante en este aspecto. Su longitud puede variar en gran medida dependiendo de las condiciones externas y de las señales extracelulares procedentes de otras células. Si las condiciones extracelulares son desfavorables, por ejemplo, las células retrasan el avance a través de G_1 e incluso pueden entrar en un estado de reposo especializado denominado G_0 (G cero), en el que permanecen durante días, semanas o incluso años antes de reanudar la proliferación. En efecto, muchas células permanecen permanentemente en el estado G_0 hasta que mueren.

En una de las diversas realizaciones, un gen o genes de diseño que codifican una proteína reguladora de *cdc* de diseño o un ARNi de *cdc* específico se emplean para inhibir, de modo inducible, la expresión de cierto gen o genes *cdc* para detener la división de la célula e inutilizar la capacidad de reproducción cuando el gen o genes de diseño son activados por una condición inductora específica. Cuando el cultivo de diseño controlable por medio de la división celular se cultiva y está listo para la producción fotosintética de biocombustible, por ejemplo, una práctica preferida consiste en inducir la expresión de un gen o genes de ARNi de *cdc* de diseño específicos, junto con la inducción de un gen o genes de la vía de producción de biocombustible de diseño, de modo que las células se detengan permanentemente en la fase G_1 o en el estado G_0 . De esta forma, las células del organismo de diseño cultivadas se convierten en catalizadores perfectos para la producción fotosintética de biocombustibles a partir de CO_2 y H_2O , mientras que sus funciones de división celular y apareamiento se inactivan permanentemente en la fase G_1 o el estado G_0 para ayudar a asegurar la bioseguridad.

El uso de las realizaciones de bioseguridad con diversos genes de producción de biocombustible de diseño listados en SEQ ID:1-45 puede crear diversos productores de biocombustible fotobiológico con protección de bioseguridad (figuras 3A, 3B, y 3C). Nótese que SEQ ID NO:46 y 1-12 (ejemplos 1-12) representan un ejemplo de un organismo eucariota de diseño controlable por medio de la división celular, tal como un alga de diseño controlable por medio de la división celular (por ejemplo, *Chlamydomonas*) que contiene un gen del canal de protones controlado por el promotor de *Nia1* de diseño (SEQ ID NO:46) y un conjunto de genes de la vía de producción de butanol controlados por el promotor de *Nia1* de diseño (SEQ ID NO:1-12). Debido a que el gen del canal de protones de diseño y el gen o genes de la vía de producción de biocombustible de diseño están todos controlados por las mismas secuencias del promotor de *Nia1*, pueden expresarse simultáneamente tras la inducción por medio de la adición de un fertilizante de nitrato en el medio de cultivo, para proporcionar la capacidad productora de biocombustible fotosintético con protección de bioseguridad, tal como se ilustra en la figura 3B. El uso de los genes de la vía de producción de butanol controlados por el promotor de *Nia1* de diseño (SEQ ID NO:1-12) en un organismo fotosintético que requiere una alta cantidad de CO_2 , tal como *Chlamydomonas reinhardtii* mutante deficiente en anhidrasa carbónica 12-1C (CC-1219 cal mt⁻) o el mutante *cia3* de *Chlamydomonas reinhardtii*, representa otro ejemplo de creación de un organismo fotosintético controlable por medio de la división celular de diseño para ayudar a asegurar la bioseguridad.

La característica de bioseguridad de diseño puede ser útil para la producción de otros biocombustibles, tales como bioaceites, biohidrógeno, etanol y también los productos intermedios. Por ejemplo, esta realización de bioseguridad en combinación con un conjunto de genes de la vía de producción de etanol de diseño, tales como los que aparecen en SEQ ID NO:47-53, puede representar un productor de etanol controlable por medio de la división celular (figura 3C). Brevemente, SEQ ID NO:47 presenta el ejemplo 47 para una construcción de ADN detallada (1360 pares de bases (pb)) un gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD de diseño controlado por el promotor de *nirA* que incluye: un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de *nirA* de 88 pb (21-108) seleccionado de la secuencia del promotor del gen de la nitrito reductasa de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942

(cianobacteria de agua dulce), una secuencia codificadora de enzima (109-1032) seleccionada y modificada a partir de una secuencia de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD citosólica de *Cyanidium caldarium* (GenBank n.º de registro: CAC85917), un terminador de *rbcS* de 308 pb de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (1033-1340), y un cebador RE de PCR (1341-1360) en el extremo 3'.

5 SEQ ID NO:48 presenta el ejemplo 48 para una construcción de ADN de fosfoglicerato quinasa controlada por el promotor de *nirA* de diseño (1621 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de *nirA* de la nitrito reductasa de 88 pb de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (21-108), una secuencia que codifica la fosfoglicerato quinasa (109-1293) seleccionada de una secuencia de la fosfoglicerato quinasa de *Geobacillus kaustophilus* HTA426 (GenBank: BAD77342), un terminador de *rbcS* de 308 pb de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (1294-1601), y un cebador RE de PCR (1602-1621).

10 SEQ ID NO:49 presenta el ejemplo 49 para una construcción de ADN de fosfoglicerato mutasa controlada por el promotor de *nirA* de diseño (1990 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de *nirA* de la nitrito reductasa de 88 pb de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (21-108), un sitio Xho I NdeI de 9 pb (109-117), una secuencia que codifica la fosfoglicerato mutasa (118-1653) seleccionada de las secuencias de una fosfoglicerato mutasa de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903 (GenBank: ABP67536), un sitio XbaI de 9 pb (1654-1662), un terminador de *rbcS* de 308 pb de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (1663-1970), y un cebador RE de PCR (1971-1990).

15 SEQ ID NO:50 presenta el ejemplo 50 para una construcción de ADN de enolasa controlada por el promotor de *nirA* de diseño (1765 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de *nirA* de la nitrito reductasa de 88 pb de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (21-108), un sitio Xho I NdeI de 9 pb (109-117), una secuencia que codifica la enolasa (118-1407) seleccionada de la secuencia de una enolasa de *Cyanothece* sp. CCY0110 (GenBank: ZP_01727912), una secuencia que codifica el marcador Lumio de 21 pb (1408-1428), un sitio XbaI de 9 pb (1429-1437) que contiene un codón de fin, un terminador de *rbcS* de 308 pb de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (1438-1745), y un cebador RE de PCR (1746-1765) en el extremo 3'.

20 SEQ ID NO:51 presenta el ejemplo 51 para una construcción de ADN de piruvato quinasa controlada por el promotor de *nirA* de diseño (1888 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de *nirA* de la nitrito reductasa de 88 pb de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (21-108), un sitio Xho I NdeI de 9 pb (109-117), una secuencia que codifica la piruvato quinasa (118-1530) seleccionada de una secuencia de la piruvato quinasa de *Selenomonas ruminantium* (GenBank: AB037182), una secuencia del marcador Lumio de 21 pb (1531-1551), un sitio XbaI de 9 pb (1552-1560), un terminador de *rbcS* de 308 pb de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (1561-1868), y un cebador RE de PCR (1869-1888).

25 SEQ ID NO:52 presenta el ejemplo 52 para una construcción de ADN de piruvato descarboxilasa controlada por el promotor de *nirA* de diseño (2188 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de *nirA* de la nitrito reductasa de 88 pb de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (21-108), un sitio Xho I NdeI de 9 pb (109-117), una secuencia que codifica la piruvato descarboxilasa (118-1830) seleccionada de las secuencias de una piruvato descarboxilasa de *Pichia stipitis* (GenBank: XM_001387668), una secuencia del marcador Lumio de 21 pb (1831-1851), un sitio XbaI de 9 pb (1852-1860), un terminador de *rbcS* de 308 pb de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (1861-2168), y un cebador RE de PCR (2169-2188) en el extremo 3'.

30 SEQ ID NO:53 presenta el ejemplo 53 para una construcción de ADN de alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD(P)H controlada por el promotor de *nirA* de diseño (1510 pb) que incluye un cebador FD de PCR (secuencia 1-20), un promotor de *nirA* de la nitrito reductasa de 88 pb de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (21-108), una secuencia que codifica la alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD(P)H (109-1161) seleccionada/modificada (se retira la secuencia de su péptido señal mitocondrial) de una secuencia del gen de la alcohol deshidrogenasa de *Kluyveromyces lactis* (ADH3) (GenBank: X62766), una secuencia del marcador Lumio de 21 pb (1162-1182), un terminador de *rbcS* de 308 pb de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (1183-1490), y un cebador RE de PCR (1491-1510) en el extremo 3'.

35 Nótese que las SEQ ID NO:47-53 (ejemplos de construcciones de ADN 47-53) representan un conjunto de genes de la vía de producción de etanol controlados por el promotor de *nirA* de diseño que pueden emplearse en oxifotobacterias, tales como *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942. El uso de este conjunto de genes de la vía de producción de etanol de diseño en una cianobacteria que requiere una alta cantidad de CO₂, tal como *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 mutante M3, representa otro ejemplo de una cianobacteria de diseño controlable por medio de la división celular para la producción fotosintética con protección de bioseguridad de biocombustibles a partir de CO₂ y H₂O.

Uso de organismos productores de butanol de diseño con procesos de recolección de butanol en fotobiorreactores

55 Las diversas realizaciones indican además cómo pueden emplearse los organismos de diseño, que incluyen organismos controlables por medio de la división celular de diseño (figura 3) con un fotobiorreactor y un proceso de separación y recolección de butanol para la producción fotosintética de butanol (CH₃CH₂CH₂CH₂OH) y O₂ directamente a partir de CO₂ y H₂O empleando la luz solar. Existen una serie de realizaciones sobre cómo los

organismos de diseño pueden utilizarse para la producción fotobiológica de butanol. Una de las realizaciones preferidas consiste en emplear los organismos de diseño para la producción fotosintética de butanol directa a partir de CO₂ y H₂O con un reactor fotobiológico y un sistema de recolección de butanol (filtración y destilación/evaporación), que incluye un proceso operativo específico descrito como una serie de las siguientes etapas: a) cultivar de modo fotoautótrofo un organismo transgénico de diseño en un medio de cultivo mínimo empleando el CO₂ del aire como fuente de carbono, bajo condiciones aerobias (normales) antes de inducir la expresión de los genes de la vía de producción de butanol de diseño; b) cuando el cultivo del organismo de diseño se cultiva y está listo para la producción de butanol, sellar o colocar el cultivo en una condición específica, tal como una condición anaerobia, que puede ser generada mediante la eliminación del O₂ del reactor fotobiológico, para inducir la expresión de los genes de producción de butanol de diseño; c) cuando las enzimas de la vía de producción de butanol de diseño se expresan, suministrar energía de luz visible, tal como luz solar, para que las células que expresan los genes de diseño funcionen como catalizadores para la producción fotosintética de butanol a partir de CO₂ y H₂O; d) recolectar el producto de butanol mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede recolectar el producto de butanol del reactor fotobiológico mediante una combinación de técnicas de recolección de butanol con filtración con membrana y destilación/evaporación y recoger de modo flexible el producto gaseoso de O₂ del reactor.

El anterior proceso para emplear los organismos de diseño para la producción fotosintética de CH₃CH₂CH₂CH₂OH y O₂ a partir de CO₂ y H₂O con un reactor biológico y la recolección del butanol y el sistema de recolección y separación del producto gaseoso pueden repetirse para una pluralidad de ciclos operativos para lograr unos resultados más deseables. Cualquiera de las etapas a) hasta d) de este proceso descrito anteriormente también puede ajustarse según la invención para adaptarse a ciertas condiciones específicas. En la práctica, cualquiera de las etapas a) hasta d) del proceso puede aplicarse totalmente o en parte y/o en cualquier combinación ajustada también para la producción fotobiológica de butanol potenciada según esta invención.

Las fuentes de CO₂ que pueden emplearse en este proceso incluyen, pero no se limitan a CO₂ industrial, (bi)carbonatos, y CO₂ atmosférico. Por ejemplo, puede introducirse CO₂ de los gases de combustión procedentes de instalaciones industriales alimentadas con combustibles fósiles y/o alimentadas con biomasa, a través de una tubería hacia un reactor fotobiológico en este proceso. Las instalaciones industriales que pueden generar suministros de CO₂ para un proceso de producción fotosintética de butanol de diseño incluyen, pero no se limitan a plantas de energía alimentadas con carbón, industrias del hierro y del acero, plantas de fabricación de cemento, instalaciones de refinerías de petróleo, fábricas de producción de fertilizantes químicos, instalaciones de destilación/separación de biocombustibles (o productos intermedios) alimentadas con biomasa y/o alimentadas con combustibles fósiles, procesos de pirólisis de biomasa, conductos de humo, biorreactores de fermentación, instalaciones de refinerías de biocombustibles y sus combinaciones.

Como alternativa, el proceso de producción fotobiológica de butanol de diseño también puede emplear el CO₂ del entorno y también de la atmósfera. La tecnología de producción fotobiológica de butanol con organismos de diseño puede emplear CO₂ gaseoso, CO₂ disuelto, bicarbonato, y carbonatos.

Esta realización se ilustra con más detalle en la presente empleando algas de diseño como ejemplo. Tal como se describió anteriormente, las algas de diseño de la presente invención, tales como las que contienen un conjunto de genes de la vía de producción de butanol de diseño controlados por el promotor de HydA1 de diseño (por ejemplo, las construcciones de ADN de SEQ ID NO:13-16 (o 17) y 18-23), pueden crecer con normalidad bajo condiciones aerobias mediante fotosíntesis autótrofa empleando el CO₂ del aire de una manera similar al de las algas de tipo salvaje. Las algas de diseño también pueden crecer de modo fotoheterótrofo empleando un sustrato orgánico.

En una realización preferida, un alga de diseño se cultiva de modo fotoautótrofo empleando el CO₂ del aire como fuente de carbono bajo condiciones aerobias en un medio mínimo que contiene los nutrientes minerales (inorgánicos) esenciales. No es necesario ningún sustrato orgánico, tal como acetato, para cultivar un alga de diseño bajo condiciones normales antes de que se expresen los genes de la vía de producción fotosintética de butanol de diseño. La mayoría de las algas pueden crecer con rapidez en el agua a través de la fotosíntesis autótrofa empleando el CO₂ del aire, con la condición de que existan suficientes nutrientes minerales. Los elementos nutrientes que se requieren normalmente para el crecimiento de las algas son: N, P, y K a concentraciones de aproximadamente 1-10 mM, y Mg, Ca, S, y Cl a concentraciones de aproximadamente 0,5 a 1,0 mM, más algunos oligoelementos como Mn, Fe, Cu, Zn, B, Co, Mo, entre otros, a unos niveles de concentración de µM. Todos los nutrientes minerales pueden suministrarse en un medio mínimo acuoso que puede prepararse con recetas bien establecidas de medios de cultivo de algas empleando agua (agua dulce para las algas de agua dulce de diseño, y agua de mar para las algas marinas de diseño tolerantes a la sal) y una cantidad relativamente pequeña de fertilizantes baratos y sales minerales, tales como bicarbonato de amonio (NH₄HCO₃) (o nitrato de amonio, urea, cloruro de amonio), fosfatos de potasio (K₂HPO₄ y KH₂PO₄), sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄·7H₂O), cloruro de calcio (CaCl₂), sulfato de cinc heptahidratado (ZnSO₄·7H₂O), sulfato de hierro(II) heptahidratado (FeSO₄·7H₂O), y ácido bórico (H₃BO₃), entre otros. Es decir, grandes cantidades de células de algas de diseño pueden cultivarse de modo barato en un periodo corto de tiempo porque, bajo condiciones aerobias, tales como en un estanque abierto, las algas de diseño pueden crecer de modo fotoautótrofo por sí mismas empleando el CO₂ del aire con tanta rapidez como sus cepas de origen de tipo salvaje. Esto constituye una característica significativa (beneficio) de la invención que puede proporcionar una solución barata a la generación de biocatalizadores

fotoactivos (las algas productoras de butanol fotosintéticas de diseño) para la producción de energía solar renovable.

5 Cuando el cultivo de algas se cultiva y está listo para la producción de butanol, el cultivo de algas cultivados se sella o se coloca bajo ciertas condiciones específicas, tales como condiciones anaerobias, que pueden ser generadas mediante la eliminación del O₂ del reactor fotobiológico sellado, para inducir la expresión de los genes de la vía de producción de butanol controlados por el promotor de HydA1 de diseño. Cuando se expresan las enzimas de la vía de producción de butanol de diseño, se suministra energía de luz visible, tal como luz solar, para que las células de las algas que expresan los genes de diseño puedan actuar como catalizadores para la producción fotosintética de butanol a partir de CO₂ y H₂O. Cuando se expresan los genes de diseño, las células de algas se convierten fundamentalmente en "máquinas verdes" eficaces y robustas que son perfectas para la producción fotosintética de butanol (CH₃CH₂CH₂CH₂OH) y O₂ a partir de CO₂ y H₂O. El producto de butanol del reactor fotobiológico de las algas puede recolectarse mediante una combinación de técnicas de recolección de butanol con filtración con membrana y destilación/evaporación, que incluyen, pero no se limitan a una extracción de líquido/líquido, destilación de gases, evaporación con membrana, pervaporación y técnicas de adsorción (Durre, P., 1998, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49: 639-648; Qureshi, Hughes, Maddox, y Cotta, 2005, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 27:215-222).

15 La producción fotosintética de CH₃CH₂CH₂CH₂OH y O₂ directamente a partir de CO₂ y H₂O según la presente invención, en principio, puede tener un alto rendimiento cuántico. En teoría, solo se necesitan 48 fotones para producir un CH₃CH₂CH₂CH₂OH y 6O₂ a partir de agua y dióxido de carbono mediante este mecanismo. La máxima eficiencia energética teórica desde la luz solar al butanol mediante el proceso de la producción fotosintética de butanol directa a partir del CO₂ y H₂O es de aproximadamente 10%, que es la más alta posible entre todas las estrategias biológicas. Por consiguiente, esta estrategia presenta un gran potencial cuando se aplica de modo adecuado con un reactor para algas y un proceso de recolección de butanol y oxígeno.

El anterior proceso para utilizar las algas de diseño para la producción fotosintética de CH₃CH₂CH₂CH₂OH y O₂ a partir de CO₂ y H₂O con un reactor para algas y un sistema de recolección del butanol y separación y recolección del producto gaseoso puede repetirse durante una pluralidad de ciclos operativos para lograr resultados más deseables.

25 Otra característica es que el organismo de producción de butanol conmutable de diseño proporciona la capacidad de realizar ciclos repetidos de crecimiento en cultivo fotoautótrofo bajo condiciones aerobias normales de una manera similar a la del tipo salvaje y de lograr una producción fotobiológica eficaz de butanol (figuras 1 y 3) cuando la vía de producción de butanol de diseño se activa por medio de un promotor inducible (tal como un promotor de hidrogenasa) en ciertas condiciones inductoras específicas (tales como bajo condiciones anaerobias) en un biorreactor. Por ejemplo, las algas de diseño conmutables que portan los genes de producción de butanol controlados por un promotor de hidrogenasa de diseño contienen mitocondrias normales, que emplean el poder reductor (NADH) de reservas orgánicas (y/o de sustratos exógenos, tales como acetato) para dar energía a la célula inmediatamente después de su vuelta a las condiciones aerobias. Por tanto, cuando la célula del alga vuelve a las condiciones aerobias después de su uso bajo condiciones anaerobias para la producción de butanol, la célula dejará de producir las enzimas de la vía de producción de butanol y comenzará a restablecer su capacidad fotoautótrofa normal sintetizando cloroplastos funcionales normales. Por consiguiente, es posible emplear este tipo de organismo transformado genéticamente para ciclos repetidos de crecimiento en cultivo fotoautótrofo bajo condiciones aerobias normales y la producción eficaz de butanol bajo condiciones anaerobias en un reactor anaerobio. Es decir, esta tecnología de producción fotobiológica de butanol puede funcionar durante una pluralidad de ciclos operativos mediante el rejuvenecimiento del cultivo usado bajo condiciones aerobias y empleando, de modo reciclable, el cultivo de algas rejuvenecido bajo condiciones productoras de butanol para lograr resultados más deseables. Opcionalmente, esta tecnología de producción fotobiológica de butanol se hace funcionar de modo continuo haciendo circular el cultivo de algas rejuvenecido desde un reactor aerobio hacia el reactor anaerobio, y al mismo tiempo se hace circular el cultivo de algas usado desde el reactor anaerobio (después de su uso para la producción de butanol) hacia el reactor aerobio para el rejuvenecimiento por medio de la síntesis de cloroplastos funcionales normales a través de la fijación fotosintética del CO₂ y el crecimiento fotoautótrofo.

Algunos de los organismos de diseño pueden crecer de modo fotoautótrofo incluso con la vía o vías de producción de butanol activadas. La rapidez con que puede crecer un organismo de diseño bajo condiciones de producción de butanol puede depender de su trasfondo genético y de la cantidad de productos del ciclo de Calvin que siguen estando disponibles para el crecimiento celular después de su uso por la vía o vía de producción de butanol de diseño. Los organismos de diseño que, bajo las condiciones de producción de butanol, pueden mantener las funciones celulares esenciales con una tasa de crecimiento apropiada también pueden emplearse para la producción fotobiológica continua de CH₃CH₂CH₂CH₂OH y O₂ a partir de CO₂ y H₂O con un biorreactor y un proceso de recolección del butanol.

55 Existen otras formas en las que los organismos de diseño conmutables, que incluyen los organismos de diseño controlables por medio de la división celular (figura 3), pueden utilizarse para la producción fotobiológica con protección de bioseguridad de biocombustibles. Con el uso de las características de bioseguridad de diseño descritas previamente, por ejemplo, no es necesario que el cultivo de algas de diseño usado de un reactor de producción fotobiológica de butanol tenga que recircularse hacia el reactor de crecimiento del cultivo. Por el contrario, el cultivo de algas usado se extrae para ser empleado como fertilizante o materia prima de biomasa para otros procesamientos, puesto que el crecimiento fotoautótrofo del alga de diseño conmutable en el reactor de

crecimiento del cultivo es capaz de suministrar células de algas de modo continuo al reactor de producción fotobiológica de butanol para la producción de biocombustible. Esta realización es especialmente útil cuando se emplean algunos de los organismos de diseño que pueden crecer de modo fotoautótrofo solo antes, y no después, de que se active la vía o vías de producción de butanol. Por ejemplo, si se mantiene un cultivo de crecimiento continuo de un alga de diseño (que puede crecer de modo fotoautótrofo solo antes de que se active la vía o vías de producción de butanol) en un reactor de crecimiento del cultivo, esto puede proporcionar un suministro continuo de células de algas cultivadas para su uso en un reactor de producción fotobiológica de butanol. Esta estrategia también posibilita el uso de los organismos de diseño que solo pueden crecer antes de que active la vía o vías de producción de butanol para la producción fotobiológica de butanol.

Debido a diversas razones, algunos de los organismos de producción de butanol de diseño solo pueden crecer de modo fotoheterótrofo o fotomixotrófico, pero no de modo fotoautótrofo. El uso de un reactor de crecimiento del cultivo también puede cultivar este tipo de organismos de producción de butanol de diseño de modo fotoheterótrofo o fotomixotrófico empleando sustratos orgánicos que incluyen, pero no se limitan a sacarosa, glucosa, acetato, etanol, metanol, propanol, butanol, acetona, almidón, hemicelulosa, celulosa, lípidos, proteínas, ácidos orgánicos, materiales de biomasa y sus combinaciones. El cultivo cultivado de este modo también puede suministrarse a un reactor de producción fotobiológica de butanol para la inducción de las vías de diseño para la producción de butanol. Esta realización modificada del crecimiento del cultivo también permite emplear los organismos de diseño que solo pueden crecer de modo fotoheterótrofo o fotomixotrófico para la producción fotobiológica de butanol.

Para ciertos organismos de diseño específicos que portan genes de la vía de producción de butanol controlados por el promotor de la nitrato reductasa (*Nia1*), el anterior proceso fotobiológico en un reactor puede ajustarse aún más para lograr resultados más beneficiosos. Por ejemplo, el alga de diseño que contiene los genes de la vía de producción de butanol controlados por el promotor de *Nia1* (o *nirA*), tales como los que se muestran en los ejemplos de secuencias de ADN de diseño 1-12 (SEQ ID NO:1-12) y una oxifotobacteria de diseño que porta los genes de la vía de producción de butanol controlados por el promotor de *nirA* que aparecen en SEQ ID NO:34-45, pueden crecer con normalidad en un medio de cultivo con amonio (pero no con nitrato) mediante la fotosíntesis autótrofa empleando el CO₂ del aire de una manera similar a la de las algas de tipo salvaje. Esto es debido a que la expresión de los genes de la vía de producción de butanol en el organismo de diseño se activa solo en presencia de nitrato, según se desee, debido al uso de un promotor de la nitrato reductasa (*Nia1*) o un promotor de la nitrito reductasa (*nirA*) para controlar la expresión de la vía o vías de diseño. Una característica significativa de los organismos de diseño con genes de la vía de producción de butanol controlados por el promotor de *nirA* o *Nia1* es que la expresión de las vías de producción de butanol de diseño puede ser inducida manipulando los niveles de concentración de nitrato (NO₃⁻) con relación a los del amonio (NH₄⁺) en el medio de cultivo sin la necesidad de emplear condiciones anaerobias. Es decir, la expresión de la vía o vías de producción de butanol de diseño puede ser inducida bajo condiciones aerobias y anaerobias. Esto permite que el proceso de producción fotobiológica de butanol de diseño también pueda funcionar bajo condiciones aerobias empleando el CO₂ atmosférico. De modo similar, este tipo de organismos de diseño con genes de la vía de producción de butanol controlados por el promotor de *Nia1* también pueden crecer de modo fotoautótrofo en condiciones aerobias y anaerobias. Por tanto, como otra realización, el proceso operativo para utilizar un organismo de diseño con genes de la vía de producción de butanol controlados por el promotor de la nitrato reductasa (*Nia1*) se ajusta a lo siguiente: a) cultivar de modo fotoautótrofo un organismo transgénico de diseño en un medio de cultivo mínimo en presencia de amonio (NH₄⁺), pero no de nitrato (NO₃⁻) antes de inducir la expresión de los genes de la vía de producción de butanol de diseño; b) cuando el cultivo del organismo de diseño se cultiva y está listo para la producción de butanol, añadir un fertilizante de nitrato (NO₃⁻) al medio de cultivo para aumentar la concentración de nitrato (NO₃⁻) con relación a la del amonio (NH₄⁺) para inducir la expresión de los genes de producción de butanol de diseño; c) cuando las enzimas de la vía de producción de butanol de diseño se expresan, suministrar energía de luz visible, tal como luz solar, para que las células que expresan los genes de diseño funcionen como catalizadores para la producción fotosintética de butanol a partir de CO₂ y H₂O; d) recolectar el producto de butanol del reactor fotobiológico mediante una combinación de filtración con membrana y técnicas de recolección de butanol.

Además de la producción de butanol, también es posible emplear un organismo de diseño o parte de su vía o vías de producción de butanol de diseño para producir ciertos productos intermedios que incluyen: butiraldehído, butiril-CoA, crotonil-CoA, 3-hidroxi-butiril-CoA, acetoacetil-CoA, acetil-CoA, piruvato, fosfoenolpiruvato, 2-fosfoglicerato, 1,3-difosfoglicerato, gliceraldehído-3-fosfato, dihidroxiacetona fosfato, fructosa-1,6-difosfato, fructosa-6-fosfato, glucosa-6-fosfato, glucosa, y glucosa-1-fosfato. Por tanto, otra realización comprende una etapa adicional de recolectar los productos intermedios que también pueden ser producidos por un organismo transgénico de diseño inducido. La producción de un producto intermedio puede potenciarse selectivamente inactivando la actividad de una enzima de diseño que cataliza su consumo en las vías de diseño. La producción de dicho producto intermedio también puede potenciarse empleando un organismo de diseño con una o varias de las enzimas de diseño omitidas de las vías de producción de butanol de diseño. Por ejemplo, puede utilizarse un organismo de diseño en el que se ha omitido la butanol deshidrogenasa o la butiraldehído deshidrogenasa de la vía o vías de diseño de la figura 1 para producir butiraldehído o butiril-CoA, respectivamente.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para la producción fotosintética de butanol que comprende cultivar un alga transgénica de diseño en un medio líquido, en el que el alga está genéticamente modificada para que exprese un conjunto de enzimas que actúan sobre un producto intermedio del ciclo de Calvin y convierten el producto intermedio en butanol;
- 5 en el que dicho conjunto de enzimas consiste en fosfoglicerato mutasa, enolasa, piruvato quinasa, piruvato-ferredoxina oxidorreductasa (o piruvato-NADP⁺ oxidorreductasa), tiolasa, 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa, butiraldehído deshidrogenasa, y butanol deshidrogenasa;
- 10 en el que dichas butiraldehído deshidrogenasa y butanol deshidrogenasa pueden utilizar el NADPH, que es suministrado por el proceso de transporte de electrones fotodirigido;
- en el que los nucleótidos que codifican dicho conjunto de enzimas se modifican genéticamente de modo que las enzimas expresadas se inserten en los cloroplastos del organismo fotosintético hospedante, dirigidas por un péptido señal estromático; y
- recuperar el butanol a partir de dicho medio líquido.
- 15 2.- El método de la reivindicación 1, en el que dicha alga se selecciona del grupo que consiste en algas verdes, algas rojas, algas marrones, algas verdeazuladas (oxifotobacterias, que incluyen cianobacterias y oxiclوروبacterias), diatomeas, algas del medio marino, algas de agua dulce, cepas de algas tolerantes al frío, cepas de algas tolerantes al calor, mutantes deficientes en el pigmento del complejo antena recolector de luz, cepas de algas tolerantes al butanol, y sus combinaciones.
- 20 3.- El método de la reivindicación 2, en el que dicha alga es *Chlamydomonas reinhardtii*.
- 4.- El método de la reivindicación 2, en el que dicha alga verdeazulada (oxifotobacterias, que incluyen cianobacterias y oxiclوروبacterias) se selecciona del grupo que consiste en *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Nostoc* sp. PCC 7120, *Synechococcus elongatus* PCC 6301, *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942, *Synechococcus* sp. cepa PCC 7002, *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803, *Prochlorococcus marinus* MED4, *Prochlorococcus marinus* MIT 9313, *Prochlorococcus marinus* NATL1A, *Prochlorococcus* SS120, *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*), *Spirulina pacifica*, *Lyngbya majuscula*, *Anabaena* sp., *Synechocystis* sp., *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus* (MC-A), *Trichodesmium* sp., *Richelia intracellularis*, *Synechococcus* WH7803, *Synechococcus* WH8102, *Nostoc punctiforme*, *Synechococcus* sp. cepa PCC 7943, *Synechocystis* PCC 6714 mutante deficiente en ficocianina PD-1, *Cyanothece* cepa 51142, *Cyanothece* sp. CCY0110, *Oscillatoria limosa*, *Lyngbya majuscula*, *Symploca muscorum*, *Gloeobacter violaceus*, *Prochloron didemni*, *Prochlorothrix hollandica*, *Synechococcus* (MC-A), *Trichodesmium* sp., *Richelia intracellularis*, *Prochlorococcus marinus*, *Prochlorococcus* SS120, *Synechococcus* WH8102, *Lyngbya majuscula*, *Symploca muscorum*, *Synechococcus bigranulatus*, *Oscillatoria* sp. criófila, *Phormidium* sp., *Nostoc* sp.-1, *Calothrix parietina*, *Synechococcus bigranulatus* termófila, *Synechococcus lividus*, *Mastigocladus laminosus* termófila, *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912, *Synechococcus vulcanus*, *Synechococcus* sp. cepa MA4, *Synechococcus* sp. cepa MA19, y *Thermosynechococcus elongatus*.
- 25 5.- El método de la reivindicación 1, en el que la expresión de dicha enzima está controlada por un promotor inducible.
- 6.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el alga se modifica genéticamente para que contenga además una construcción de ADN para al menos una enzima que facilita la conversión de NADPH/NADH para potenciar la producción fotobiológica de butanol.
- 40 7.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células de las algas se modifican genéticamente para inactivar además la actividad de síntesis de almidón.
- 8.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el alga se modifica genéticamente para que además pueda expresar de modo inducible un conjunto de enzimas de diseño que comprende amilasa, almidón fosforilasa, hexoquinasa, fosfoglucomutasa, glucosa-fosfato isomerasa, fosfofructosa quinasa, aldolasa, triosa fosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa, piruvato quinasa y sus combinaciones, que facilitan la degradación del almidón y la glicólisis en la región estromática del cloroplasto.
- 45 9.- Un alga transgénica útil para la producción fotosintética de butanol, modificada genéticamente para que exprese, de modo inducible, la fosfoglicerato mutasa, enolasa, piruvato quinasa, piruvato-ferredoxina oxidorreductasa (o piruvato-NADP⁺ oxidorreductasa), tiolasa, 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa, butiraldehído deshidrogenasa, y butanol deshidrogenasa en el cloroplasto;
- 50 en la que dichas butiraldehído deshidrogenasa y butanol deshidrogenasa pueden utilizar el NADPH, que es suministrado por el proceso de transporte de electrones fotodirigido; y,

que también expresa, de modo inducible, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y fosfoglicerato, aldolasa y triosa fosfato isomerasa, fosfofructosa quinasa y amilasa, almidón fosforilasa, hexoquinasa, fosfoglucomutasa, glucosa-fosfato isomerasa en el cloroplasto.

5 10.- Un alga transgénica según la reivindicación 9, que además expresa, de modo inducible, al menos una de las siguientes en el cloroplasto: NADPH fosfatasa; NAD quinasa; una molécula de ARN de interferencia que inhibe la expresión de la glucosa-fosfato isomerasa (G-P-isomerasa) o fosfoglucomutasa; o parte o todo el conjunto de enzimas que facilitan la degradación del almidón y la glicólisis, que consisten en amilasa, almidón fosforilasa, hexoquinasa, fosfoglucomutasa, glucosa-fosfato isomerasa, fosfofructosa quinasa, aldolasa, triosa fosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa, piruvato
10 quinasa y sus combinaciones.

11.- El alga transgénica según una cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10, en la que dicha alga es un alga verdeazulada (cianobacteria u oxiclrobacteria).

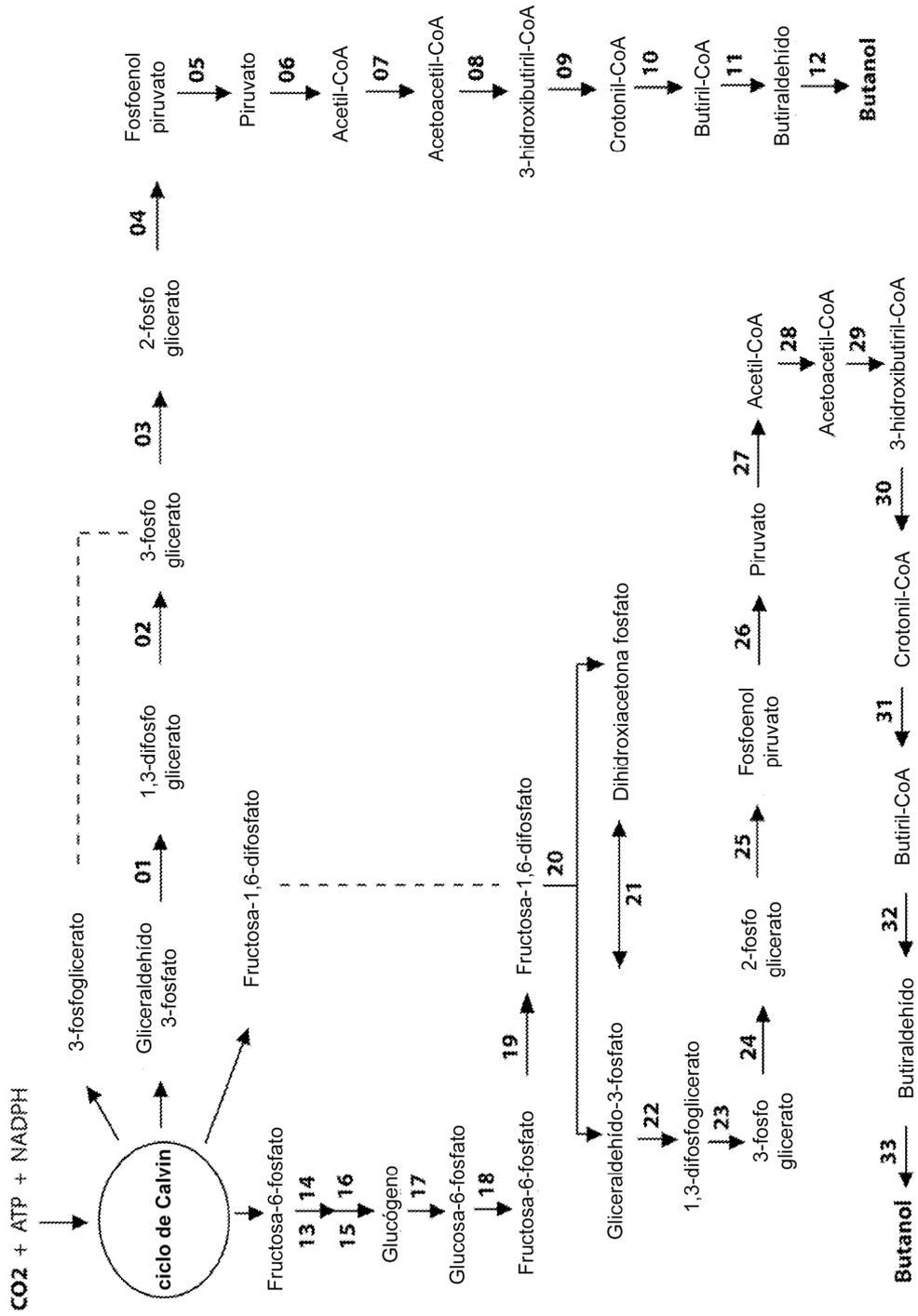


FIG. 1

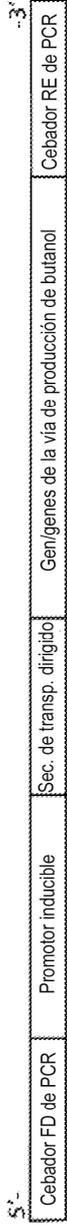


FIG. 2A



FIG. 2B

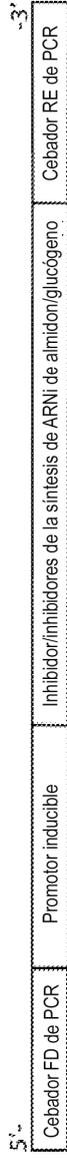


FIG. 2C

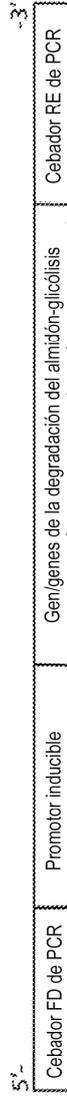


FIG. 2D



FIG. 2E



FIG. 2F



FIG. 2G



FIG. 2H

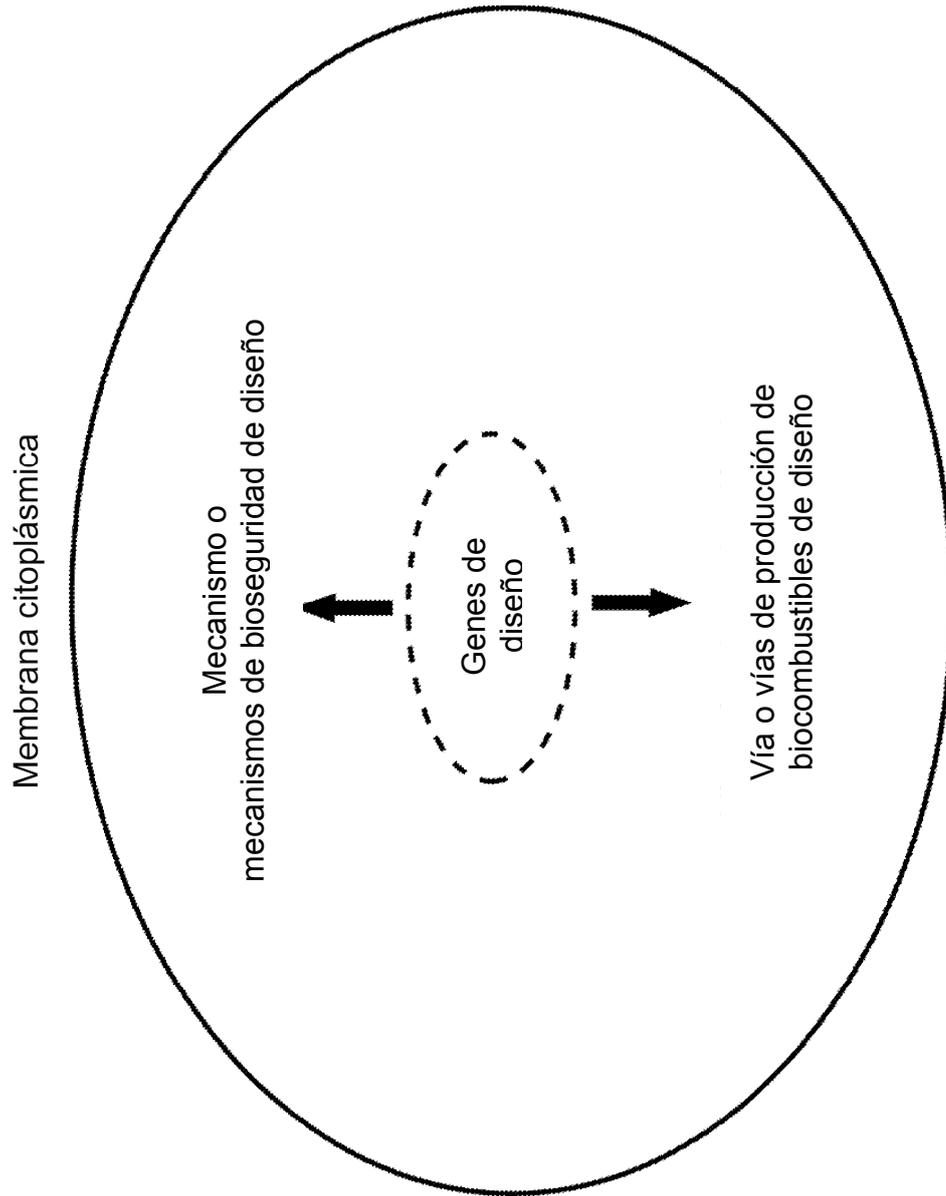


FIG. 3A

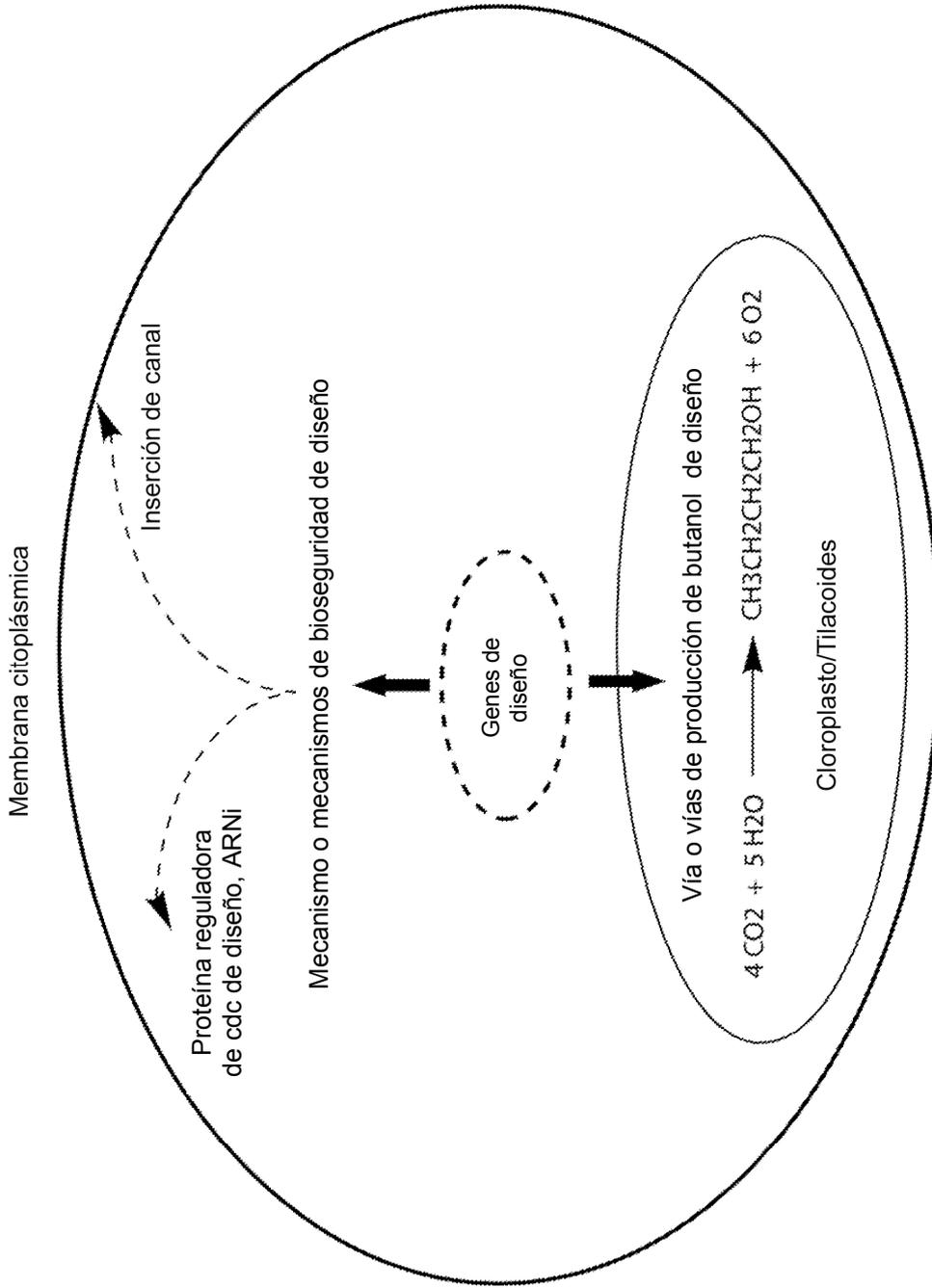


FIG. 3B

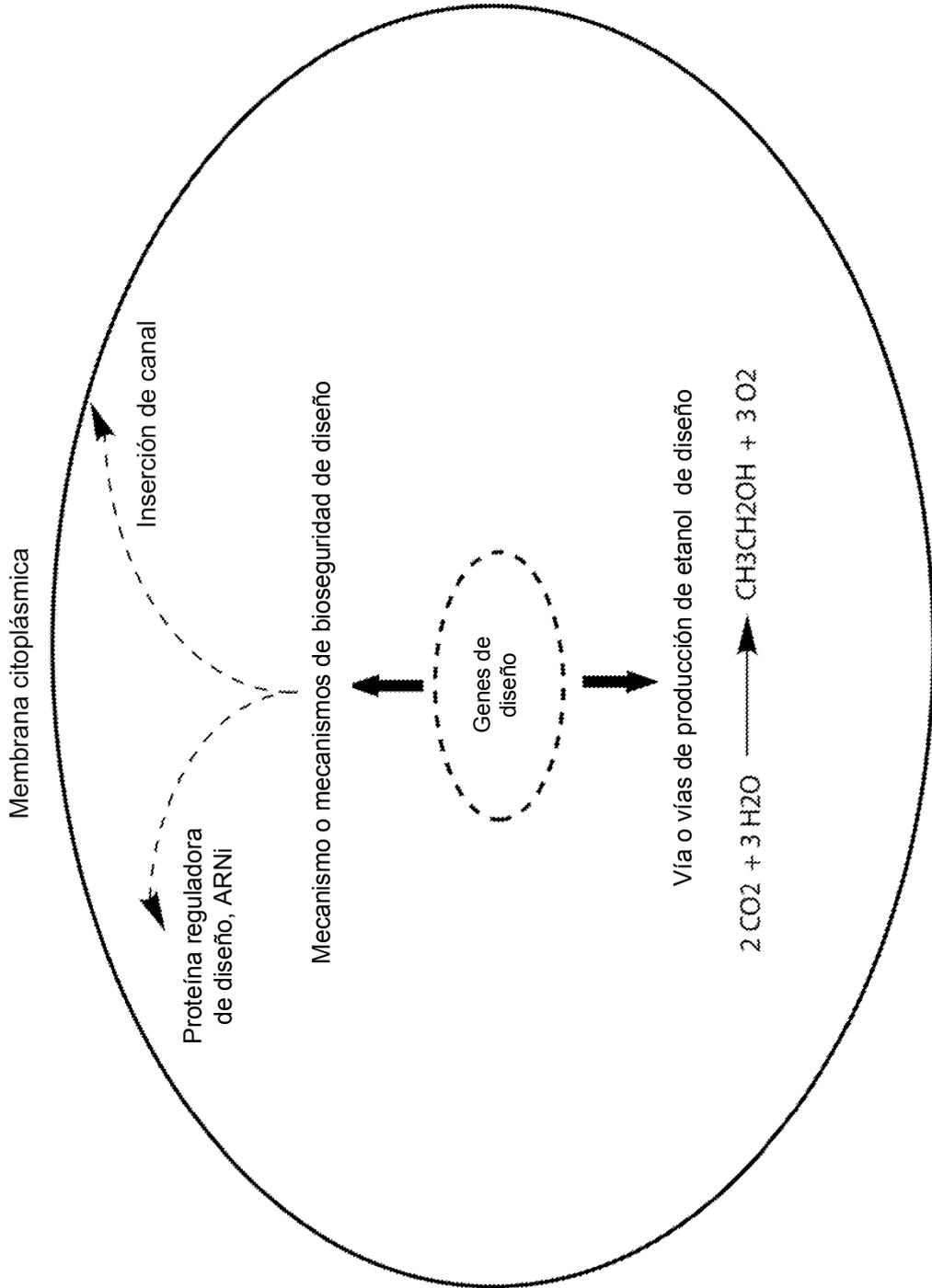


FIG. 3C