

No. 12-038998- -00000-0000

Fecha: 2012-03-06 12:06:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 104
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 105

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO CELULAS HOSPEDERAS FOTOAUTOTROFICAS METABOLICAMENTE POTENCIADAS
PRODUCTORAS DE ETANOL, METODO PARA PRODUCIR LAS CELULAS HOSPEDERAS,
CONSTRUCTOS PARA LA TRANSFORMACION DE LAS CELULAS HOSPEDERAS, Y METODO
PARA PRODUCIR ETANOL USANDO LAS CELULAS HOSPEDERAS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE ALGENOL BIOFUELS INC.

DOMICILIO BONITA SPRINGS, FLORIDA 34135, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-038998- -00000-0000

Fecha: 2012-03-06 12:06:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION Folios: 104

Act. 411 PRESENTACION Folios: 105

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

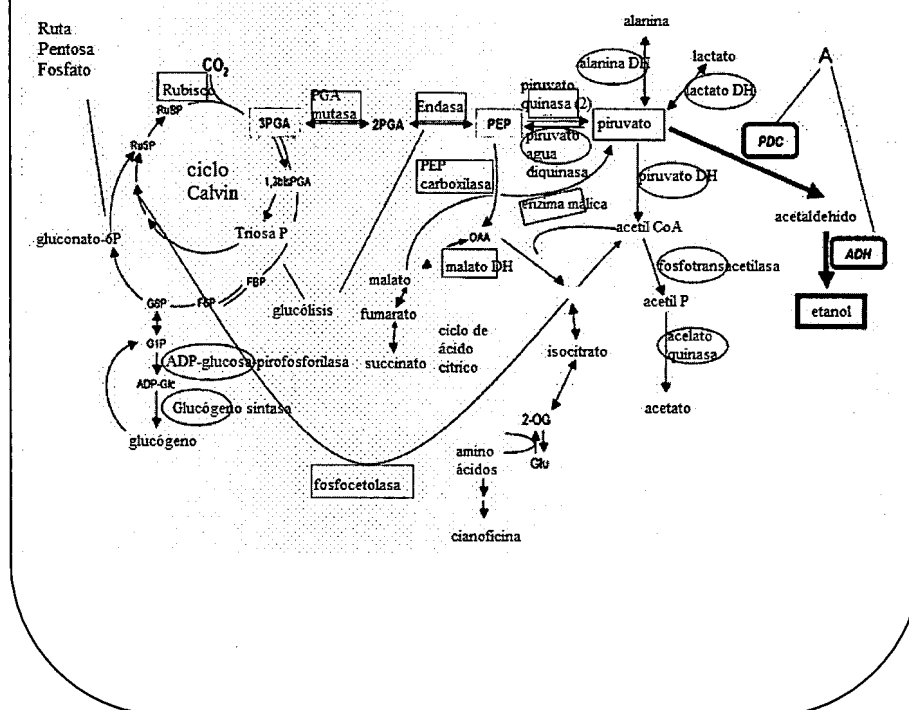
1		SOLICITUD DE:	
☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad.	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2	SOLICITANTE (71)		
Nombre: ALGENOL BIOFUELS INC. Sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado De Florida, Estados Unidos de América			
Dirección: 28100 Bonita Grande Drive, Suite 200, Bonita Springs, Florida 34135, Estados Unidos de América		IDENTIFICACIÓN	
Domicilio: Bonita Springs, Florida 34135, Estados Unidos de América		C.C. ☐ NIT ☐	
		C.E. ☐ Otro ☐	
		Cual _____	
		Número _____	
3	REPRESENTANTE O APODERADO		
Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		IDENTIFICACIÓN	
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35		C.C. ☒ NIT ☐	
Teléfono: 347 36 11		C.E. ☐ Otro ☐	
Fax: 211 86 50		Cual _____	
E-mail: clientes@cavelier.com		Número 35.456.344 T.P 23.555	
Domicilio: Bogotá, Colombia.			
4	INVENTOR (ES) (72)		
1. Kerstin BAIER Schillerstrasse 10, 14532 Kleinmachnow, Alemania			2. Ulf DÜHRING Schillerstrasse 71, 15370 Fredersdorf, Alemania
3. Christine OESTERHELT Fritschestrasse 75, 10585 Berlin, Alemania			4. Karl ZIEGLER Dorfaue 9, 15738 Zeuthen, Alemania
5. Heike ENKE Prinz-Heinrich-Str. 12, 12307 Berlin Alemania			
5	PCT (86)		
Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/060526			Fecha: 13 dfe agosto de 2009
Publicación Internacional No. WO 2011/018116 A1			Fecha: 17 de febrero de 2011
6	Título (54)		
CÉLULAS HOSPEDERAS FOTOAUTOTRÓFICAS METABÓLICAMENTE			
POTENCIADAS PRODUCTORAS DE ETANOL, MÉTODO PARA PRODUCIR LAS			
CÉLULAS HOSPEDERAS, CONSTRUCTOS PARA LA TRANSFORMACIÓN DE LAS			
CÉLULAS HOSPEDERAS, Y MÉTODO PARA PRODUCIR ETANOL USANDO LAS			
CÉLULAS HOSPEDERAS			

7 Clasificación Internacional (51) <u>C12N 009/004</u>			
8 Prioridad SI ☐ NO ☒	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	_____	_____	_____
9 Comprobante de pago No.: <u>12-0019346</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0019231</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0019232</u>		Fecha: <u>27 de febrero de 2012</u> Fecha: <u>27 de febrero de 2012</u> Fecha: <u>27 de febrero de 2012</u>	
10 Anexos:			
☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 590.000.oo.			
☒ Comprobante de pago por 20 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$600.000.oo.			
☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.			
☐ Poder de			
☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.			
☐ Declaraciones.			
☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)			
☒ Copia de la carátula de la Publicación Internacional WO 2011/018116 A1.			
☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)			
☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.			
☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.			
☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.			
☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.			
☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.			
☐ Arte final 12x12			
☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.			
☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS			

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

Fig. 1



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA :

Suz Doménica Solórz
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555



DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2011/018116 A1

Descripción:

Páginas 78 en español

Reivindicaciones: Número (s) 30

Figuras: Número (s) 3

2. ☒ Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 February 2011 (17.02.2011)

(10) International Publication Number
WO 2011/018116 A1

(51) International Patent Classification:

C12N 9/04 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2009/060526

(22) International Filing Date:

13 August 2009 (13.08.2009)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(71) Applicant (for all designated States except US):
ALGENOL BIOFUELS INC. [US/US]; 28100 Bonita
Grande Drive, Suite 200, Bonita Springs, FL 34135 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BAIER, Kerstin**
[DE/DE]; Schillerstrasse 10, 14532 Kleinmachnow (DE).
DÜHRING, Ulf [DE/DE]; Schillerstrasse 71, 15370
Fredersdorf (DE). **OESTERHELT, Christine** [DE/DE];
Fritschestr. 75, 10585 Berlin (DE). **ZIEGLER, Karl**
[DE/DE]; Dorfau 9, 15738 Zeuthen (DE). **ENKE, Heike**
[DE/DE]; Rohrbachstrasse 2, 12307 Berlin (DE).

(74) Agent: **EPPING HERMAN FISCHER PATENTAN-
WALTSGESELLSCHAFT MBH**; Ridlerstr. 55, 80339
München (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

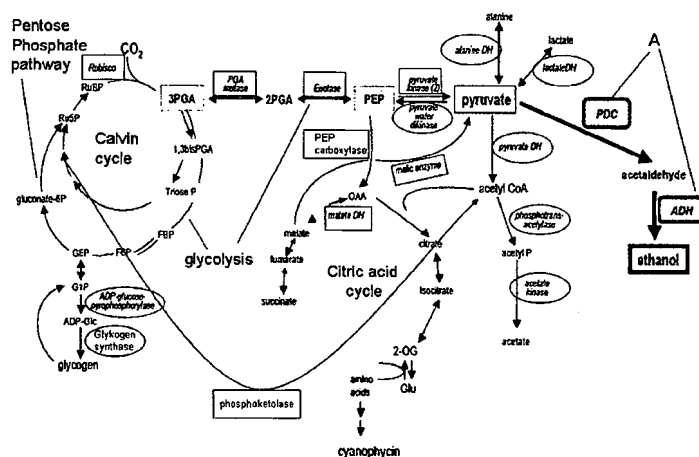
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: METABOLICALLY ENHANCED PHOTOAUTOTROPHIC ETHANOL PRODUCING HOST CELLS, METHOD FOR PRODUCING THE HOST CELLS, CONSTRUCTS FOR THE TRANSFORMATION OF THE HOST CELLS, AND METHOD OF PRODUCING ETHANOL USING THE HOST CELLS

Fig. 1



(57) Abstract: One embodiment of the invention provides a metabolically enhanced photoautotrophic, ethanol producing host cell comprising: at least two first metabolic enhancements reducing the enzymatic activity or affinity of at least two endogenous host cell enzymes involved in acetate and lactate fermentation, the first metabolic enhancements resulting in an enhanced level of biosynthesis of acetaldehyde, pyruvate, acetyl-CoA or precursors thereof compared to the respective wild type host cell, at least one second metabolic enhancement different from the first metabolic enhancement comprising an overexpressed enzyme for the formation of ethanol.

- 1 -

CÉLULAS HOSPEDERAS FOTOAUTOTRÓFICAS METABÓLICAMENTE POTENCIADASPRODUCTORAS DE ETANOL, MÉTODO PARA PRODUCIR LAS CÉLULASHOSPEDERAS, CONSTRUCTOS PARA LA TRANSFORMACIÓN DE LAS CÉLULASHOSPEDERAS, Y MÉTODO PARA PRODUCIR ETANOL USANDO LAS CÉLULAS

5

HOSPEDERASCAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se relaciona con el campo de la producción
10 de etanol usando células metabólicamente potenciadas. La
solicitud de patente PCT/EP2009/000892 presentada el 9 de
febrero de 2009 se incorpora aquí como referencia en su
totalidad.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Sin nuevos métodos para la producción de biocombustible,
el mundo continuará dependiendo de los combustibles fósiles
para el transporte. La demanda cada vez mayor, la disminución
20 de las reservas y los riesgos geopolíticos han elevado
dramáticamente en años recientes el costo de los combustibles
fósiles. El uso de los combustibles fósiles libera además
dióxido de carbono en la atmósfera, lo cual puede causar
efectos ambientales perjudiciales. Muchos gobiernos han
25 recomendado una reducción en el uso a favor de los
biocombustibles renovables alternativos en un esfuerzo para
refrenar la liberación de dióxido de carbono de los vehículos
de transporte.

- 2 -

El etanol puede ser usado como biocombustible renovable pero actualmente no hay métodos que puedan producir etanol en cantidades suficientes y a un precio que pudiese conllevar a una amplia adopción del etanol como alternativa principal a los combustibles fósiles en el mercado mundial de combustibles de transporte.

La literatura de patente y científica aquí citada establece el conocimiento que está disponible para los expertos en la técnica. Las patentes estadounidense y extranjera expedidas, las solicitudes de patente estadounidense y extranjeras publicadas, y todas las otras publicaciones aquí citadas se incorporan en la presente como referencia. Adicionalmente, todas las secuencias de aminoácido y de ácido nucleico con las respectivas secuencias de aminoácido codificadas así identificadas mediante un número de acceso de base de datos se incorporan aquí como referencia.

Los aspectos de la invención utilizan técnicas y métodos comunes a los campos de la biología molecular, la microbiología y el cultivo de células. Las referencias de laboratorio útiles para estos tipos de metodologías ya están disponibles para los expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Tercera Edición), Sambrook, J., et al. (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press; Current Protocols in Microbiology (2007) editado por Coico, R, et al., John Wiley and Sons, Inc; The Molecular Biology of Cyanobacteria (1994)

- 3 -

Donald Bryant (Ed.), Springer Netherlands; Handbook of
Microalgal Culture: Biotechnology And Applied Phycology (2003)
Richmond, A.; Blackwell Publishing; y "The cyanobacteria,
molecular Biology, Genomics and Evolution", editado por Antonia
5 Herrero y Enrique Flores, Caister Academic Press, Norfolk, RU,
2008.

Definiciones

10 Según se usa aquí, el término "metabólicamente potenciado" se
refiere a cualquier cambio en el genoma endógeno de una célula
de tipo natural o a la adición de un código genético no
endógeno a la célula de tipo natural, por ejemplo, la
introducción de un gen heterólogo. Más específicamente, dichos
15 cambios son hechos por la mano del hombre mediante el uso de
tecnología de ADN recombinante o mutagénesis.

Los cambios pueden involucrar secuencias de codificación
de proteína o secuencias que no modifican proteínas tales como
20 secuencias reguladoras como promotores o potenciadores.

El término "ácido nucleico" está destinado a incluir
moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, los polinucleótidos
que incluyen un marco abierto de lectura que codifica un
25 polipéptido, y puede incluir además secuencias reguladoras no
codificadas, e intrones en el caso de organismos eucarióticos
por ejemplo algas. Además, los términos están destinados a
incluir uno o más genes que se planifican en un lugar

- 4 -

funcional. Además, los términos están destinados a incluir un gen específico para un propósito elegido. El gen puede ser endógeno para la célula hospedera o puede ser recombinantemente introducido en la célula hospedera.

5

La frase "enlazado de forma operativa" significa que la secuencia de nucleótido de la molécula de ácido nucleico o gen de interés está enlazado con la(s) secuencia(s) regulador(as) de manera que permite la expresión (por ejemplo, expresión
10 potenciada, incrementada, constitutiva, basal, atenuada, disminuida o reprimida) de la secuencia de nucleótido y expresión de un producto genético codificado por la secuencia de nucleótido (por ejemplo, cuando la molécula de ácido nucleico recombinante se incluye en un vector recombinante,
15 como se define aquí, y se introduce en un microorganismo).

El término "molécula de ácido nucleico recombinante" incluye una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ADN) que ha sido alterada, potenciada o diseñada de
20 modo que difiere en la secuencia de nucleótido de la molécula de ácido nucleico nativo o natural de la que se derivó la molécula de ácido nucleico recombinante (por ejemplo, mediante la adición, eliminación o sustitución de uno o más nucleótidos). Ventajosamente, una molécula de ácido nucleico
25 recombinante (por ejemplo, una molécula de ADN recombinante) incluye una molécula de ácido nucleico aislada o gen de la presente invención.

- 5 -

Los términos "célula hospedera" y "célula hospedera recombinante" están destinados a incluir una célula apropiada para la manipulación metabólica, por ejemplo, que puede incorporar secuencias de polinucleótido heterólogo, por ejemplo, que se puede transformar. La célula puede ser una célula procariótica o una célula eucariótica. El término está destinado a incluir la progenie de la célula originalmente transformada. En modalidades particulares, la célula es una célula procariótica, por ejemplo, una célula cianobacteriana. Particularmente, el término célula hospedera recombinante está destinado a incluir una célula que ya ha sido seleccionada o diseñada por tener ciertas propiedades convenientes y apropiadas para un potenciamiento adicional usando las composiciones y los métodos de la invención.

El término "promotor" está destinado a incluir un segmento de polinucleótido que puede controlar en forma transcripcional un gen de interés, por ejemplo, un gen de piruvato descarboxilasa que sí controla en forma transcripcional o no en la naturaleza. En una modalidad, el control transcripcional de un promotor da como resultado un aumento en la expresión del gen de interés. En otra modalidad, un promotor se coloca en 5' al gen de interés. Un promotor puede ser usado para reemplazar el promotor natural, o puede ser usado además del promotor natural. Un promotor puede ser endógeno con respecto a la célula hospedera en la que se usa o puede ser una secuencia de polinucleótido heterólogo en la célula hospedera, por ejemplo, exógena con respecto a la célula hospedera en la que se usa.

- 6 -

Los promotores de la invención también pueden ser inducibles, que significa que ciertos estímulos exógenos (por ejemplo, extrabasación de nutriente, choque térmico, tensión mecánica, exposición a la luz, etc.) inducirán a que el promotor se
5 oriente a la transcripción del gen detrás.

El término "aproximadamente" se usa aquí para significar cerca de, en el orden de, aproximadamente, o alrededor de. Cuando el término "aproximadamente" se usa conjuntamente con un
10 valor/rango numérico, este modifica ese valor/rango extendiendo los límites sobre y debajo del (de los) valor(es) establecidos. En general, el término "aproximadamente" se usa aquí para modificar un(s) valor(es) numérico(s) sobre y debajo de (de los) valor(es) establecido(s) mediante una diferencia de 20%.

15

Según se usa aquí, la frase "actividad incrementada" se refiere a cualquier potenciación metabólica que da como resultado niveles incrementados de enzima en una célula hospedera. Como lo sabe una persona entendida en la técnica,
20 la actividad enzimática puede ser incrementada aumentando el nivel de transcripción, modificando ya sea la función del promotor o aumentando el número de copias del gen, aumentando la eficiencia traslacional de un ARN mensajero enzimático, por ejemplo, modificando el aglutinamiento ribosómico, o aumentando
25 la estabilidad de una proteína enzimática, en la que la vida media de la proteína se incrementa, conlleva a más moléculas enzimáticas en la célula. Todos estos representan ejemplos no limitantes de la actividad incrementada de una enzima. (mRNA

- 7 -

Processing and Metabolism: Methods and Protocols, editado por Daniel R. Schoenberg, Humana Press Inc., Totowa, NJ; 2004; ISBN 1-59259-750-5; Prokaryotic Gene Expression (1999) Baumberg, S., Oxford University Press, ISBN 0199636036; The Structure and
5 Function of Plastids (2006) Wise, R.R. y Hooper J.K., Springer, ISBN 140203217X; The Biomedical Engineering Handbook (2000) Bronzino, J.D., Springer, ISBN 354066808X).

En un aspecto, la invención proporciona además ácidos
10 nucleicos, que son por lo menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% idénticos a los ácidos nucleicos promotores allí divulgados y a los ácidos nucleicos, los cuales codifican proteínas, por ejemplo enzimas para la formación de etanol o enzimas de células hospederas involucradas en la conversión o formación de
15 acetil CoA, acetaldehído o piruvato. La invención proporciona además secuencias de aminoácido para las enzimas para la formación de etanol o las enzimas de célula hospedera involucradas en la conversión o formación de acetil-CoA, acetaldehído o piruvato o para la formación de compuestos de
20 reserva, que son por lo menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% idénticos a las secuencias de aminoácido aquí divulgadas.

El porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico o dos secuencias de aminoácido puede determinarse
25 usando el algoritmo de Thompson et al. (CLUSTALW, 1994 Nucleic Acid Research 22: 4673-4, 680). Una secuencia de nucleótido o una secuencia de aminoácido también se puede usar como una denominada "secuencia de consulta" para realizar búsquedas

- 8 -

frente a bases de datos públicas de ácido nucleico de secuencia de proteína para, por ejemplo, identificar otros genes homólogos desconocidos, que además se pueden usar en modalidades de esta invención. Además, cualquiera de las

5 secuencias de ácido nucleico o secuencias de proteína divulgadas en esta solicitud de patente también se pueden usar como "secuencia de consulta" para identificar secuencias aún desconocidas en bases de datos públicas, que pueden codificar por ejemplo nuevas enzimas, lo cual puede ser útil en esta

10 invención. Dichas búsquedas pueden realizarse usando el algoritmo de Karlin y Altschul (1999) Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 87: 2,264 a 2,268), modificado como en Karlin y Altschul (1993 Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 90: 5,873 a 5,877). Dicho

15 algoritmo es incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al. (1999 Journal of Molecular Biology 215: 403 a 410). Los parámetros apropiados para estas búsquedas de base de datos con estos programas son, por ejemplo, una puntuación de 100 y una longitud de palabra de 12 para las búsquedas de

20 nucleótido BLAST según se realiza con el programa NBLAST. Las búsquedas de proteína BLAST se realizan con el programa XBLAST con una puntuación de 50 y una longitud de palabra de 3. Donde existen espacios entre dos secuencias, se utiliza BLAST espaciado como se describe en Altschul et al. (1997 Nucleic

25 Acid Reseach, 25: 3,389 a 3,402).

Los números de ingreso de la base de datos dados a continuación son para la CyanoBase, la base de datos del genoma

- 9 -

para la cianobacterias (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/index.html>); Yazukazu et al. "Cyanobase, the genome database for *Synechocystis* sp. Strain PCC6803; status for the year 2000", Nucleic Acid Research, 2000, Vol. 18, página 72.

5

Un objetivo de las modalidades de la invención es proporcionar una célula hospedera metabólicamente potenciada, la cual puede ser útil para la producción de etanol.

10

Este objetivo se consigue proporcionando una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo con la reivindicación base 1. Otras modalidades de la célula hospedera metabólicamente potenciada, así como constructos para producir las células hospederas metabólicamente potenciadas y un método para producir etanol utilizando las células hospederas metabólicamente potenciadas son materia de reivindicaciones adicionales.

15

Modalidad de nocaout metabólico y/o sobreexpresión de las enzimas con ruta metabólica

20

Un aspecto de la invención proporciona una célula hospedera fotoautotrófica metabólicamente potenciada productoras de etanol que comprende:

25

- al menos dos primeras estimulaciones metabólicas que reducen la actividad o afinidad enzimática de al menos dos enzimas de célula hospedera endógena involucradas en la fermentación de acetato y lactato,

- 10 -

- las primeras estimulaciones metabólicas que dan como resultado un nivel elevado de biosíntesis de acetaldehído, piruvato, acetil-CoA o precursores de los mismos comparado con la respectiva célula hospedera de tipo natural,
- 5 - por lo menos una segunda estimulación metabólica diferente de la primera estimulación metabólica que comprende una enzima de sobreexpresión para la formación de etanol.

El acetaldehído, el piruvato y el acetil-coA o sus
10 precursores son importantes intermedios metabólicos para la producción de energía en las células. En las células fotoautotróficas, que utilizan luz, CO₂, y agua como fuente de energía para producir carbohidratos vía fotosíntesis, acetaldehído, piruvato, acetil-CoA y sus precursores se pueden
15 formar mediante conversión de moléculas orgánicas obtenidas vía fijación de CO₂ en el ciclo de Calvin, por ejemplo 3-fosfoglicerato. El piruvato, el acetil-CoA y sus precursores son importantes intermedios metabólicos obtenidos por ejemplo mediante fijación fotosintética de CO₂ en células
20 fotoautotróficas. El acetaldehído es un intermedio metabólico de la ruta de fermentación anoxigénica en muchas células fotoautotróficas.

Los precursores de piruvato y acetil-CoA son compuestos
25 orgánicos, los cuales pueden ser convertidos en estos intermedios metabólicos importantes vía la acción enzimática de las enzimas de la célula fotoautotrófica. Por ejemplo, los compuestos orgánicos 2-fosfoglicerato, 3-fosfoglicerato o

- 11 -

fosfoenolpiruvato pueden convertirse en piruvato mediante enzimas de la ruta glicolítica en células fotoautotróficas.

La célula hospedera fotoautotrófica metabólicamente
5 potenciada productora de etanol comprende por lo menos dos estimulaciones metabólicas diferentes, una primera y segunda estimulación metabólica. La primera estimulación metabólica cambia la actividad enzimática o la afinidad de por lo menos dos enzimas de la célula hospedera endógena involucradas en la
10 fermentación de acetato y lactato, dando como resultado un mayor nivel de biosíntesis de acetil-CoA, acetaldehído, piruvato o precursores de los mismos. La enzima hospedera endógena ya está presente en una célula hospedera de tipo natural sin modificar y su actividad o afinidad es cambiada
15 mediante la primera estimulación metabólica para aumentar el nivel de biosíntesis de los intermedios metabólicos, que también están presentes en la célula hospedera de tipo natural y que puede usarse para formar etanol.

20 Además, la célula hospedera fotoautotrófica metabólicamente potenciada productora de etanol comprende comprende una segunda estimulación metabólica en forma de por lo menos una enzima sobreexpresada, la cual puede formar etanol, por ejemplo a partir de los intermedios metabólicos
25 importantes anteriormente mencionados. En una modalidad adicional la enzima sobreexpresada para la formación de etanol puede catalizar la última etapa de la formación de etanol conllevando al producto final etanol. La enzima sobreexpresada

- 12 -

para la formación de etanol también puede catalizar la penúltima etapa de la formación de etanol dando como resultado un intermedio metabólico, el cual puede ser además convertido por otra enzima para la formación de etanol en el producto final etanol.

La enzima para la formación de etanol puede ser, por ejemplo, una enzima endógena que ya está presente en una célula hospedera fotoautotrófica de tipo natural, que no está metabólicamente potenciada. En este caso, la actividad o afinidad de la enzima para la formación de etanol puede ser mejorada por la segunda estimulación metabólica, por ejemplo mediante diseño metabólico o mutagénesis aleatoria. Esto se puede hacer, por ejemplo modificando metabólicamente la secuencia de amino ácido de la enzima mediante mutagénesis de sitio dirigida o aleatoria del gen que codifica esta enzima endógena, potenciando de esta manera su actividad para la formación de etanol. Otra posibilidad es aumentar el número de copias de genes que codifican la enzima en la célula hospedera o simplemente mejorando la velocidad de transcripción del gen que ya está presente en la célula de tipo natural para aumentar la abundancia de su ARN mensajero en la segunda estimulación metabólica. Esto se puede realizar, por ejemplo reemplazando o mutando el promotor endógeno que controla la transcripción del gen endógeno que codifica la enzima para la formación de etanol.

- 13 -

Alternativa o adicionalmente una enzima heteróloga para la formación de etanol puede ser introducida en la célula hospedera mediante la segunda estimulación metabólica, si esa enzima no está presente en una célula hospedera de tipo natural
5 metabólicamente no modificada. Esto se puede hacer, por ejemplo, introduciendo un constructo, por ejemplo un vector ADN en la célula hospedera que incluye un gen heterólogo que codifica la enzima sobreexpresada para la formación de etanol. En ese caso en el que una enzima endógena para la formación de
10 etanol ya está presente en una célula hospedera fotoautotrófica de tipo natural, la enzima heteróloga para la formación de etanol puede potenciar la actividad de la enzima endógena que da como resultado una mayor velocidad de la formación de etanol.

15

La actividad enzimática y la afinidad de una enzima para su sustrato son importantes características cinéticas. La actividad enzimática está dada por el parámetro $V_{\max}$, que refleja la máxima velocidad de una reacción enzimática que
20 ocurre en concentraciones de alto sustrato cuando la enzima es saturada con su sustrato. La afinidad está dada por la constante de Michaelis-Menten K_m que es la concentración de sustrato requerida por una enzima para alcanzar un medio de su máxima velocidad. Para aumentar la actividad enzimática $V_{\max}$
25 tiene que aumentar, mientras que para disminuir la afinidad K_m tiene que reducir.

- 14 -

Respecto a una explicación adicional de la cinética de la enzima, se hace referencia al capítulo "cinética de la enzima" en el libro de texto "Bioquímica" de Donald Voet y Judith Voet (John Wiley & Sons, 1990, páginas 335 a 340).

5

El mayor nivel de la biosíntesis de acetil-CoA, acetaldehído, piruvato o precursores de los mismos da como resultado un cambio de flujo de acetil-CoA, acetaldehído, piruvato o precursores de los mismos en dirección de por lo menos una enzima sobreexpresada para la formación de etanol de modo que la formación de etanol puede ser incrementado en comparación con una célula hospedera fotoautotrófica productora de etanol que hospeda solamente la segunda estimulación metabólica, pero carente de la primera estimulación metabólica.

15

El acetil-CoA, el acetaldehído, el piruvato o los precursores de los mismos son intermedios metabólicos transitorios, que a menudo son rápidamente procesados en otros metabolitos mediante la célula hospedera fotoautotrófica y por lo tanto un cambio en el nivel de la biosíntesis de estos intermedios metabólicos puede ser difícil de detectar en las células hospederas fotoautotróficas que muestran la primera estimulación metabólica pero que carecen de la segunda estimulación metabólica.

25

Una primera estimulación metabólica da como resultado por lo tanto un mayor nivel de biosíntesis de acetil-CoA, acetaldehído, piruvato o precursores de los mismos comparado

- 15 -

con la respectiva célula hospedera de tipo natural, si después de la introducción de la segunda estimulación metabólica se puede detectar un mayor nivel de formación de etanol en una célula que hospeda la primera y segunda estimulación metabólica
5 que en una célula que solamente hospeda la segunda estimulación metabólica pero que carece de la primera estimulación metabólica. Esto incluso se aplica si un cambio en el nivel de la biosíntesis de estos intermedios metabólicos pudiese no ser detectado en la célula hospedera fotoautotrófica que hospeda la
10 primera estimulación metabólica pero que carece de la segunda estimulación metabólica en comparación con la respectiva célula hospedera fotoautotrófica de tipo natural, la cual no hospeda la primera y segunda estimulación metabólica.

15 En particular, la célula hospedera fotoautotrófica metabólicamente potenciada puede comprender más de dos primeras estimulaciones metabólicas y puede comprender además más de una segunda estimulación metabólica. Por ejemplo las primeras estimulaciones metabólicas pueden comprender por lo menos tres
20 estimulaciones metabólicas, las cuales son lactato deshidrogenasa fosfotransacetilasa y acetato de quinasa.

Mediante la presente invención se descubrió que reduciendo la afinidad enzimática o la actividad del lactato
25 deshidrogenasa y una enzima seleccionada de fosfotransacetilasa y acetato de quinasa el nivel de un piruvato en particular puede ser incrementado. El piruvato es un sustrato importante para las enzimas etanologénicas tales como piruvato

- 16 -

descarboxilasa, de modo que el piruvato puede ser usado para la producción de etanol.

La célula hospedera fotoautotrófica metabólicamente
5 potenciada muestra una alta producción de etanol debido al
hecho de que la enzima formadora de etanol está sobreexpresada
debido a que la segunda estimulación metabólica que conlleva a
una alta actividad enzimática para la formación de etanol y al
mismo tiempo un mayor nivel de biosíntesis de acetaldehído,
10 piruvato, acetil-CoA o sus precursores se forma en las células
comparado con las respectivas células de tipo natural debido a
las primeras estimulaciones metabólicas. El acetaldehído, el
piruvato, el acetil-CoA o sus precursores sirven como sustratos
para la producción de etanol. Estos intermediarios metabólicos
15 pueden ser un sustrato directo para una primera enzima
sobreexpresada para la formación de etanol o para otra segunda
enzima sobreexpresada para la formación de etanol, que luego
cataliza la formación de un sustrato para la primera enzima
sobreexpresada para la formación de etanol.

20

Incluso en otra modalidad de la célula hospedera de la
invención, por lo menos una enzima sobreexpresada para la
formación de etanol es alcohol deshidrogenasa.

25 Una alcohol deshidrogenasa cataliza la reducción de un
sustrato a etanol. Esta reacción es normalmente dependiente
del cofactor NADH. Alternativamente, hay alcohol
deshidrogenasas que son dependientes de NADPH.

- 17 -

Más aún, la alcohol deshidrogenasa puede ser una alcohol deshidrogenasa termófila. El alcohol deshidrogenasa termófila puede, por ejemplo, obtenerse de una célula hospedera que puede normalmente crecer bien a temperaturas por encima de 45°C. Los alcohol deshidrogenasas termófilas pueden ser más estables y probablemente más activas a temperaturas mayores que los alcohol deshidrogenasas obtenidas a partir de células hospederas mesófilas, que normalmente crecen a temperaturas por debajo de 45°C. Un posible ejemplo para dichas alcohol deshidrogenasas termófilas es la alcohol deshidrogenasa AdhE obtenida de la cianobacteria termófila *Thermosynechococcus* sp. o de *E. coli* (ver la Figura 44A para la secuencia de ácido nucleico y la Figura 44B para la secuencia de amino ácido de la secuencia de la proteína ThAdhE BAC07780).

Un posible sustrato para la alcohol deshidrogenasa puede ser acetil-CoA, que por ejemplo se puede convertir directamente en etanol mediante alcohol deshidrogenasa anteriormente mencionado AdhE de *Thermosynechococcus* o *E. coli*.

Sobreexpresar dicha alcohol deshidrogenasa en una célula hospedera metabólicamente potenciada tiene la ventaja de que solamente una enzima tiene que ser sobreexpresada para mejorar el nivel de la producción de etanol. En caso de que el nivel de la biosíntesis de acetil-CoA de la célula hospedera se incremente debido a la sobreexpresión de acetil-coenzima A que forma enzimas y debido a la reducción de la actividad enzimática de las enzimas convertidoras de acetil-CoA, puede dar como resultado un alto nivel de formación de etanol.

- 18 -

En otra modalidad de la invención, se puede proporcionar una célula hospedera metabólicamente potenciada, la cual comprende además:

- 5 - piruvato descarboxilasa que convierte el piruvato en acetaldehído, en donde la alcohol deshidrogenasa convierte el acetaldehído en etanol.

10 En este caso, el sustrato para la alcohol deshidrogenasa es proporcionado por otra segunda enzima sobreexpresada, por ejemplo piruvato descarboxilasa, que se introduce en la célula hospedera vía una segunda estimulación metabólica. Debido al hecho de que el nivel de la biosíntesis de piruvato de la

15 célula hospedera es aumentado debido a las estimulaciones anteriormente mencionadas de las actividades enzimáticas formadoras y convertidoras de piruvato a modo de la primera estimulación metabólica, se forma más acetaldehído vía la actividad enzimática de piruvato descarboxilasa. Por lo tanto,

20 hay una síntesis potenciada de acetaldehído, que luego es posteriormente convertida mediante alcohol deshidrogenasa, la primera enzima sobreexpresada para la formación de etanol a etanol dando como resultado un mayor nivel de etanol intracelular o extracelular en la célula hospedera. La alcohol

25 deshidrogenasa, así como el piruvato descarboxilasa pueden obtenerse de organismos que fermentan el alcohol tales como las bacterias *Zymomonas mobilis*, *Zymobacter palmae* u otras procariotas que llevan genes que codifican el piruvato

- 19 -

descarboxilasa con características enzimáticas comparables o mejores, así como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* u otras eucariotas que llevan genes que codifican las piruvato descarboxilasas con características enzimáticas comparables o
5 mejores.

En otra modalidad de la invención la célula hospedera metabólicamente potenciada comprende dos segundas estimulaciones metabólicas, una que comprende alcohol deshidrogenasa Adh que convierte acetaldehído en etanol y otra
10 segunda estimulación metabólica que comprende acetilaldehído deshidrogenasa dependiente de Co-A que convierte acetil-CoA en acetaldehído.

Incluso en otra modalidad de la invención la célula
15 hospedera metabólicamente potenciada hospeda una enzima de piruvato desacrobixlasa como la única segunda estimulación metabólica. Dicha única segunda estimulación metabólica es particularmente ventajosa en las células hospederas metabólicamente potenciadas, que ya tienen una enzima endógena
20 de alcohol deshidrogenasa. Mediante la presente invención se ha descubierto sorprendentumente que la actividad de dicha enzima endógena de alcohol deshidrogenasa puede ser suficientemente alta para convertir todo o casi todo el acetaldehído formado por la enzima sobreexpresada de piruvato
25 descarboxilasa en etanol.

Por ejemplo todas las células hospederas cianobacterianas hospedan por lo menos una enzima endógena de alcohol

- 20 -

deshidrogenasa. Un ejemplo preferido es la cianobacteria *Synechocystis* en particular *Synechocystis* PCC6803 o nitrógeno que fija las cianobacterias tales como *Nostoc/Anabaena spec.* PCC7120 y *Anabaena variabilis* ATCC 29413.

5

En una modalidad adicional de la invención la célula hospedera fotoautotrófica metabólicamente potenciada productora de etanol es un organismo acuático. Este organismo acuático puede ser, por ejemplo, una especie de agua dulce que vive en los lagos, ríos, corrientes o humedales. Alternativamente, el organismo acuático puede ser un organismo marino, el cual vive en agua salada, por ejemplo océanos. El organismo acuático puede ser también una especie de agua dulce, que muestra una alta tolerancia para agua salobre o incluso agua salada.

10

Mediante la presente invención se ha descubierto además cepas de agua dulce que pueden desarrollarse en medios marinos con la misma velocidad de desarrollo que en los medios de agua dulce.

15

En otra modalidad la célula hospedera metabólicamente potenciada se selecciona a partir de un grupo que consiste de: algas y bacterias.

20

Las algas son un grupo diverso de organismos simples similares a una planta que incluyen formas unicelulares o multicelulares. Las algas son organismos fotosintéticamente activos, en particular fotoautótrofos, que producen compuestos orgánicos a partir de moléculas inorgánicas tales como CO₂ y agua usando luz como una fuente exterior de energía.

25

- 21 -

Se considera que las algas son organismos eucarióticos en particular protistas. Las protistas son organismos eucarióticos relativamente simples que son unicelulares o
5 multicelulares sin tejidos altamente especializados.

En particular, las algas protistas pueden incluir Clorofilas, que son algas verdes, tales como *Ulva chlatrata*, Rodofitos, que son algas rojas o heterokontophytes, que son
10 algas marrones. Una especie preferida de algas verdes es *Chlorella*. Otro ejemplo de algas verdes es *Chlamydomonas*, que son flagelados unicelulares. Un ejemplo particularmente bien conocido de *Chlamydomonas* es *Chlamydomonas reinhardtii*, que son
15 algas verdes móviles de una única célula que se encuentra en, por ejemplo, agua dulce. Las *Chlamydomonas reinhardtii* son además conocidas por producir menores cantidades de etanol vía fermentación bajo condiciones de oscuridad (Gfeller y Gibbs, Fermentative Metabolism de *Chlamydomonas reinhardtii*, Plant
Psychology (1984) 75, páginas 212 a 218).

20

En una modalidad adicional de la invención se proporciona una célula hospedera fotoautotrófica metabólicamente potenciada productora de etanol, la cual comprende:

25 - por lo menos una primera estimulación metabólica que potencia la actividad enzimática o la afinidad de las enzimas endógenas de célula hospedera seleccionadas de un

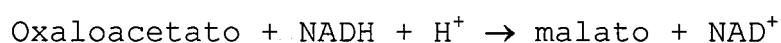
- 22 -

grupo que consiste de enzima málica y malato deshidrogenasa,

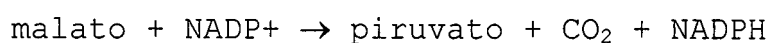
- por lo menos una segunda estimulación metabólica diferente de por lo menos dos primeras estimulaciones metabólicas que comprenden una enzima sobreexpresada para la formación de etanol,

- la primera y segunda estimulaciones metabólicas dan como resultado una velocidad incrementada de producción de etanol comparado con la respectiva célula hospedera fotoautorófica productora de etanol que hospeda la segunda estimulación metabólica pero que carece de las primeras estimulaciones metabólicas.

En el caso de que la actividad enzimática de malato deshidrogenasa, una enzima del ciclo de ácido cítrico y enzima málica, una enzima de etapas intermedias de metabolismo es potenciada, por ejemplo mediante co-sobreexpresión, el malato deshidrogenasa puede estimular la conversión de oxaloacetato a piruvato vía malato. La malato deshidrogenasa cataliza la conversión de oxaloacetato a malato usando NADH:



La enzima málica cataliza la conversión de malato en piruvato usando NADP⁺:



- 23 -

Alternativamente, la actividad enzimática o afinidad de solamente una de las enzimas enzima málica o malato deshidrogenasa puede ser potenciada, mediante por ejemplo la sobreexpresión.

5

Incluso en otra modalidad de la invención, se proporciona una célula hospedera fotoautotrófica metabólicamente potenciada productora de etanol, la cual comprende:

- 10 - por lo menos una primera estimulación metabólica que potencia la actividad enzimática o la afinidad de las enzimas endógenas de célula hospedera aldehído deshidrogenasa,
- 15 - por lo menos una segunda estimulación metabólica diferente de por lo menos una primera estimulación metabólica que comprende una enzima sobreexpresada para la formación de etanol,
- 20 - la primera y segunda estimulaciones metabólicas que dan como resultado una velocidad incrementada de producción de etanol comparado con la respectiva célula fotoautotrófica productora de etanol que hospeda la segunda estimulación metabólica pero que carece de la primera estimulación metabólica.

25 Una enzima de la ruta de fermentación, que puede estar sobreexpresada es por ejemplo la enzima de aldehído deshidrogenasa, que puede convertir acetato a acetaldehído y viceversa, aumentando de este modo el nivel de la biosíntesis

- 24 -

del acetaldehído en la célula hospedera. Alternativamente también otras enzimas de aldehído deshidrogenasa podrían ser sobreexpresadas para aumentar el nivel de biosíntesis de acetaldehído en la célula hospedera.

5

En una modalidad adicional de la invención, se proporciona una célula hospedera fotoautotrófica metabólicamente potenciada productora de etanol, la cual comprende:

- 10 - por lo menos dos primeras estimulaciones metabólicas que potencian la actividad enzimática o la afinidad de las enzimas endógenas de célula hospedera fosfocetolasa y
- por lo menos una segunda estimulación metabólica diferente de por lo menos dos primeras estimulaciones metabólicas
- 15 que comprenden una enzima sobreexpresada para la formación de etanol,
- la primera y segunda estimulaciones metabólicas que dan como resultado una velocidad incrementada de producción de etanol comparado con la respectiva célula hospedera
- 20 fotoautotrófica productora de etanol que hospeda la segunda estimulación metabólica pero que carece de las primeras estimulaciones metabólicas.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, la

25 actividad enzimática o la afinidad de la enzima fosfocetolasa (EC 4.1.2.-, fosfocetolasa putativa en *Synechocystis* PCC 6803 slr 0453) es potenciada en una primera estimulación metabólica para aumentar el nivel de la biosíntesis de las moléculas

- 25 -

precursoras para la generación de acetil-CoA y acetaldehído. La fosfoacetolasa cataliza la formación de acetil fosfato y gliceraldehído 3-fosfato, un precursor de 3-fosfo-glicerato a partir de xilulosa-5-fosfato que es un intermedio del ciclo Calvin. La estimulación concomitante de la actividad enzimática o la afinidad de la enzima fosfoacetil-transacetilasa, que cataliza la interconversión de acetilfosfato y el acetil-CoA puede potenciar el nivel de, por ejemplo, acetil-CoA y piruvato. En particular el acetilfosfato producido mediante la fosfoacetolasa sobreexpresada puede convertirse además en acetil-CoA vía la acción enzimática de la fosfoacetiltransacetilasa sobreexpresada. Sin limitarse por la teoría, un nivel potenciado de acetil-CoA puede conllevar a un efecto de retroalimentación y aminorar la conversión de piruvato en acetil-CoA.

Cualquiera de las estimulaciones anteriormente mencionadas, por ejemplo pero sin limitarse a las diferentes enzimas etanologénica para la segunda estimulación metabólica o los diferentes promotores, que se describen en relación con por lo menos las dos primeras estimulaciones metabólicas que reducen la actividad enzimática o afinidad de por lo menos dos enzimas endógenas de célula hospedera involucradas en la fermentación de acetato y lactato se puede usar además conjuntamente con la estimulación de la actividad enzimática o afinidad de la enzima málica y/o malato deshidrogenasa, o aldehído deshidrogenasa o fosfoacetolasa y fosfoacetil-transacetilasa.

- 26 -

Además en otra modalidad de la invención, la célula hospedera metabólicamente potenciada que hospeda cualquiera de las primeras estimulaciones metabólicas anteriormente descritas

5 puede comprender además enzimas sobreexpresadas como una primera estimulación metabólica o enzimas etanologénicas sobreexpresadas para la formación de etanol como segunda estimulación metabólica, las cuales están bajo el control transcripcional de varios promotores inducibles o
10 constitutivos, en donde los promotores se seleccionan de un grupo que consiste de:

- rbcLS, ntcA, nblA, isiA, petJ, petE, sigB, lrtA, htpG, hspA, clpB1, hliB, ggpS, psbA2, psaA, nirA y crhC.

15

Los promotores hspA, clpB1 y hliB pueden ser inducidos por choque térmico (elevando la temperatura de desarrollo del cultivo de la célula hospedera de 30°C a 40°C), choque por frío (reduciendo la temperatura de desarrollo del cultivo celular de
20 30°C a 20°C), estrés oxidativo (por ejemplo añadiendo oxidantes tales como peróxido de hidrógeno al cultivo), o estrés osmótico (por ejemplo aumentando la salinidad). El promotor sigB puede ser inducido por el desarrollo estacionario, choque térmico y estrés osmótico. Los promotores ntcA y nblA pueden ser
25 inducidos disminuyendo la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo y los promotores psaA y psbA2 pueden ser inducidos por condiciones de luz baja o luz alta. El promotor htpG puede ser inducido por estrés osmótico y choque térmico.

- 27 -

El promotor crhC puede ser inducido por choque por frío. El
promotor crhC puede ser inducido por choque por frío. Un
aumento en la concentración de cobre se puede usar para inducir
el promotor pete, mientras que el promotor petJ es inducido
5 disminuyendo la concentración de cobre.

Todos los elementos promotores mencionados pueden ser
combinados con cualquiera de los genes que codifican cualquiera
de las enzimas de la invención usando técnicas estándar de
10 clonación molecular. En particular los promotores, que pueden
ser usados para la presente invención incluyen, pero sin
limitación:

(1) La Figura 45A ilustra la secuencia de nucleótido del
promotor petJ (*Synechocystis* sp. PCC 6803) (gen petJ: s111796
15 (que codifica el citocromo c553; expresión inducida bajo
extrabasación de cobre);

Referencia:

J Biol Chem. 2004 Feb 20;279(8): 7229-33. Epub 2003 Dec.
20 El funcionamiento eficiente de la fotosíntesis y la respiración
en *Synechocystis* sp. PCC 6803 requiere estrictamente la
presencia de tanto el citocromo c6 como la plastocianina.
Durán RV, Hervás M, De La Rosa MA, Navarro JA.

25 (2) La Figura 45B ilustra la secuencia de nucleótido del
promotor sigB (*Synechocystis* sp. PCC 6803)
Gen sigB: s110306 (que codifica para la ARN polimerasa factor
sigma del grupo 2) expresión inducida después del choque

- 28 -

térmico, en la fase de desarrollo estacionario/extrabasación de nitrógeno y oscuridad)

Referencias:

- 5 Arch Microbiol. 2006 Oct; 186(4):273-86. Epub 2006 Jul 26. La respuesta del choque térmico en la cianobacteria *Synechocystis* sp. Cepa PCC 6803 y la regulación de la expresión genética por HrcA y SigB.

Singh AK, Summerfield TC, Li H, Sherman LA

10

FEBS Lett. 2003 Nov 20;554(3): 357-62.

SigB/SigD antagonista inducido por oscuridad/luz, factores sigma del grupo 2, expresión a través de potencial redox y sus roles en cianobacterias.

- 15 Imamura S, Asayama M, Takahashi H, Tanaka K, Takahashi H, Shirai M

J Biol Chem. 2006 Feb 3; 281(5): 2668-75. Epub 2005 Nov 21.

- 20 Activación dependiente de la fase de desarrollo de los genes relacionados con el nitrógeno mediante una red de control de los factores sigma del grupo 1 y el grupo 2 en una cianobacteria.

Imamura S, Tanaka K, Shirai M, Asayama M.

- 25 (3) La Figura 45C ilustra la secuencia de nucleótido del promotor *htpG* (*Synechocystis* sp. PCC 6803) gen *htpG*: s110430: (que codifica para la proteína 90 de choque térmico, chaperona molecular) expresión inducida después del choque térmico

- 29 -

Referencia:

Plant Physiol. 1998 May; 117(1): 225-34.

El control transcripcional y postranscripcional de mRNA a
partir de *lrtA*, una transcripción reprimida por la luz en
Synechococcus sp. PCC 7002.

Samartzidou H, Widger WR

(4) La Figura 45D muestra la secuencia de nucleótido del
promotor *lrtA* (*Synechocystis* sp. PCC 6803) gen *lrtA*: s110947
(que codifica el homólogo A de proteína reprimida de la luz
expresión inducida después de la transición de la luz a la
oscuridad)

Referencia:

Plant Physiol. 1998 May; 117(1):225-34.

Control transcripcional y postranscripcional de mRNA a partir
de *lrtA*, una transcripción reprimida de luz en *Synechococcus*
sp. PCC 7002.

Smartziduo H, Widger WR

(5) La secuencia de nucleótido del **promotor** *psbA2*
(*Synechocystis* sp. PCC 6803) (ver la Figura 45E) gen *psbA2*:
slr1311 (que codifica el fotosistema II proteína D1) expresión
inducida después de la transición de oscuridad a luz

Referencia:

- 30 -

Biochem Biophys Res Commun. 1999 Feb 5; 255(1):47-53.

Transcripciones dependientes de la luz y psbA rítmica en células cianobacterianas homólogas/heterólogas.

Agrawal GK, Asayama M, Shirai M.

5

(6) La Figura 45F muestra la secuencia de nucleótido del promotor *rbcL* (*Synechocystis* sp. PCC 6803) gen *rbcL*: slr0009 (que codifica la expresión fuerte constitutiva de una subunidad grande de ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa bajo condiciones de luz continua

10

Referencia:

Plant Mol Biol. 1989 Dec; 13(6):693-700

Influencia de la luz en la acumulación de transcripciones de fotosíntesis-específicas en la cianobacteria *Synechocystis* 6803.

15

Mohamed A, Jansson C.

(7) La Figura 45G ilustra la secuencia de nucleótido del promotor *psaA* (*Synechocystis* sp. PCC6803); gen *PsaA* slr1834

20

(que codifica la subunidad Ia apoproteína P700) expresión inducida bajo luz blanca y luz naranja, bajo nivel de expresión bajo luz alta y luz roja, reprimido en la oscuridad.

Referencias:

25 Plant Cell Physiol. 2005 Sep; 46(9): 1484-93. Epub 2005 Jun 24.

- 31 -

Regulación de los genes centrales de reacción del fotosistema I en *Synechocystis* sp. cepa PCC 6830 durante aclimatación con luz.

Herranen M, Tyystjärvi T, Aro EM.

5

Plant Cell Physiol. 2006 Jul; 47(7): 878-90. Epub 2006 May 16.

Caracterización de los promotores responsables de luz alta de los genes *psaAB* en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Muramatsu M, Hihara Y.

10

(8) La Figura 45H muestra la secuencia de nucleótido del promotor *ggsS* (*Synechocystis* sp. PCC 6803); genes *ggsS*: s111566 (que codifica la glucosilglicerolfosfato sintasa) expresión inducida después de estrés salino.

15

Referencia:

Plant Physiol. 2004 Oct; 136(2):3290-300. Epub 2004 Sep 10.

El perfil de expresión genética refleja los procesos fisiológicos en la aclimatación salina de la *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803.

20

Marin K, Kanesaki Y, Los DA, Murata N, Suzuki I, Hagemann M.

J. Bacteriol. 2002 Jun; 184(11):2870-7.

Expresión dependiente de la sal de la glucosilglicerol-fosfato sintasa, involucrada en la síntesis de osmolito en la cianobacteria *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803.

25

Marin K, Huckauf J, Fulda S, Hagemann M.

- 32 -

(9) La Figura 45I ilustra la secuencia de nucleótido del promotor nirA (Synechocystis sp. PCC 6803); gen nirA: slr0898 (que codifica ferredoxina-nitrito reductasa) expresión inducida después de la transición de amoníaco a nitrato.

5

Referencia:

Appl Environ Microbiol. 2005 Oct;71(10): 5678-84.

Aplicación del promotor Synechocystis nirA para estabilizar un sistema de expresión inducible para diseñar la ruta de Synechocystis tocoferol.

10

Qi Q, Hao M, Ng WO, Slater SC, Baszis SR, Weiss JD, Valentin HE.

J Bacteriol. 1998 Aug;180(16):4080-8

15

Secuencias que actúan con cis requeridas para regulación positiva dependiente de NtcB, que responde al nitrito del operón de asimilación de nitrato en la cianobacteria Synechocystis sp. cepa PCC 7942.

Maeda S, Kawaguchi Y, Ohe TA, Omata T.

20

(10) La Figura 45J ilustra la secuencia de nucleótido del promotor pete (Anabaena sp. PCC7120); gen pete: a110258 (que codifica el precursor plastocianina) expresión inducida a elevadas concentraciones de cobre.

25

Referencia:

Microbiology. 1994 May;140 (Pt 5):1151-9.

- 33 -

Los estudios de clonación, secuenciación y transcripción de los genes para citocromo c-553 y plastocianina de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Ghassemian M, Wong B, Ferreira F, Markley JL, Straus NA.

5

Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2001 Feb 27;98(5):2729-34. Epub 2001 Feb 20

Expresión del gen *Anabaena* hetR del promotor regulado por cobre conlleva a diferenciación de heterocisto bajo condiciones de represión.

10

Buikema WJ, Haselkorn R.

(11) La Figura 45K muestra la secuencia de nucleótido del promotor hspA (*Synechocystis* sp. PCC 6803); gen hspA: s111514
16.6 kDa proteína de pequeño choque térmico, promotor responsable multiestrés de chaperona molecular (estrés térmico, de frío, salino y oxidativo)

15

Referencia:

Curr Microbiol. 2004 Sep; 49(3):192-8.

20

Expresión del gen de choque térmico hsp16.6 y análisis del promotor en la cianobacteria, *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Fang F, Barnum SR.

J Exp Bot. 2006;57(7):1573-8. Epub 2006 Mar 30.

25

La respuesta de choque térmico de *Synechocystis* sp. PCC 6803 analizado por transcriptómicas y proteómicas.

Suzuki I, Simon WJ, Slabas AR.

- 34 -

(12) La Figura 45L ilustra la secuencia de nucleótido del promotor hliB (Synechocystis sp. PCC6803); gen hliB: ssr2595: polipéptido inducible por luz alta HliB, promotor responsable multi-estrés de superfamilia CAB/ELIP/HLIP (estrés térmico, de frío, salino y oxidativo)

Referencia:

J Biol Chem. 2001 Jan 5;276(1): 306-14.

Los polipéptidos inducibles por luz alta en Synechocystis sp. PCC6803. Expresión y función en luz alta.

He Q, Dolganov N, Bjorkman O, Grossman AR.

Arch Microbiol. 2007 Apr;187(4):337-42. Epub 2007 Feb 10.

El regulador de respuesta RpaB enlaza la secuencia 1 reguladora de luz alta corriente arriba del gen hliB inducible por luz alta de la cianobacteria Synechocystis sp. PCC 6803.

Kapell AD, van Waasbergen LG.

(13) La Figura 45M muestra la secuencia de nucleótido del promotor clpB1 (Synechocystis sp. PCC6803); gen clpB1: slr1641: proteasa Clp dependiente de ATP, Hsp 100, promotor responsable multiestrés ClpB de subunidad de enlazamiento ATP (estrés térmico, de frío, salino y oxidativo)

Referencia:

Microbiology. 2004 May;150(Pt 5):1271-81.

- 35 -

Efectos de luz alta en transcripciones de genes asociados con el estrés para la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Prochlorococcus* MED4 y MIT9313.

Mary I, Tu CJ, Grossman A, Vault D.

5

J Exp Bot. 2006;57(7): 1573-8. Epub 2006 Mar 30.

La respuesta de choque térmico de *Synechocystis* sp. PCC 6803 analizado por transcriptómicas y proteómicas.

Suzuki I, Simon WJ, Slabas AR.

10

Modalidades de la invención

A continuación las invenciones se explicarán más detalladamente con referencia a las figuras y ciertas

15 modalidades:

Las Figuras 1 y 3 ilustran esquemas generales de rutas metabólicas en Cianobacterias con enzimas marcadas para sobreexpresión y regulación por disminución o nocaout para el aumento de la biosíntesis de diferentes intermedios metabólicos, en particular acetil-CoA y piruvato.

20

La Figura 2 muestra un diagrama de flujo que incluye algunas enzimas etanologénicas para la producción de etanol.

25

La Figura 1 muestra algunas rutas metabólicas generales en cianobacterias como ejemplo no limitante. En particular, el ciclo de Calvin como parte independiente de luz de la fotosíntesis se muestra comenzando con la reacción de fijación

- 36 -

de dióxido de carbono catalizada por la enzima RubisCO. Además de la ruta de glicólisis, se muestran la ruta de pentosa fosfato y el ciclo de ácido cítrico. Las rutas metabólicas generales ilustran enzimas encajadas y rodeadas, cuya actividad o afinidad puede ser cambiada como parte de por lo menos una primera estimulación metabólica de una enzima hospedera endógena de la célula hospedera cianobacteriana. Las enzimas encajadas han sido sobreexpresadas comparado con las respectivas células cianobacterianas de tipo natural o son candidatas principales para sobreexpresión. Las enzimas rodeadas han sido deficientes o reguladas por disminución o son objetivos principales para nocaout o regulación por disminución. La razón principal para el nocaout o la sobreexpresión es mejorar el nivel de biosíntesis de piruvato en la célula metabólicamente potenciada por deficiencia o reduciendo la actividad o afinidad de las enzimas que consumen piruvato o sus metabolitos y para mejorar la actividad enzimática de las enzimas que producen piruvato o sus precursores tales como fosfoenolpiruvato (PEP). La célula hospedera cianobacteriana puede comprender más de una primera estimulación metabólica. Por ejemplo, las enzimas que mejoran el nivel de la biosíntesis de piruvato tal como enolasa, fosfocetolasa o enzima málica pueden ser sobreexpresadas y la actividad o afinidad de las enzimas que consumen piruvato, tales como las enzimas de la ruta fermentativa tal como lactato deshidrogenasa, fosfoacetiltransacetilasa y acetato quinasa puede reducirse o abolirse mediante nocaout de los respectivos genes en una célula hospedera cianobacteriana.

- 37 -

La Figura 2 muestra más detalladamente las últimas etapas de la síntesis de etanol en cianobacterias metabólicamente potenciadas.

5

La Figura 3 ilustra otra representación no limitante de las rutas metabólicas de una cianobacteria. En contraste con la Figura 1 se muestra un acetaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD, el cual puede convertir acetato en acetaldehído, que luego puede convertirse en etanol mediante una enzima Adh. Dicha aldehído deshidrogenasa puede ser sobreexpresada para aumentar el nivel de acetaldehído para la producción de etanol.

15 1. Construcción general de vectores ADN para sobreexpresión

Las secuencias de ADN que codifican los genes de interés fueron estimulados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos. Cuando la secuencia genómica no contuvo apropiados sitios de restricción para clonación, se diseñaron cebadores que contenían sitios de restricción. El ADN genómico de la *Synechocystis sp.* PCC 6803 se usó como plantilla. Los fragmentos estimulados de PCR fueron digeridos con las apropiadas enzimas de restricción y se clonaron en un plásmido de auto-replicación (serie pSK) o un plásmido integrador (serie pSK). Como promotores se usaron la región 5' genómica del mismo gen específico o alternativamente un promotor inducible similar a PpetJ. (PpetJ, pVZ, pSK, para

- 38 -

una descripción ver abajo los mencionados constructos adh/pdc).

Un casete de resistencia al antibiótico para la selección de clones positivos está presente en el apropiado plásmido. Las estructuras y las secuencias de todos los vectores de ADN

5 usados se describen más adelante. El diseño metabólico de los constructos así como las PCRs, ligaduras en los vectores de clonación, las inserciones de los casetes de resistencia a los antibióticos y las transformaciones en *E. coli* se hicieron usando procedimientos estándar (estado de la técnica) o de
10 acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Todos los plásmidos pVZ fueron transferidos a *Synechocystis sp.* PCC 6803 mediante el protocolo más adelante descrito "Protocolo general para la conjugación". Los constructos pSK, pUC o pBluescript fueron transferidos a *Synechocystis sp.* PCC 6803
15 mediante el protocolo más adelante descrito "Protocolo general para la transformación".

Protocolo general para la transformación

20 Todos los constructos o pBluescript fueron transferidos a *Synechocystis sp.* PCC6803 mediante transformación.

Las células hospederas sufrieron mutagénesis mediante la transformación de vectores de ADN (constructos pSK, pUC o
25 pBluescript) usando la competencia natural de *Synechocystis sp.* PCC 6903 para la captación de ADN en su sistema para recombinación homóloga.

- 39 -

Se hizo girar 10 ml de cultivo exponencialmente creciente de *Synechocystis spec.* A temperatura ambiental (TA) y se removió el sobrenadante. La bolita se volvió a suspender en 0.5-1.0 ml de un medio BG11 y se añadió 1-10 µg de ADN plásmido (constructos pSK que llevan genes etanologénicos y un casete antibiótico para examinar la recombinación homóloga o los constructos nocaout pUC-y pBluescript que llevan el gen de interés y un casete antibiótico para examinar la recombinación homóloga). Las células se incubaron en un agitador de sobremesa durante 5-6 horas en la luz a 28°C. Se colocó en placas 0.2 ml de la mezcla de transformación en un agar BG11. Las placas fueron incubadas a la luz a 28°C durante la noche. Para la selección de los clones mutantes, se pusieron los antibióticos apropiados bajo agar (0.4 ml de kanamicina (1 mg/mL) o 0.4 ml de cloranfenicol (1.4 mg/mL) o 0.2 ml de gentamicina (1 mg/mL), respectivamente). Después de aproximadamente 2 semanas de incubación en la luz a 28°C, se recogieron las colonias y se colocaron en placas conteniendo el antibiótico apropiado. Posteriormente, las concentraciones del antibiótico se incrementaron paso a paso cuando las células se transfirieron en otra placa de agar o en un cultivo líquido (para kanamicina desde inicialmente 5 a 150 µg/ml de BG11, para cloranfenicol desde inicialmente 1 a 15 µg/ml de medio BG11 y para gentamicina desde inicialmente 1 a 5 µg/ml de BG11) para conseguir mutantes (homocigotos) completamente segregados. Se hicieron transferencias cada semana.

- 40 -

Cuando se desarrollaron los mutantes en la concentración antibiótica final, los clones individuales fueron controlados para una completa segregación del gen mutante mediante PCR.

5 **Receta del medio BG11:**

NaNO_3 : 1.5 g

K_2HPO_4 : 0.04 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.075 g

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.036 g

10 Ácido cítrico: 0.006 g

Citrato de amonio férrico: 0.006 g

EDTA (sal disódica): 0.001 g

NaCO_3 : 0.02 g

Mezcla de metal de traza A5 1.0 ml (ver más adelante)

15 Agua destilada: 1.0 L

Mezcla de metal de traza A5:

H_3BO_3 : 2.86 g

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 1.81 g

20 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.222 g

$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.39 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.079 g

$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 49.4 mg

Agua destilada: 1.0 L

25

2. Protocolo General para conjugación

- 41 -

Todos los plásmidos de autoreplicación pVZ fueron transferidos a las células cianobacterianas mediante conjugación.

5 Protocolo:

Cultivo cianobacteriano:

- *Synechocystis* PCC6803 tipo silvestre o cepas de mutante (con el antibiótico apropiado) cultivadas en el medio BG11 hasta OD750nm 0.2-0.8

10 Cultivos *E. coli*:

- inoculación de cultivos durante la noche de cepas *E. coli* XL-1 portadoras del plásmido (pVZ) y *E. coli* J53(RP4) en el medio LB conteniendo los antibióticos apropiados (50µl/ml de ampicilina para J53 y antibiótico para pVZ).

15

- preparación de medios de cultivo en pozo (para cada conjugación se necesita 10 ml de XL-1 (plásmido pVZ) y 10 ml de J53 (RP4)): inocular 0.25 ml de cultivo durante la noche en 9.75 ml LB + antibiótico, desarrollo durante 2.5 horas / 37°C

20 - girar los cultivos de desarrollo en pozos de *E. coli* (10 minutos a 2500 rpm).

- "lavar" /resuspender las células en 1ml de LB sin antibióticos.

- para cada mezcla de conjugación 1 ml de XL-1 resuspendido (pVZ) y 1 ml de J53 (RP4), agitar, remover el sobrenadante y resuspender

25

- bolita en 100 µl del medio LB y se incubó sin agitación 1 hora e 30°C.

- 42 -

- luego se añadió 1.9 ml del cultivo de *Synechocystis*, se agitó ligeramente y se centrifugó.

Se vuelve a suspender la bolita en 30 µl de BG-11 y se
5 vierte en un filtro HATF (membrana nitrocelulósica), el cual se localiza en una placa secada preparada (de 20ml 2x de BG-11 y 20ml 2% de cianoagar y 2ml del medio LB).

Se deja la placa durante 2 días bajo condiciones de luz baja en una cámara de cultivo de ciano a 28°C.

10 Después de la incubación salpicar las bacterias en el filtro con 300µl de BG-11 y colocarlos cuidadosamente en placas en una placa de agar de ciano al 1% con antibiótico (para pVZ).
Después de 10 días (o un poco más) los primeros transconjugantes son visibles.

15

3. Protocolos para la generación de mutantes *Synechocystis* sp. PCC 6803 que sobreexpresan los siguientes genes como primeras estimulaciones metabólicas:

20 **3a) Co-sobreexpresión de tanto la enzima málica como la malato deshidrogenasa y única sobreexpresión de la enzima málica o malato deshidrogenasa**

3b) Co-sobreexpresión de tanto la fosfocetolasa como la
25 **fosforacetiltransacetilasa**

3c) Aldehído deshidrogenasa

3a) Construcción de vectores de ADN para la sobreexpresión de enzima málica y malato deshidrogenasa

3a.1) Construcción de vectores de ADN para la sobreexpresión de enzima málica

La enzima málica 1 que codifica ORF slr0721 (EC 1.1.1.38), Ac. No P72661, tiene la secuencia amino ácida como se muestra en la Figura 4

Para la sobreexpresión de la enzima málica, el gen me de codificación junto con su región terminadora de gen específico fue estimulada mediante PCR usando el siguiente cebador:

Mae-NdeI.fw: 5'-**CATATG**GTTAGCCTCACCCCAAT-3', cebador contiene

un sitio de restricción NdeI para clonación (marcada en negritas)

(SEQ ID NO. 2)

MeLongClaI.rv: 5'-**ATCGAT**CGGGATGGCCTATTTATGG -3', cebador que

contiene un sitio de restricción ClaI para clonación (marcada en negritas)

(SEQ ID NO. 3)

El fragmento PCR fue estimulado mediante ADN polimerasa de alta fidelidad (Phusion™; Finnzimas), adenilado (BIOTAQ™ ADN polimerasa; BIOLINE), clonado en el vector pDrive (Qiagen) y restringido con NdeI/ClaI (Fermentas). Este fragmento fue clonado en el vector pSK9, digerido con NdeI/ClaI. El gen es

- 44 -

incorporado en una región de genoma no codificante de *Synechocystis* sp. PCC 6803 vía la plataforma integrada. La expresión de la enzima está bajo control del promotor dependiente de cobre PpetJ. (La secuencia de nucleótido y la representación esquemática del vector no público pSK9 se dan en las Figuras 4-1A y 4-aB, respectivamente.)

El constructo usado, designado como **pSK9/me-long**, tiene la estructura ilustrada en la Figura 5. La secuencia del inserto del constructo **pSK9/me-long** se muestra en la Figura 6.

3a.2) Construcción del vector de ADN para la sobreexpresión de malato deshidrogenasa

ORF s110891 codifica malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37), Ac. No Q55383 con la secuencia de amino ácido como se ilustra en la Figura 7.

Para la sobreexpresión de malato deshidrogenasa, se generó un constructo que incluye un codón de inicio y el circuito de terminación de gen específico del gen *me* que usa los siguientes cebadores:

Mdh-NdeI.fw: 5'-**CATATGAATATTTTGGAGTATGCTCC**-3, cebador contiene un sitio de restricción NdeI para clonación (marcada en negritas)

(SEQ ID NO. 6)

- 45 -

Mdh-ClaI.rv: 5'-**ATCGATAAGCCCTAACCTCGGTG**-3, cebador que contiene un sitio de restricción ClaI para clonación (marcada en negritas)

(SEQ ID NO. 7)

5

El fragmento PCR fue estimulado mediante ADN polimerasa de alta fidelidad (Phusion™; Finnzimas), adenilado (BIOTAQ™ ADN polimerasa; BIOLINE), clonado en el vector pDrive (Qiagen) y restringido con NdeI/ClaI (Fermentas). Este fragmento fue clonado en el vector pSK9, digerido con NdeI/ClaI. La expresión de la enzima está bajo control del promotor dependiente de cobre PpetJ.

El constructo usado, designado como **pSK9/mdh** tiene la estructura general ilustrada en la Figura 8 y la secuencia del inserto del constructo **pSK9/mdh** se muestra en la Figura 9.

3a.3) Construcción del vector de ADN para la co-sobreexpresión de la enzima málica y el malato deshidrogenasa

20

Este constructo fue generado por co-sobreexpresión de la enzima málica y el malato deshidrogenasa. Estos genes fueron estimulados mediante PCR usando cebadores que incluyen el codón de inicio y parada del gen *me* (fragmento I PCR) y que incluye el sitio de unión de ribosoma (RBS) y el circuito de terminación del gen *mdh* (fragmento II PCR). La co-expresión de las enzimas está bajo el control del promotor dependiente del cobre PpetJ.

- 46 -

Se usaron los siguientes cebadores para estimulación:

- Fragmento I PCR:

Mae-NdeI.fw: 5'-**CATATG**GTAGCCTCACCCCAAT-3', cebador que
contiene un sitio de restricción *NdeI* para clonación (marcado
5 en negritas)
(SEQ ID NO. 9)

MeShortClaI.rv: 5'-**ATCGAT**ACAATTCCCGATTAAGTATTGACC -3' cebador
que contiene un sitio de restricción *ClaI* para clonación
10 (marcado en negritas)
(SEQ ID NO. 10)

- Fragmento II PCR:

MdhRBSClaI.fw: 5'-**ATCGAT**TTTTCTCCACCATCAACACC -3', cebador que
contiene un sitio de restricción *ClaI* para clonación (marcado
15 en negritas)
(SEQ ID NO. 11)

MdhBgIII.rv: 5'-**AGATCT**AAGCCCTAACCTCGGTG -3', cebador que
contiene un sitio de restricción *BglIII* para clonación (marcado
20 en negritas)
(SEQ ID NO. 12)

Los fragmentos PCR fueron estimulados mediante Polimerasa
de ADN de alta fidelidad (Phusion™; Finnzimas), adenilado
25 (BIOTAQ™ ADN polimerasa; BIOLINE), clonado en el vector pDrive
(Qiagen) y restringido con *NdeI/ClaI* y *ClaI/BglIII* (Fermentas),
respectivamente. Estos fragmentos fueron clonados en el vector
pSK9, digeridos primero con *NdeI/ClaI* para la integración de la

- 47 -

enzima málica y en segundo lugar con *ClaI/BglIII* para la integración de la malato deshidrogenasa.

El constructo usado, designado como **pSK9/me-mdh** tiene la estructura ilustrada en la Figura 10. La secuencia del inserto del constructo (**pSK9/me-mdh**) es como se presenta en la Figura 11.

3a.4) Estructura y secuencia del plásmido pSK9

El vector no público pSK9 fue generado en el laboratorio de V.V. Zinchenko (Muscú, Rusia) y se muestra en la Figura 12. La Figura 13 ilustra la secuencia de ácido nucleico del vector.

Usando los plásmidos que codifican las enzimas etanologénicas y los métodos como se describen en la sección 5) "Generación de vectores de auto-replicación (extracromosómicos) para la sobreexpresión inducible de enzimas etanologénicas en las cepas mutantes cianobacterianas", se generaron los siguientes mutantes que comprenden una primera mutación metabólica y como segundas estimulaciones metabólicas enzimas Pdc sobreexpresadas y enzimas SynAdh:

PCC6803 PpetJ-me: *Synechocystis spec.* PCC6803 se transform primero con pSK9/me-long, dando como resultado un mutante completamente segregado PCC6803 PpetJ-me.

PCC6803 PpetJ-me/pVZ325-PpetJ-PDC-synADH: El plásmido de auto-replicación pVZ325-PpetJ-PDC-synADH fue luego introducido en el

- 48 -

mutante PCC6803 PpetJ-me mediante conjugación, creando de este modo una cepa cianobacteriana mutante que hospeda la enzima málica sobreexpresada como una primera estimulación metabólica y una enzima Pdc sobreexpresada y una enzima SynAdh como

5 segundas estimulaciones metabólicas.

PCC6803 PpetJ-mdh: *Synechocystis spec.* PCC6803 se transformó primero con pSK9/mdh, dando como resultado un mutante completamente segregado PCC6803 PpetJ-mdh.

10 **PCC6803 PpetJ-mdh/pVZ325-PpetJ-PDC-synADH:** Plásmido de auto-replicación pVZ325-PpetJ-PDC-synADH fue luego introducido en el mutante PCC6803 PpetJ-mdh mediante conjugación, creando de este modo una cepa mutante cianobacteriana que hospeda una enzima sobreexpresada de malato deshidrogenasa como primera

15 estimulación metabólica y una enzima sobreexpresada Pdc y una enzima SynAdh como segundas estimulaciones metabólicas.

PCC6803 PpetJ-me-mdh: *Synechocystis spec.* PCC6803 se transformó primero con pSK9/me-mdh, dando como resultado un mutante

20 completamente segregado PCC6803 PpetJ-me-mdh.

PCC6803 PpetJ-me-mdh/pVZ321b-PpetJ-PDC-ADHII: El plásmido de auto-replicación pVZ321b-PpetJ-PDC-ADHII fue luego introducido en el mutante PCC6803 PpetJ-me-mdh mediante conjugación, creando de este modo una cepa cianobacteriana mutante que

25 hospeda una enzima málica sobreexpresada y malato deshidrogenasa como primeras estimulaciones metabólicas y una enzima sobreexpresada Pdc y una enzima SynAdh como segundas estimulaciones metabólicas.

PCC6803 pVZ321b-PpetJ-PDC-ADHII y PCC6803 pVZ325-PpetJ-PDC-**synADH:** Los plásmidos de auto-replicación pVZ321b-PpetJ-PDC-

ADHII o pVZ325-PpetJ-PDC-synADH, respectivamente, se

5 introdujeron en *Synechocystis* spec. PCC6803 de tipo natural
mediante conjugación, creando de esta manera una cepa
cianobacteriana mutante que hospeda una enzima sobreexpresada
Pdc y una enzima AdhII o SynAdh como segundas estimulaciones
metabólicas, pero carentes de la primera estimulación
10 metabólica.

3b) Generación de un mutante *Synechocystis* PCC6803 que**sobreexpresa la fosfocetolasa y fosfoacetiltransacetilasa como
primeras estimulaciones metabólicas**

15

Un vector de ADN para co-sobreexpresión de fosfocetolasa y
fosfoacetiltransacetilasa se construyó de la siguiente manera:

La Figura 14 muestra la secuencia de amino ácido de ORF
20 slr0453 que codifica la probable fosfocetolasa (phk), (EC
4.1.2.-), Ac. No P74690. El ORF slr2132 codifica una
fosfoacetiltransacetilasa (pta), EC 2.3.1.8, Ac No. P73662, que
tiene la secuencia amino ácido ilustrada en la Figura 15.

25 Los genes de fosfocetolasa y fosfoacetiltransacetilasa
fueron estimulados mediante PCR usando los siguientes
cebadores:

fosfocetolasa (phk)

55

- 50 -

#phk1 5'-GTGTCT**CATATG**TTACATCCCCCTTTCCCTT-3' (sitio NdeI insertado)

(SEQ ID NO. 17)

#phk-BglIII-rev 5'-GGTCAC**AGATCT**GTTGTCCCCCATGGCCTAGCTA-3'

5 (SEQ ID NO. 18)

fosfoacetyltransacetilasa (pta)

#pta-BglIII-fw 5'-CCTTGC**AGATCT**GGATACGTTGAGGTTATTTAAATTATGA-3'

(SEQ ID NO. 19)

10

#pta_pPETJ2-XhoI 5'-CGGTTG**CTCGAG**CATCTGGAACGGTTGGGTAAAT-3'

(SEQ ID NO. 20)

15 Todos los cebadores contienen sitios de restricción para clonación (marcados en negritas).

Los fragmentos PCR fueron cortados con las apropiadas enzimas de restricción y se ligaron corriente abajo del promotor PpetJ en pIC-PpetJ de la siguiente manera:

20 5'-XhoI-pIC-**PpetJ**-NdeI-3'

5'-NdeI-**phk**-BglIII-3'

5'-BglIII-**pta**-XhoI-3'

25 Todo el fragmento PpetJ-phk-pta fue cortado del plásmido de clonación pIC20H con SmaI/NruI y ligado en el sitio SmaI del vector transportador E. coli-Synechocystis pVZ322 (plásmido de auto-replicación).

- 51 -

El constructo denominado pVZ322-PpetJ-phk-pta, tiene la estructura mostrada en la Figura 16 y la secuencia de ácido nucleico del inserto de **pVZ322-PpetJ-phk-pta** es como se presenta en la Figura 17.

5

El plásmido pVZ322-PpetJ-phk-pta fue transferido en *Synechocystis* PCC6803 mediante conjugación como se describió. La confirmación del mutante resultante, PCC6803 pVZ-PpetJ-phk-pta, se realizó mediante PCR.

10

3c) Generación de un mutante *Synechocystis* PCC6803 que sobreexpresa el aldehído deshidrogenasa como una primera estimulación metabólica

Un vector de ADN para sobreexpresión de aldehído deshidrogenasa se construyó de la siguiente manera: La secuencia de amino ácido de ORF slr0091 que codifica un aldehído deshidrogenasa (aldh), EC 1.2.1.3, Ac No. BAA10564 Q55811 se muestra en la Figura 18.

Un constructo fue generado para sobreexpresión de aldehído deshidrogenasa bajo control del promotor inducible PpetJ. El constructo incluye el promotor petJ, el fragmento de aldehído deshidrogenasa 1369 bp que contiene toda la secuencia de codificación desde ORF slr0091 y 205 bp corriente abajo del gen (región terminadora). El gen de aldehído deshidrogenasa (aldh) fue estimulado mediante PCR usando el siguiente cebador:

#aldh1-NdeI-fw 5'-GTGCCT**CATATGA**AATACTGCTAAACTGTTGTTGC-3'

(SEQ ID NO. 23)

5x

- 52 -

#aldh2-XhoI-rev 5'-GATCTC**CTCGAGG**TAAAGAATCAGCATAGGTCTGG-3'

(SEQ ID NO. 24)

Los cebadores contienen un sitio de restricción NdeI o un
5 sitio de restricción XhoI, respectivamente, para clonación
(marcado en negritas).

El fragmento PCR fue digerido con NdeI/XhoI y ligado
corriente abajo del promotor PpetJ en pIC-PpetJ. Todo el
10 fragmento de PpetJ-aldehído deshidrogenasa fue cortado de este
plásmido con PstI/XhoI y ligado en el vector transportador E.
coli-Synechocystis pVZ322 (plásmido de auto-replicación).

El constructo usado, denominado pVZ322-PpetJ-aldh, tiene
15 la estructura como se ilustra en la Figura 19. La secuencia
del inserto del constructo **pVZ322-PpetJ-aldh** se presenta en la
Figura 20.

El plásmido pVZ322-PpetJ-aldh fue transferido en
20 *Synechocystis* PCC6803 mediante conjugación como se describió.
La confirmación del mutante resultante, PCC6803 pVZ-PpetJ-aldh,
se realizó mediante PCR

4) Los protocolos para generación de *Synechocystis* sp. PCC 6803
25 **Δ ack/ Δ pta/ Aldh** mutante nocaout triple que afecta la lactato
deshidrogenasa (ldh), la acetato quinasa (ack) y fosfo-
acetiltransacetilasa (pta) como primeras estimulaciones
metabólicas

- 53 -

A continuación se describe la construcción de vectores de ADN para la generación del mutante nocaout triple Δ ack/ Δ pta/ Δ ldh:

5 **4a) Construcción del vector de ADN para la generación de un mutante de acetato quinasa**

El ORF sll1299 codifica un acetato quinasa putativo (EC 2.7.2.1), Ac No. P73162, con la secuencia de amino ácido como
10 se muestra en la Figura 21.

Un fragmento 2316 bp que contiene toda la secuencia codificadora de acetato quinasa (sll1299) fue estimulada mediante PCR usando el siguiente cebador:

15 #ack-1 fw: 5'-CCGGGACGTGACAGAACGGGTGG -3'
(SEQ ID NO. 27)

#ack-2 rv: 5'-GCGTTGGCGATCGCCGTCCTAG-3'
(SEQ ID NO. 28)

20

El fragmento PCR fue digerido con SpeI y se clonó en el vector pBluescript SK+. El vector de clonación pBluescript II® SK+ (Ac. No X52328) provenía de Stratagene, La Jolla, CA, USA. El casete de resistencia de kanamicina se usó desde el vector
25 de ADN pUC4K (Ac. No X06404) y se ligó en los sitios de restricción HpaI de slr1299.

- 54 -

La Figura 22 ilustra la estructura del constructo nocaute, denominado pBlue-ack-Km y la secuencia de ácido nucleico del inserto del constructo pBlue-ack-Km se muestra en la Figura 23.

5 **4b) Construcción de un vector de ADN para la generación de un mutante de fosfoacetiltransacetilasa (fosfoaciltransferasa)**

El ORF slr2132 codifica una fosfoacetiltransacetilasa (EC 2.3.1.8), Ac No. P73662 que tiene la secuencia de amino ácido
10 como se muestra en la Figura 24.

Un fragmento 2869 bp que contiene toda la secuencia de codificación de fosfoacetiltransacetilasa (slr2132) fue estimulada mediante PCR usando el siguiente cebador:

15 #pta-1fw: 5'- GCCATTGTGGGGGTGGGTCAG -3'
(SEQ ID NO. 31)
#pta-2rv: 5'- CAGTTTATGCCCCGCTACCGGG -3',
(SEQ ID NO. 32)

El fragmento de PCR fue digerido con MfeI/ HindIII y se
20 clonó en los sitios EcoRI/HindIII del vector de clonación pUC19 (Ac. No M77789). El casete de Resistencia al cloranfenicol fue usado a partir del plásmido pACYC184 (Ac. No X06403) y se ligó en los sitios de restricción ClaI/PstI de slr2132.

25 El constructo nocaute pUC-pta-Cm tiene la estructura ilustrada en la Figura 25 y la secuencia del inserto del plásmido pUC-pta-Cm se presenta en la Figura 26.

- 55 -

4c) Construcción de vectores de ADN para la generación de un mutante de lactato deshidrogenasa

El ORF slr 1556 codifica una lactato deshidrogenasa putativa (EC 1.1.1.28), anotada como homólogo 2-hidroxiaciddeshidrogenasa (P74586) con la secuencia de amino ácido mostrada en la Figura 27.

Un fragmento 1931 bp que contiene toda la secuencia de codificación a partir de lactato deshidrogenasa (slr1556) fue estimulado mediante PCR usando los siguientes cebadores:

#ldh-1fw: 5'-GCGAACTACCCAACGCTGACCGG-3'

(SEQ ID NO. 35)

#ldh-2rv: 5'-GCATCAAGTGTTGGGG**GATATC**CCTG-3',

(SEQ ID NO. 36) que contiene un sitio de restricción EcoRV para la clonación (marcado en negritas).

El fragmento de PCR fue digerido con NheI/ EcoRV y clonado en el vector pBluescript SK+ usando XbaI/ EcoRV. Un casete de Resistencia a la kanamicina fue cortado del vector pUC4K con BamHI y ligaron en los sitios de restricción BglII/BclI de slr1556, dando como resultado un plásmido pBlue-ldh-Kan (ver Figura 28).

Se usó el plásmido pBlue-ldh-Kan para la construcción de un vector alternativo y nocaout de lactato deshidrogenasa, en el que el casete de resistencia a la kanamicina fue sustituido por un casete de resistencia a la gentamicina. El casete Gm fue

- 56 -

cortado del plásmido pSK-PisiA-PDC-synADH (mostrado en la Figura 29) mediante PstI y SmaI (fragmento 1135bp) y se ligó en los sitios PstI y HpaI de pBlue-ldh-Kan.

5 El constructo nocaout pBlue-ldh-Gm tiene la estructura como se muestra en la Figura 30 y la secuencia del inserto de pBlue-ldh-Gm se ilustra en la Figura 31.

4d) Generación de mutante nocaout triple Δ ack/ Δ pta/ Δ ldh

mediante la transformación de los vectores de ADN (constructos
10 nocaout) usando la competencia natural de *Synechocystis spec.* PCC 6803 para la captación de ADN y sus sistema para recombinante homólogo.

La generación de un mutante triple nocaout Δ ack/ Δ pta/ Δ ldh
15 se realiza en tres etapas. El mutante nocaout se hizo en tres etapas. En una primera transformación con el constructo pBlue-ack-Kan el gen sll1299 que codifica el acetato quinasa putativa se hizo deficiente en el estado natural de *Synechocystis*, y se seleccionan el correspondiente mutante Δ ack. En un segundo
20 aspecto, el gen slr2132 que codifica una fosfoacetiltransacetilasa se hizo deficiente del mutante Δ ack mediante transformación con el constructo pUC-pta-Cm y se seleccionaron mutantes dobles Δ ack/ Δ pta. Finalmente un mutante doble Δ ack/ Δ pta se transforma con el constructo pBlue-ldh-Gm
25 para generar el mutante triple nocaout Δ ack/ Δ pta/ Δ ldh. Las transformaciones se realizaron como se describe anteriormente en el "Protocolo General para la transformación".

Cuando los mutantes se desarrollaron en la concentración final antibiótica, los clones individuales fueron controlados para una completa segregación del gen mutante mediante PCR. En el mutante $\Delta ack/\Delta pta/\Delta ldh$ no se pudo haber detectado genes wt ya sea *ack*, *pta* o *ldh*.

5) Generación de los vectores de auto-replicación (extracromosómica) para la sobreexpresión inducible de enzimas de etanologénicas en cepas mutantes cianobacterianas como segundas estimulaciones metabólicas

La construcción de ciertos vectores que incluyen el promotor *petJ* se realizó usando el siguiente protocolo general:

- EcoRI/BamHI restricción del vector transportador pCB4-LR(TF)*pa* para cortar los genes *pdh* y *adh*. Este vector transportador fue construido por el Dr. John Coleman, University of Toronto, Toronto, Canadá.
- ligación de *pdh/adh* que contiene el fragmento EcoRI/BamHI en el vector de clonación pDrive (EcoRI/BamHI). El vector pDrive (Qiagen, Hilden, Alemania, GenBank no.: DQ996013) ya fue descrito anteriormente.
- estimulación del promotor *petJ* usando ADN cromosómico de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y los siguientes cebadores (secuencia de promotor estimulado incluye el sitio de unión de ribosoma del gen *petJ*):

petJ-fw-SalI 5'-GTCGACGGGAATTGCTCTGGCAAC-3'

- 58 -

(SEQ ID NO. 38)

petJ-rev-EcoRI 5'-GAATTCATTAGTTCTCCTTTCAAGG-3'

(SEQ ID NO. 39)

5 El cebador de avance incluyó el sitio de restricción SalI y el cebador de retroceso incluyó un sitio de restricción EcoRI para la clonación.

- ligación del fragmento del promotor SalI/EcoRI corte petJ en pDrive-pdc/adh (SalI/EcoRI) generando el constructo pDrive-PpetJ-pdc/adh
- SalI/PstI restricción de pDrive-PpetJ-pdc/adh y ligación de las correspondientes fusiones del promotor pdc/adh en el vector pVZ321b (SalI/PstI) de amplio hospedaje y de auto-replicación, un derivado de pVZ321 (construido por V.V. Zinchenko Moscú, Rusia; anteriormente descrito) con una casete/cartucho de resistencia adicional a la estreptomicina introducido en el sitio XbaI de pVZ321.

20 pVZ321 Gen Bank no.: AF100176 disponible en la base de datos NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=4323382>)

- producto final del procedimiento de clonación es el vector pVZ pVZ321b-PpetJ-pdc/adh (mapa del plásmido y secuencias ver Figura 32)

Observaciones: En todas las siguientes secuencias nt de los sitios de restricción genética (marcados en amarillo o azul) para clonación así como inicios de traslación (codones de inicio, marcados de verde) y terminaciones de traslación (codones de terminación, marcadas de rojo) están codificadas de color.

Las secuencias de nucleótido y amino ácido de genes adhII y genes pdc de *Zymomonas mobilis* (vector transportador fuente pCB4-LR(TF)pa [John Coleman]; completamente secuenciado por Allen Place a pedido de Algenol Inc. Y mostrado en la Figura 33). Los sitios de restricción en los genes que codifican AdhII y Pdc se muestran en la Figura 34.

Las secuencias de amino ácido de la proteína *Zymomonas mobilis* ZmPdc y la proteína *Zymomonas mobilis* ZmAdhII se ilustran en las Figuras 35 y 36, respectivamente.

La secuencia de ácido nucleico del promotor petJ (*Synechocystis* sp. PCC6803) se muestra en la Figura 37 (gen petJ: sll1796 (que codifica para citocromo c553); expresión inducida bajo extrabasación de cobre).

Referencia:

J Biol Chem. 2004 Feb 20;279(8):7229-33. Epub 2003 Dec 5.

El funcionamiento eficiente de la fotosíntesis y la respiración en *Synechocystis* sp. PCC 6803 requiere estrictamente la presencia de tanto citocromo c6 como plastocianina.

Durán RV, Hervás M, De La Rosa MA, Navarro JA.

- 60 -

El vector pVZ321b (derivado de pVZ321) fue construido por Anne Karradt, Humboldt-University Berlin, Plant Biochemistry Department (Prof. Lockau), Berlin y tiene la secuencia de ácido nucleico como se ilustra en la Figura 38 y a estructura como muestra en el mapa del plásmido de la Figura 39.

Introducción de Adh desde *Synechocystis* sp. PCC 6803 (SynADH)

Para crear un constructo de expresión como se describe anteriormente pero con un diferente alcohol deshidrogenasa, la secuencia que codifica *adh* fue cortada por la digestión SacI/PstI del correspondiente constructo pVZ321b-PpetJ-*pdh*/*adh*. El gen *adh* de *Synechocystis* que contiene los sitios de restricción SacI/PstI que fueron introducidos por el cebador usado (ver más adelante) fue ligado al constructo pVZ "libre de *adh*" (SacI/PstI) dando como resultado un derivado que expresa el ZmPdc junto con SynAdh bajo el control del promotor *petJ* (mostrado en la Figura 40).

20 SynADH-SacI-fw 5'-ATGAGCTCTCTGGATAAACTAATAAAC-3'
(SEQ ID NO. 45)

SynADH-PstI-rev 5'-ATCTGCAGATCGAATGTCAAGCTTTCC-3'
(SEQ ID NO. 46)

25 El gen *adh* (*slr1192*) del alcohol deshidrogenasa SynAdh (alcohol deshidrogenasa dependiente de Zn) a partir de *Synechocystis* sp. PCC 6803 se ilustra en la Figura 41 y la

- 61 -

correspondiente secuencia de amino ácido Syn Adh se muestra en la Figura 42.

Generación de pVZ325 (introducción del casete de resistencia Gm dentro de pVZ321b)

Para los constructos pVZ321b etanologénicos anteriormente descritos, que median la resistencia a la Estreptomicina (St) así como la Kanamicina (Km), se creó un derivado en el que la resistencia a la Km fue reemplazada por la introducción del casete de resistencia a la Gentamicina (Gm).

El casete de resistencia a la Gm a partir de pVZ322 (V. Zinchenko) fue estimulado mediante PCR usando el siguiente par de cebadores:

Gm-ClaI-fw 5'-ATCGATGCTCGAATTGACATAAGC-3'

(SEQ ID NO. 48)

Gm-XhoI-rev 5'-ACTCGAGACCGAGCTCGAATTGGC-3'

(SEQ ID NO. 49)

El producto PCR resultante fue ligado en el vector de clonación pJET1.2/despuntado (Fermentas). El casete de resistencia Gm fue cortado a partir de pJET-Gm usando los sitios de restricción ClaI y XhoI (introducidos por el cebador de avance y retroceso, respectivamente) y se ligó en el pVZ321b-PpetJ-PDC-SynADH (ClaI/XhoI). Nota: El sitio de restricción ClaI dentro de la secuencia que codifica PDC es metilado mediante el sistema Dam-metilasa de *E. coli* y por lo tanto no es escindible mediante la endonucleasa de restricción ClaI.

- 62 -

Debido a la introducción del casete de Resistencia Gm dentro de pVZ321b la resistencia a la Km es inactivada pero el derivado resultante pVZ (pVZ325) confiere ahora una resistencia contra la Gm así como contra la Estreptomicina al receptor (ver la

5 Figura 43).

6. Caracterización de las cepas mutantes que hospedan por lo menos una primera estimulación metabólica respecto a los niveles de piruvato y caracterización de las cepas mutantes que

10 **contienen adicionalmente segundas estimulaciones metabólicas respecto a la velocidad de producción de etanol**

Las cepas mutantes metabólicas que tienen una primera estimulación metabólica fueron caracterizadas con respecto a

15 sus propiedades de desarrollo y el piruvato de metabolito extracelular en comparación con las cepas de tipo natural.

Las cepas mutantes metabólicas que tienen una primera estimulación metabólica y además transformadas con la enzima

20 Pdc y Adh como una segunda estimulación metabólica fueron caracterizadas respecto a las propiedades de desarrollo y las velocidad de producción de etanol en comparación con la(s) apropiada(s) cepa(s) de referencia que expresan la enzima Pdc y Adh, pero carentes de mutación metabólica (primera estimulación

25 metabólica).

6.1 Cultivación de cepas cianobacterianas de tipo natural y mutante

- 63 -

Las cepas de tipo natural y mutantes de *Synechocystis* PCC 6803 fueron desarrolladas como cultivos por lotes en el medio BG11 a 27-28°C. Para el cultivo de mutantes, se añadió

5 antibióticos apropiados al medio (kanamicina 75 mg/l; cloranfenicol 10 mg/l; gentamicina 3 mg/l estreptomicina 10 mg/l). Para evitar una inducción prematura de la expresión genética en mutantes que tienen constructos con el promotor PpetJ, estos mutantes fueron desarrollados en un medio de

10 cultivo suplementado con cobre en exceso (5 x Cu). Antes de los experimentos de caracterización, se desarrollaron dos rondas de precultivos en el medio BG11 (no hubo exceso de Cu), aireado con 0,5% CO₂ en aire y se agitó con una barra de agitación magnética (150 rpm). En cada ronda, el precultivo se

15 inició en un OD₇₅₀ de 0.5 y se desarrolló hasta un OD₇₅₀ de 2.0.

Para los experimentos de caracterización, se desarrollaron cepas de tipo natural y mutantes en el medio BG11. Los mutantes que tienen constructos con PpetJ (sobreexpresión o

20 mutantes que expresan las enzimas Pdc y Adh) fueron transferidos a BG11 carente de Cu para inducir la expresión genética. El volumen de cultivo total fue 300 mL en un frasco de Schott de 500 mL; el OD₇₅₀ inicial fue 1.0. Los cultivos fueron aireados con 0,5% de CO₂ en aire y se agitó con una

25 barra de agitación magnética (150 rpm).

Todos los mutantes fueron caracterizados bajo condiciones de luz constante (75 - 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). La longitud de la trayectoria de luz a través del cultivo para un cultivo de 300

- 64 -

mL en un frasco de Schott de 500 mL fue 7.5 cm (diámetro del recipiente; la iluminación se realizó desde un lado). En cultivos de desarrollo rápidos, la intensidad de luz fue incrementada durante el experimento de desarrollo (75 - 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ hasta OD4; luego 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

6.2 Caracterización de las propiedades de desarrollo

Para los experimentos de caracterización, los mutantes metabólicos y las cepas de referencia apropiadas se cultivaron como se describió. Se continuó con el desarrollo durante aproximadamente 14 días midiendo la densidad óptica (diariamente) y la concentración de clorofila (cada dos días). La producción fotosintética de O_2 se determinó varias veces durante la fase de desarrollo exponencial usando un electrodo Clark de la siguiente manera:

6.3 Medición de la evolución de oxígeno fotosintético y la velocidad de producción de etanol (experimento a corto plazo)

20

Las células se lavaron 2x con un medio de desarrollo fresco mediante centrifugación (3000 x g, 10 minutos, temperatura ambiental) y se volvieron a suspender. Las células se volvieron a suspender finalmente en un medio de cultivo a una concentración de clorofila de 10 a 15 μg de clorofila/mL. La clorofila se midió como lo describió N. Tandeau De Marsac y J. Houmard en: Methods in Enzymology, Vol. 169, 318-328. L. Packer, ed., Academic Press, 1988. Las células son llenadas en

- 65 -

la cámara de un electrodo de oxígeno de los hermanos Rank (Modelo Digital 10, Rank Brothers, Cambridge, Inglaterra) y se añadió bicarbonato de sodio a la concentración final de 25 mM. El espesor del cultivo tuvo 1 cm de modo que la longitud de la trayectoria de luz viajando a través de los cultivos era además 1 cm. y la velocidad de la evolución de oxígeno fotosintético se midió por ejemplo con un registrador gráfico REC 112, Amersham Pharmacia Biotech conectado con el electrodo. La cámara del electrodo de oxígeno se mantiene a una temperatura constante (28°C en la mayoría de los casos) con un baño de agua circulante y de temperatura controlada (RM6, Lauda Brinkmann). La cámara es translúcida e iluminada desde fuera. La luz de excitación para los experimentos fotosintéticos es proporcionada por un proyector de diapositivas con una lámpara de 150-watt (Osram, Xenophot HLX Alemania). Para mediciones bajo condiciones estándar la intensidad de luz fue regulada a $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Se determinaron las intensidades de luz en el electrodo de oxígeno y la distancia entre la fuente de luz y la cámara de electrodo de oxígeno se regularon consecuentemente. Cuando se encendió la iluminación, se inicia la fotosíntesis y se puede observar un aumento de la concentración de oxígeno en la cámara. Después de un corto periodo la curva trazada es lineal. Desde la parte lineal de la curva trazada se determine la velocidad (= evolución de oxígeno fotosintético vs. el tiempo). Toda la medición de oxígeno se acabó después de no más de 10 minutos. Después de completar esta medición, la iluminación de la muestra en la cámara continuó bajo condiciones invariables. Durante un periodo de una hora, las

- 66 -

muestras de 0.15 ml fueron tomadas en intervalos definidos (en la mayoría de los casos cada 10 minutos). Inmediatamente después de la remoción las muestras fueron centrifugadas (14,000 x g, 10 min, 4°C) y el sobrenadante se almacenó en 5 hielo. Después de completar la toma de muestras, la concentración de etanol en los sobrenadantes se midió como se describe aquí. La concentración de etanol versus el tiempo fue trazada. Usando la ecuación lineal, se calculó el aumento del contenido de etanol en v/v en el ensayo por hora. La velocidad 10 de la producción de etanol se da usualmente en la dimensión de $\mu\text{mol de etanol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg de clorofila}^{-1}$, luego se usa el contenido de clorofila medido en comienzo del experimento.

Para la calibración del electrodo, se midió la diferencia 15 de señal del agua saturada de aire (saturación al 100%) y el agua sin oxígeno (punto cero). Se obtuvo agua sin oxígeno añadiendo ditionito sódico (aproximadamente 1 mg/ml). La estimulación medida es equiparada con la solubilidad del oxígeno en agua a 28°C y una presión de 1013.5 hPa (7.75 mg 20 oxígeno/L).

6.4 Determinación de la producción de etanol

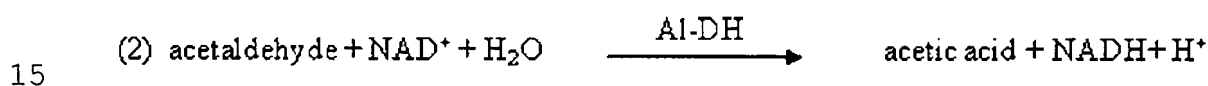
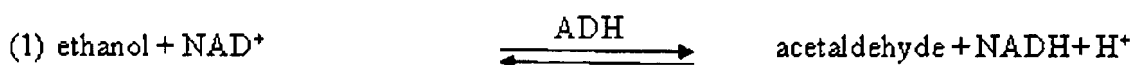
Para la caracterización de los mutantes que expresan PDC y 25 ADH, se midió el etanol diariamente durante el experimento de desarrollo de acuerdo con el método enzimático óptico anteriormente descrito (kit de prueba "Ethanol UV method" de Boehringer Mannheim / R-Biopharm, Darmstadt, Alemania). La

- 67 -

producción de etanol de los mutantes metabólicos que expresan PDC y ADH se compare con la cepa apropiada de referencia que expresa PDC y ADH como una segunda estimulación metabólica, pero carente de la respectiva mutación metabólica, la primera
5 estimulación metabólica.

Principio de la cuantificación de etanol:

El etanol se oxide mediante nicotinamida-adenina
10 dinucleótido (NAD^+) a acetaldehído en una reacción, la cual se cataliza mediante la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (reacción 1). El acetaldehído, que se forma en la reacción, es cuantitativamente oxidado a ácido acético mediante la enzima aldehído deshidrogenasa (Al-DH) (reacción 2).



- ethanol = etanol
- acetaldehyde = acetaldehído
- acetic acid = ácido acético

20 En las reacciones (1) y (2) se formó dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido (NADH). La cantidad de NADH formado es proporcional a la cantidad de etanol en la muestra. El NADH es fácilmente cuantificado por medio de su absorbancia de luz. La absorbancia es usualmente medida a 340 nm, Hg 365
25 nm o Hg 334 nm.

Procedimiento:

Preparación de soluciones: Solución 1: 1.3 mg/ml de NAD y 0.27 U de aldehído deshidrogenasa en un tampón de difosfato de potasio, pH 9.0. Solución 2: Suspensión de alcohol deshidrogenasa (ADH) con aproximadamente 4000 U/ml.

Alternativamente, se pueden usar los productos químicos y las soluciones del kit de determinación de etanol de Boehringer Mannheim/R-Biopharm (Cat. No. 10 176 290 035).

La muestra y la solución 1 se mezclan en una proporción de 3 ml de solución 1 y 0.1 ml de muestra (de ser necesario la muestra se diluye con agua). Después de aproximadamente 3 minutos, se mide la absorbancia (A_1). Luego se inicia la reacción mediante la adición de una suspensión de ADH (solución 2, 0.050 ml para 3 ml de solución 1 y 0.1 ml de muestra). Después de completar la reacción (aproximadamente 5 a 10 minutos) se midió la absorbancia nuevamente (A_2). Las mediciones de absorción pueden realizarse usando un fotómetro o un lector de microplacas. Para las mediciones del lector de placas todos los volúmenes se miden en escala descendente.

De la diferencia de absorbancia medida $\Delta A = (A_2 - A_1)$ la concentración de etanol en la muestra se calculó con la ecuación:

$$c = \frac{V \times MG}{\epsilon \times d \times v \times 2 \times 1000} \times \Delta A$$

c, concentración de etanol [g/L]; V, volume total [mL]; MG, peso molecular del etanol (46.07 g/mol); e, coeficiente de

Prueba

extinción ($6.3 \text{ L} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ en 340 nm); d, trayectoria de la luz [cm]; v, volumen de la muestra [mL]

Literatura:

5

Protocolo del kit Etanol, método UV para la determinación de etanol en alimentos y otros materiales, Cat. No. 10176290035, R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania.

- 10 H.-O. Beutler (1984) en: Methods in Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U. ed.) 3rd ed. Vol. VI, pp. 598-606, Verlag Chemie, Weinheim, Alemania.

6.5 Determinación del piruvato extracelular

15

El contenido extracelular de piruvato se midió en 3 oportunidades durante un periodo de cultivo de 14 días (usualmente en el día 5, 9, 14) usando una prueba enzimática óptica de Häusler et al. (2000), Anal. Biochem, 281:1-8.

- 20 Este método permite la cuantificación de piruvato y fosfoenolpiruvato en una prueba.

Protocolo:

- 25 Las cuantificaciones se basan en la reducción del piruvato a lactato mediante lactato deshidrogenasa (LDH) a costa de NADH que se oxida a NAD⁺. En la primera etapa, se examine el piruvato. Después de completar esta reacción, se añadió piruvato quinasa. El piruvato quinasa convierte el

- 70 -

fosfoenolpiruvato en piruvato y permite la determinación del fosfoenolpiruvato.

A 450 μ l de la mezcla madre (9 μ l 20 mM de NADH, 12 μ l 1 M de $MgCl_2$, 46 μ l 1 M de KCl, 12 μ l 100 mM de ADP, 360 μ l 100 mM de HEPES, 10 μ l de H_2O) se añadió 520 μ l de la muestra (de ser necesario diluida con H_2O). Dos μ l de LDH se añadió para iniciar la reacción. La oxidación de NADH se observe como disminución de la absorbancia en 340 nm. Cualquier diferencia de las absorbancias en 340 nm menos 380 nm se mide mediante una espectroscopia de diferencia (muestras turbias o de color; $\epsilon_{340-380} = 4.83 \text{ l x cm x mmol}^{-1}$) o la absorbancia en 340 nm se mide frente al agua ($\epsilon_{340} = 6.28 \text{ l x cm x mmol}^{-1}$). Después de una reacción completa de piruvato, se añadió 2 μ l de piruvato quinasa al ensayo. La oxidación de NADH se midió como se mencionó anteriormente. De las diferencias de las absorbancias al inicio y al final de las reacciones, se calculó la cantidad de NADH oxidado (= cantidad de piruvato, y fosfoenolpiruvato, respectivamente).

Productos químicos y soluciones:

1. Suspensión de lactato deshidrogenasa de corazón de bovino (L-LDH, Sigma L2625-2.5KU, suspensión con 5629.5 U/ml), diluida 1:10
2. Piruvato quinasa de músculo de conejo (PK, Serva 34085, suspensión con 4000 U/ml), diluida 1:20
3. 100 mM de HEPES/NaOH (pH 7.5)

- 71 -

4. 1 M de MgCl₂
5. 100 mM de ADP
6. NADH (Sigma, N6005) 20 mM en H₂O
7. 1 M de KCl

5

6.6 Caracterización de mutantes metabólicos que sobreexpresan tanto la enzima málica como el malato deshidrogenasa o sobreexpresan ya sea la enzima málica o el malato deshidrogenasa

10

Los mutantes PCC6803 PpetJ-me, PpetJ-mdh y PpetJ-me/mdh se examinaron en comparación con la cepa *Synechocystis* de tipo natural bajo condiciones de luz constante como se describió. La expresión de los genes me y mdh fue inducida mediante extrabasación de cobre.

15

RESULTADOS:

No se pudieron detectar diferencias significativas en el desarrollo celular, el contenido de clorofila y la producción de oxígeno fotosintético entre *Synechocystis* PCC6803 de tipo natural y los mutantes PCC6803 PpetJ-me, PpetJ-mdh y PpetJ-me/mdh, respectivamente.

20

Se detectó un nivel potenciado de piruvato extracelular en el medio de todos los tres mutantes después de la inducción de la expresión genética mediante extrabasación de cobre. La siguiente tabla muestra las concentraciones extracelulares de piruvato medidas 7 y 14 días después de la inducción en comparación con el tipo natural.

25

	7 días		14 días	
	OD ₇₅₀	piruvato [mM]	OD ₇₅₀	piruvato [mM]
PCC6803 Wt	5.5	0.002	8.9	0.004
PpetJ-me	4.3	0.005	8.8	0.032
PpetJ-mdh	5.0	0.006	9.1	0.030
PpetJ-me-mdh	5.2	0.009	8.3	0.061

5 Los mayores niveles de piruvato extracelular medidos en
los mutantes inducidos PCC6803 PpetJ-me, PpetJ-mdh y PpetJ-
me/mdh (comparado con el tipo natural) sugieren que la
sobreexpresión de la enzima málica o el malato deshidrogenasa
conlleva a un mayor nivel de piruvato dentro de las células
10 cianobacterianas.

Los mutantes PCC6803 PpetJ-me/pVZ325-PpetJ-PDC-synADH,
PCC6803 PpetJ-mdh/pVZ325-PpetJ-PDC-synADH y PCC6803 PpetJ-
me/mdh/pVZ321b-PpetJ-PDC-ADHII que expresan genes
15 metanologénicos fueron examinados respecto a sus propiedades de
desarrollo y velocidades de producción de etanol en comparación
con las cepas de referencia PCC6803 pVZ325-PpetJ-PDC-synADH y
PCC6803 pVZ321b-PpetJ-PDC-ADHII. La expresión de los genes de
me, mdh y los etanologénicos fue inducida por extrabasación de
20 cobre. Las condiciones de cultivo bajo luz constante fueron
como las descritas.

RESULTADOS

Los mutantes PCC6803 que expresan los genes me, mdh o
ambos presentaron velocidades de producción de etanol
significativamente mayores comparado con las cepas de
5 referencia.

La siguiente tabla muestra la velocidad de producción de etanol
respecto al desarrollo celular (dada como la pendiente de
producción de etanol [%] por OD_{750nm} y día.

	Velocidad de producción de EtOH [% / OD _{750nm} *d]
PCC6803 pVZ325-PpetJ-PDC-synADH	0.0014
PCC6803 PpetJ-me pVZ325-PpetJ-PDC-synADH	0.0024
	Velocidad de producción de EtOH [% / OD _{750nm} *d]
PCC6803 pVZ321b-PpetJ-PDC-ADHII	0.0016
PCC6803 PpetJ-me-mdh pVZ321b-PpetJ-PDC-ADHII	0.0025

En dos días consecutivos durante la fase de desarrollo

10 logarítmico, se midió la capacidad fotosintética y la
producción de etanol en el electrodo de oxígeno como se
describió.

En estas mediciones de tiempo corto se midió la actividad
fotosintética bajo condiciones optimizadas (saturación de luz y
15 suministro de carbono). Los resultados representan la

capacidad fotosintética máxima de las células antes que la verdadera actividad fotosintética durante el cultivo.
Los valores son la media de dos mediciones consecutivas.

	Capacidad PS [μmol O ₂ / mg Chl* h]	Producción de EtOH [μmol EtOH / mg Chl* h]	μmol EtOH / μmol O ₂
PCC6803 pVZ325-PpetJ-PDC-synADH	141	3.6	0.025
PCC6803 PpetJ-me pVZ325-PpetJ-PDC-synADH	115	5.0	0.043
PCC6803 PpetHJ-mdh pVZ325-PpetJ-PDC-synADH	97	3.4	0.035

5

	Capacidades PS [μmol O ₂ / mg Chl* h]	Producción de EtOH [μmol EtOH / mg Chl* h]	μmol EtOH / μmol O ₂
PCC6803 pVZ321b-PpetJ-PDC-ADHII	109	2.1	0.019
PCC6803 PpetJ-me-mdh pVZ321b-PpetJ-PDC-ADHII	103	3.1	0.030

Estos resultados muestran claramente que aumentando la actividad enzimática de ya sea la enzima málica o el malato deshidrogenasa mediante sobreexpresión o co-sobreexpresión de

10

- 75 -

ambas enzimas (primeras estimulaciones metabólicas), la velocidad de producción de etanol de las células hospederas fotoautotróficas, en particular las células cianobacterianas puede ser incrementada en comparación con las respectivas
5 células cianobacterianas de tipo natural carentes de estas primeras estimulaciones metabólicas.

6.7 Caracterización del mutante metabólico que sobreexpresa tanto la fosfocetolasa como la fosfoacetiltransacetilasa

10

El mutante PCC6803 pVZ-PpetJ-phk-pta fue caracterizado respecto a sus propiedades de desarrollo y el piruvato extracelular en comparación con la cepa de tipo natural *Synechocystis* PCC6803.

15

RESULTADOS:

20

No se pudieron detectar diferencias significativas en el desarrollo celular, el contenido de clorofila y la producción de oxígeno fotosintético entre la *Synechocystis* PCC6803 de tipo natural y el mutante.

25

La excreción del piruvato en el medio pudo detectarse al final de la fase logarítmica y se incrementó en el mutante comparado con el tipo natural. La densidad óptica en 750nm (OD_{750nm}) y la concentración de piruvato en el medio se dan en dos momentos temporales al final de la fase logarítmica. Estos resultados indican claramente que la sobreexpresión de tanto la fosfocetolasa como la fosfoacetiltransacetilasa como primeras

estimulaciones metabólicas dan como resultado un nivel potenciado de piruvato, el cual puede ser usado por las enzimas etanologénicas (segunda estimulación metabólica) para la producción potenciada de etanol.

5

	9 días		14 días	
	OD _{750nm}	piruvato [mM]	OD _{750nm}	piruvato [mM]
PCC6803 wt	7.85	0.006	9.52	0.010
PCC6803 pVZ- PpetJ-phk-pta	7.37	0.009	9.38	0.020

10 **6.8 Caracterización del mutante metabólico que sobreexpresa al
aldehído deshidrogenasa**

El mutante PCC6803 pVZ-PpetJ-aldh fue caracterizado respecto a sus propiedades de desarrollo y el piruvato
15 extracelular en comparación con la cepa de tipo natural *Synechocystis* PCC6803.

RESULTADOS:

20 No se pudieron detectar diferencias significativas en el desarrollo celular, el contenido de clorofila y la producción de oxígeno fotosintético entre la *Synechocystis* PCC6803 de tipo natural y el mutante.

La excreción de piruvato en el medio pudo detectarse al final de la fase logarítmica y se incrementó en el mutante comparado con el tipo natural. La densidad óptica en 750nm (OD_{750nm}) y la concentración de piruvato en el medio se dan en dos momentos temporales al final de la fase logarítmica. Estos resultados muestran que una estimulación en la producción de piruvato puede conseguirse mediante la sobreexpresión de aldehído deshidrogenasa como primera estimulación metabólica.

	9 días		14 días	
	OD _{750nm}	piruvato [mM]	OD _{750nm}	piruvato [mM]
PCC6803 wt	7.84	0.005	9.22	0.005
PCC6803 pVZ- PpetJ-aldh	8.14	0.005	8.50	0.021

6.9 Caracterización del mutante metabólico triple nocaut Δ ack/ Δ pta/ Δ ldh que afecta el lactato deshidrogenas (ldh), acetato quinasa (ack) y fosfoacetiltransacetilasa (pta) como primeras estimulaciones metabólicas

El mutante triple nocaut Δ ack/ Δ pta/ Δ ldh fue caracterizado respecto a sus propiedades de desarrollo y el piruvato extracelular en comparación con la cepa de tipo natural *Synechocystis* PCC6803.

RESULTADOS:

No se pudieron detectar diferencias significativas en el desarrollo celular, el contenido de clorofila y la producción de oxígeno fotosintético entre la *Synechocystis* PCC6803 de tipo natural y el mutante triple nocaout de Δ ack/ Δ pta/ Δ ldh.

5 La excreción de piruvato en el medio se pudo detectar al final de la fase logarítmica y se incrementó en el mutante comparado con el tipo natural. La densidad óptica en 750nm (OD_{750nm}) y la concentración de piruvato en el medio se dan en dos momentos temporales al final de la fase logarítmica.

10

	11 días		15 días	
	OD _{750nm}	piruvato [mM]	OD _{750nm}	piruvato [mM]
PCC6803 wt	8.3	0.003	11.5	0.005
Δ ack/ Δ pta/ Δ ldh	6.7	0.010	9.8	0.015

El ámbito de protección de la invención no está limitado a los ejemplos dados anteriormente. La invención se configura en

15 cada característica novedosa y cada combinación de características, que incluye particularmente cada combinación de cualquier característica que se establecen en las reivindicaciones, incluso si esta característica o esta

combinación de características no está explícitamente

20 establecida en las reivindicaciones o en los ejemplos.

REIVINDICACIONES:

1. Una célula hospedera fotoautotrófica metabólicamente
potenciada productora de etanol, la cual comprende:
 - 5 - por lo menos dos primeras estimulaciones metabólicas
que reducen la actividad enzimática o la afinidad de
por lo menos dos las enzimas endógenas de célula
hospedera involucradas en la fermentación de acetato y
lactato,
 - 10 - las primeras estimulaciones metabólicas dan como
resultado un nivel potenciado de biosíntesis de
acetaldehído, piruvato, acetyl-CoA o precursores de los
mismos comparado con la respectiva célula hospedera de
tipo natural,
 - 15 - por lo menos una segunda estimulación metabólica
diferente de la primera estimulación metabólica que
comprende una enzima sobreexpresada para la formación
de etanol.
- 20 2. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo
con la reivindicación 1, en donde
 - por lo menos enzimas endógenas de célula hospedera son
lactato deshidrogenasa y una enzima seleccionada de
fosfotransacetilasa y acetato quinasa.
- 25 3. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo
con las reivindicaciones anteriores, en donde las enzimas
son lactato deshidrogenasa, fosfotransacetilasa y acetato
quinasa.

- 80 -

4. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en donde la reducción de la actividad es el resultado de por lo menos una
5 ruptura del gen que codifica por lo menos una de las enzimas endógenas de célula hospedera.

5. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo con la reivindicación anterior, en donde por lo menos una
10 de las rupturas genéticas es causada por la inserción de un gen resistente a la biocida dentro del respectivo gen.

6. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en
15 donde
- por lo menos una de las primeras estimulaciones metabólicas comprende la transcripción de una molécula de mRNA antisentido que se enlaza con el mRNA que codifica por lo menos una de las enzimas endógenas de
20 célula hospedera, en donde el enlazamiento da como resultado una reducción de la actividad de la enzima endógena de célula hospedera.

7. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo
25 con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde

- 81 -

- por lo menos una enzima sobreexpresada para la formación de etanol es una enzima de alcohol deshidrogenasa.

- 5 8. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo con la reivindicación anterior, en donde
 - la enzima de alcohol deshidrogenasa es una enzima de alcohol deshidrogenasa que tiene por lo menos 60% o 70%, preferentemente 80% más preferentemente 90% de
10 identidad de secuencia con la secuencia de amino ácido de *Synechocystis* Adh mostrada en la Figura 42.
9. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo con la reivindicación 7, en donde
 - 15 - el alcohol deshidrogenasa es AdhE que directamente convierte acetil-CoA en etanol.
10. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en
20 donde
 - la enzima de alcohol deshidrogenasa es una deshidrogenasa dependiente de Zn^{2+} .
11. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo
25 con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que comprende además
 - una enzima de piruvato descarboxilasa que convierte el piruvato en acetaldehído, en donde

- 82 -

- la enzima de alcohol deshidrogenasa convierte el acetaldehído en etanol.

12. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo
5 con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde
- la única segunda estimulación metabólica es una enzima
de piruvato descarboxilasa.

13. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo
10 con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que
comprende además
- por lo menos una enzima endógena de alcohol
deshidrogenasa.

15 14. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo
con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en
donde el gen que codifica por lo menos una enzima
sobreexpresada para la formación de etanol está bajo
control transcripcional de un promotor endógeno a la
20 célula hospedera.

15. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo
con la reivindicación 14, en donde el gen que codifica por
lo menos una enzima sobreexpresada para la formación de
25 etanol está bajo control transcripcional de un promotor
heterólogo.

- 83 -

16. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo con las reivindicaciones 14 o 15, en donde el gen que codifica por lo menos una enzima sobreexpresada para la formación de etanol está bajo control transcripcional de un promotor inducible.

17. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo con la reivindicación anterior, en donde el promotor inducible es inducido bajo condiciones de extrabasación de nutriente, mediante la fase de desarrollo estacionario, mediante choque térmico, mediante choque de frío, mediante estrés oxidativo, mediante estrés salino, mediante luz o mediante oscuridad.

18. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17, en donde los promotores se seleccionan del grupo que consiste de:

- rbcLS, ntcA, nblA, isiA, petJ, petE, sigB, lrtA, htpG, hspA, clpB1, hliB, ggpS, psbA2, psaA, nirA y crhC.

19. Una célula hospedera fotoautotrófica metabólicamente potenciada productora de etanol que comprende:

- por lo menos dos primeras estimulaciones metabólicas que reducen la actividad enzimática o afinidad de por lo menos dos enzimas endógenas de célula hospedera involucradas en la fermentación de acetato y lactato,
- por lo menos una segunda estimulación metabólica diferente de por lo menos las dos primeras

- 84 -

estimulaciones metabólicas que comprende una enzima
sobreexpresada para la formación de etanol,

- las primera y segunda estimulaciones metabólicas que
dan como resultado una velocidad incrementada de
producción de etanol comparado con la respectiva célula
hospedera autotrófica productora de etanol que hospeda
la segunda estimulación metabólica pero que carece de
las primeras estimulaciones metabólicas.

- 10 20. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo
con la reivindicación anterior, en donde
por lo menos las dos enzimas endógenas de célula hospedera
son lactato deshidrogenasa y una enzima seleccionada de
fosfotransacetilasa y acetato quinasa.

15

21. Una célula hospedera fotoautotrófica metabólicamente
potenciada productora de etanol que produce una célula
hospedera de acuerdo con cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 20, en donde

- 20 - la célula hospedera es un organismo acuático.

22. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo
con la reivindicación anterior, en donde

- 25 - la célula hospedera se selecciona de un grupo que
consiste de: algas, protistas, y bacterias.

23. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo
con la reivindicación anterior, en donde

- 85 -

- la célula hospedera es una cianobacteria.

24. Una célula hospedera metabólicamente potenciada de acuerdo con la reivindicación anterior, en donde

5 la cianobacteria se selecciona de un grupo que consiste de Synechococcus, Synechocystis, y Phormidium.

25. Un método para la producción de etanol, comprendiendo dicho método las etapas de:

10 A) proporcionar y cultivar las células hospederas metabólicamente potenciadas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 en un medio de cultivo bajo exposición de la luz y CO₂, acumulando las células hospederas etanol mientras son cultivadas,

15 B) separar el etanol de las células hospederas y/o el medio de cultivo.

26. El método de acuerdo con la reivindicación anterior, en donde

20 - en la etapa A) del método se proporciona células hospederas, que comprenden un gen metabólicamente potenciado que codifica por lo menos una enzima para la formación de etanol bajo el control transcripcional de un promotor inducible, que puede ser inducido mediante
25 exposición a un estímulo exógeno, comprendiendo además la etapa A) del método:

- 86 -

A1) cultivar las células hospederas bajo la ausencia del estímulo exógeno o bajo una baja presencia del estímulo exógeno, y posteriormente

A2) proporcionar o potenciar el estímulo exógeno,

5 induciendo o potenciando de este modo la producción de etanol.

27. Un constructo para la transformación de una célula

hospedera mediante ruptura de un gen hospedero que

10 codifica una enzima de célula hospedera seleccionada a

partir de enzimas endógenas de célula hospedera

involucradas en la fermentación de acetato y lactato, el cual comprende:

- una secuencia heteróloga de ácido nucleico que

15 comprende un promotor y una resistencia a la biocida que confiere al gen bajo el control transcripcional del promotor, en donde

- la secuencia heteróloga de ácido nucleico está flanqueada en sus extremos 5' y 3' mediante secuencias

20 de ácido nucleico, que son capaces de unirse con por lo menos partes de dicho gen hospedero.

28. Un constructo para la transformación de una célula

hospedera rompiendo un gen hospedero que codifica una

25 enzima de célula hospedera seleccionada de la fermentación de acetato y lactato, comprendiendo:

- una secuencia heteróloga de ácido nucleico que comprende un promotor y un primer gen que codifica por lo menos

- 87 -

una primera enzima sobreexpresada para la formación de etanol bajo el control transcripcional del promotor, en donde

- la secuencia heteróloga de ácido nucleico está
- 5 flanqueada en su extremo 5' y 3' mediante secuencia de ácido nucleico, que son capaces de unirse a por lo menos partes de dicho gen hospedero.

29. El constructo de acuerdo con cualquiera de las

10 reivindicaciones 27 o 28, en donde

- la secuencia heteróloga de ácido nucleico comprende además un segundo gen que codifica por lo menos una segunda enzima sobreexpresada para la formación de etanol.

15 30. El constructo de acuerdo con cualquiera de las

reivindicaciones 27 a 29, en donde

las enzimas de célula hospedera se seleccionan del grupo que consiste de lactato deshidrogenasa, fosfotransacetilasa y acetato quinasa.

20

- 88 -

CÉLULAS HOSPEDERAS FOTOAUTOTRÓFICAS METABÓLICAMENTE POTENCIADAS**PRODUCTORAS DE ETANOL, MÉTODO PARA PRODUCIR LAS CÉLULAS****HOSPEDERAS, CONSTRUCTOS PARA LA TRANSFORMACIÓN DE LAS CÉLULAS****HOSPEDERAS, Y MÉTODO PARA PRODUCIR ETANOL USANDO LAS CÉLULAS**

5

HOSPEDERAS**RESUMEN TÉCNICO**

Una modalidad de la invención proporciona una célula
10 hospedera fotoautotrófica metabólicamente potenciada productora
de etanol que comprende:

- por lo menos dos primeras estimulaciones metabólicas que
reducen la actividad enzimática o la afinidad de por lo
menos dos enzimas endógenas de célula hospedera
15 involucradas en la fermentación de acetato y lactato,
- las primeras estimulaciones metabólicas dan como resultado
un nivel potenciado de biosíntesis de acetaldehído,
piruvato, acetil-CoA o precursores de los mismos comparado
con la respectiva célula hospedera de tipo natural,
- 20 - por lo menos una segunda estimulación metabólica diferente
de la primera estimulación metabólica que comprende una
enzima sobreexpresada para la formación de etanol.

Fig. 1

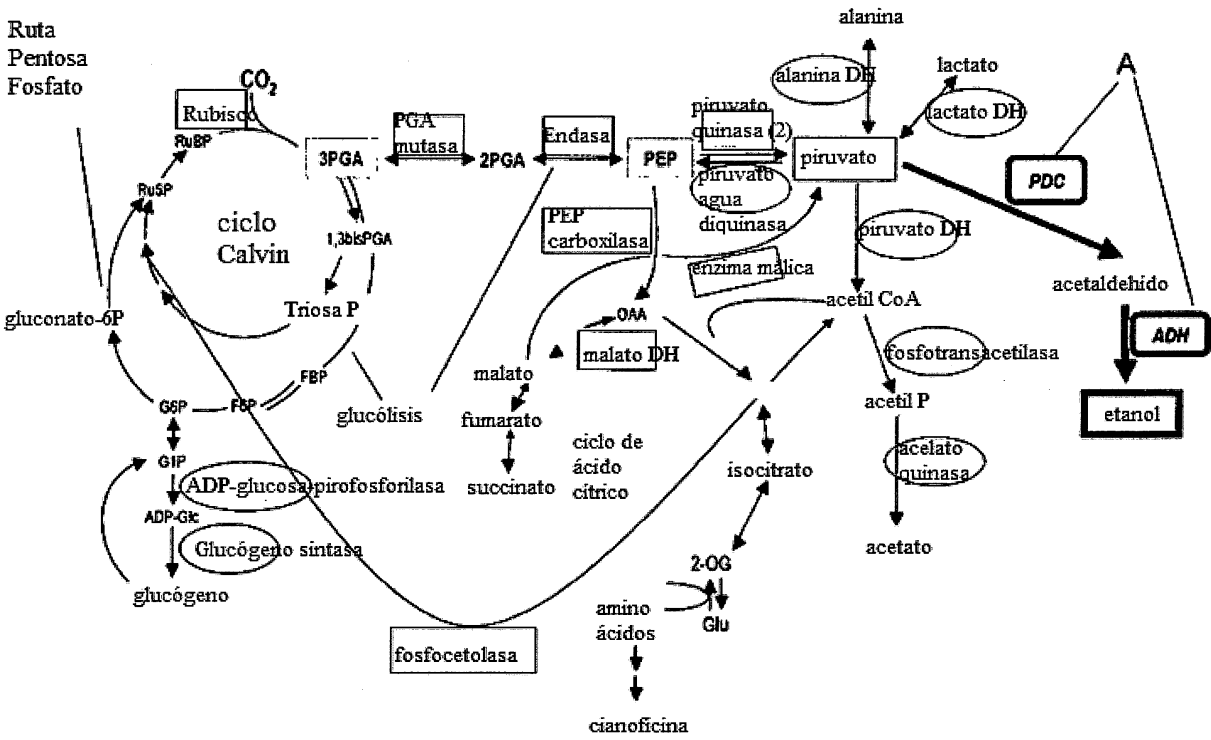


Fig. 2

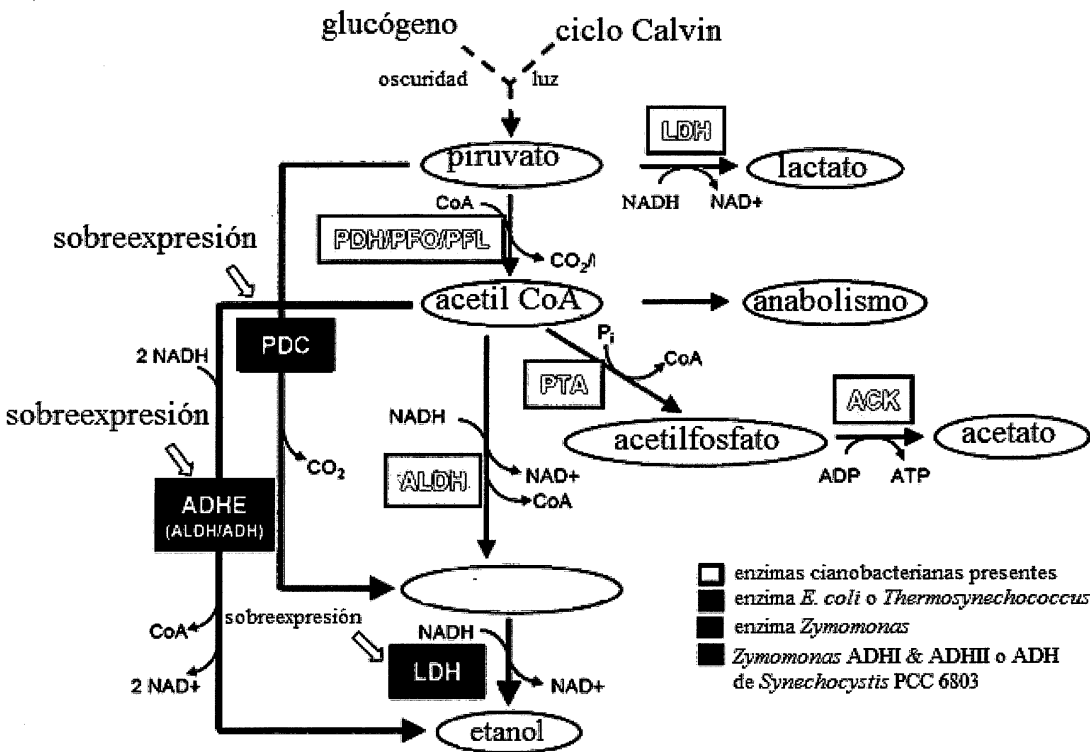
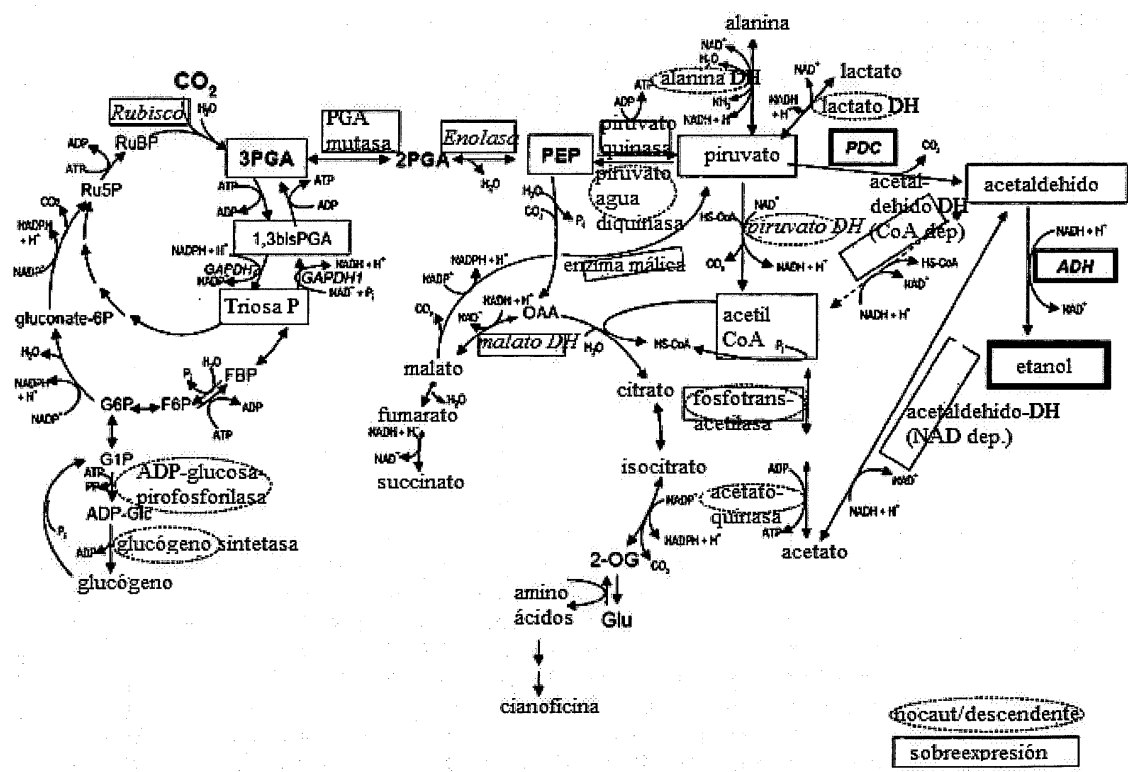


Fig. 3



kb

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/060526

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
INV.	C12N9/04	C12N9/10	C12N9/12	C12N9/88	C12P7/06
ADD.					
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
B. FIELDS SEARCHED					
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C12P					
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.
X	WO 2009/062190 A2 (JOULE BIOTECHNOLOGIES INC [US]; DEVROE ERIC [US]; KOSURI SRIRAM [US];) 14 May 2009 (2009-05-14) paragraph [00157] - paragraph [00158] -----				27-30
X	WO 98/39457 A1 (ENOL ENERGY INC [CA]; WOODS ROBERT PAUL [CA]; COLEMAN JOHN ROBERT [CA]) 11 September 1998 (1998-09-11) abstract ----- -/--				1-30
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.					
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family					
Date of the actual completion of the international search 26 April 2010			Date of mailing of the international search report 12/05/2010		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer van Voorst, Frank		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/060526

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PENGCHENG FU: "Genome-scale modeling of Synechocystis sp. PCC 6803 and prediction of pathway insertion" JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY & BIOTECHNOLOGY, vol. 84, 16 October 2008 (2008-10-16), pages 473-483, XP002579652 DOI: 10.1002/jctb.2065 page 481	1-30
A	JASON DEXTER AND PENGCHENG FU: "Metabolic engineering of cyanobacteria for ethanol production" ENERGY ENVIRON. SCI., vol. 2, 10 June 2009 (2009-06-10), pages 857-864, XP002579653 DOI: DOI: 10.1039/b811937f	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/060526

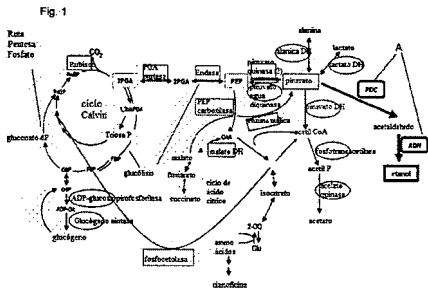
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009062190 A2	14-05-2009	US 2009203070 A1	13-08-2009
WO 9839457 A1	11-09-1998	AT 359371 T	15-05-2007
		AU 6201498 A	22-09-1998
		CA 2281953 A1	11-09-1998
		DE 69837531 T2	27-12-2007
		DK 0963439 T3	03-09-2007
		EP 0963439 A1	15-12-1999
		ES 2285759 T3	16-11-2007
		PT 963439 E	22-06-2007
		US 6306639 B1	23-10-2001

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País	(51) Int Cl: C12N 009/004 (71) Solicitante(s) ALGENOL BIOFUELS INC. (72) Inventor(es) KERSTIN BAIER Y OTROS (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 13/03/2012 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 13/08/2009 No. de solicitud PCT/EP2009/060526	(87) Publicación internacional Fecha: 17/02/2011 N° publicación: WO 2011/018116 A1
(54) Titulo: CÉLULAS HOSPEDERAS FOTOAUTOTRÓFICAS METABÓLICAMENTE POTENCIADAS PRODUCTORAS DE ETANOL, MÉTODO PARA PRODUCIR LAS CÉLULAS HOSPEDERAS, CONSTRUCTOS PARA LA TRANSFORMACIÓN DE LAS CÉLULAS HOSPEDERAS, Y MÉTODO PARA PRODUCIR ETANOL USANDO LAS CÉLULAS HOSPEDERAS	

Resumen:

Una modalidad de la invención proporciona una célula hospedera fotoautotrófica metabólicamente potenciada productora de etanol que comprende:

- por lo menos dos primeras estimulaciones metabólicas que reducen la actividad enzimática o la afinidad de por lo menos dos enzimas endógenas de célula hospedera involucradas en la fermentación de acetato y lactato,
- las primeras estimulaciones metabólicas dan como resultado un nivel potenciado de biosíntesis de acetaldehído, piruvato, acetil-CoA o precursores de los mismos comparado con la respectiva célula hospedera de tipo natural,
- por lo menos una segunda estimulación metabólica diferente de la primera estimulación metabólica que comprende una enzima sobreexpresada para la formación de etanol.



Sobra

con

Artas

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0019346	
				Bogotá D.C., Febrero 27 de 2012 - 07:20:23	
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS				NI 860.041.367	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157716576	24/02/2012	88.600.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00	✓
				\$590.000.00	
=====					
SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIE			SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO		
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____			No. 12-038998- -00000-0000		
			Fecha: 2012-03-06 12:06:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR		
			Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI		
			Act. 411 PRESENTACION Folios: 104		
			Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI		
			Act. 411 PRESENTACION Folios: 106		
Colo: 19145 - 841 - 001 - 3 -					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Febrero 27 de 2012 - 07:20:48					

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0019232

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C., Febrero 27 de 2012 - 07:20:23

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157716576	24/02/2012	88.600.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1641 S.DISTINTIVO INSCRIPCION AFECTACION (CB.NOMBRE, DOMICIL	300.000.00	300.000.00
				\$300.000.00

SON: **TRESCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-038998- -00000-0000

Fecha: 2012-03-06 12:06:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 104

Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 105

Colo'. 19145-841-001-3.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 27 de 2012 - 07:20:44



No. 12-038998-00000-0000

Fecha: 2012-03-06 12:06:43
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 104

INES

PATENTE DE INVENCION ☐

MOD.

Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 105

6/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐