

Señor Director

NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Referencia: Expediente NC2016/0001048

Asunto: Solicitud de patente para: *"PRODUCCIÓN FOTOAUTOTRÓFICA E
HIDROGENOTRÓFICA DE ALCOHOLES Y BIODIESEL"*.

Solicitante: JAMES WEIFU LEE

Fecha de solicitud: 22 de agosto de 2016

RESPUESTA A EXAMEN PRELIMINAR

ANDRES RINCON USCATEGUI, identificado como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderado de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, doy respuesta al Oficio 9047, notificado por fijación en lista el 05 de septiembre de 2016, para lo cual pedí plazo adicional el 03 de noviembre de 2016.

I. MODIFICACIONES AL PLIEGO REIVINDICATORIO

Con el fin de atender las observaciones realizadas por el examinador de manera preliminar al examen de patentabilidad, el solicitante decide aportar un nuevo capítulo reivindicatorio conformado por 20 reivindicaciones en las que se han incluido las siguientes modificaciones:

1. La reivindicación 1 ha sido modificada definiendo claramente el proceso para la producción autotrófica de alcoholes y biodiesel.
2. La reivindicación 1 ahora especifica las etapas relevantes de *"separación"* y *"recolección"*

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel: (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax In U.S.A: (1-800) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 852 - Tel: (57-4) 520 4760 / (57-4) 326 0789 / (57) 317 365 8663 / (57) 318 532 2365- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

3. Las reivindicaciones 2 a 20 han sido modificadas definiendo los genes que codifican las enzimas relevantes para la producción de biocombustible de acuerdo al listado de secuencias SEQ ID NOS: 1-232

4. El capítulo descriptivo de la solicitud ha sido modificado de tal manera que los párrafos en inglés han sido traducidos al español.

Estas modificaciones se ajustan al artículo 34 de la Decisión 486 de 2000 y no constituyen una ampliación de la protección que correspondería a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

A pesar de eliminar materia del pliego reivindicatorio originalmente presentado, mi representada no renuncia a la protección que pueda obtener sobre dicha materia y se reserva el derecho de presentar una solicitud divisional que la contenga durante el trámite de la presente solicitud.

II. EN CUANTO A LAS OBJECIONES AL CAPITULO DESCRIPTIVO

1. Con respecto a la objeción formulada al capítulo descriptivo por presentar párrafos en inglés, se pone de presente que dicho capítulo descriptivo ha sido modificado y por lo tanto la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

2. Con respecto a la objeción formulada al capítulo descriptivo por no divulgar la invención de manera suficientemente completa para que la persona normalmente versada en la materia pueda ejecutarla, se pone de presente que estamos en desacuerdo ya que la descripción detalla claramente los pasos a seguir de los métodos reclamados. Por otro lado, los ejemplos de la solicitud permiten entender con mayor claridad el alcance de la presente invención y permiten a la persona versada en la materia basado en su conocimiento técnico normal reproducirla. Teniendo en cuenta lo anterior la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

III. EN CUANTO A LAS OBJECIONES DE SUPUESTA FALTA DE CLARIDAD

1. Con respecto a la objeción formulada a la reivindicación 1 por no ser clara y no especificar las características esenciales del microorganismo autótrofo transgénico, se pone de presente que la reivindicación 1 ha sido modificada definiendo claramente el proceso que se describe. Por otro lado, el proceso reivindicado se encuentra totalmente sustentado en la memoria descriptiva, ya que una de las características claves de la presente invención es la creación de una vía de producción de butanol de diseño para controlar y trabajar con los mecanismos fotosintéticos naturales para alcanzar una síntesis deseable de butanol directamente de CO₂ y H₂O. Los mecanismos fotosintéticos naturales incluyen (1) división del agua fotosintética y el gradiente de protones acoplado al proceso de transporte de electrones a través del sistema de la membrana tilacoidal, el que produce el poder reductor (NADPH) y la energía (ATP), y (2) el ciclo de Calvin que reduce CO₂ por el consumo del poder reductor (NADPH) y la energía (ATP).

De acuerdo a la presente invención, una serie de enzimas son usadas para crear una vía de producción de butanol de diseño que toma un producto intermediario del ciclo de Calvin y convierte este producto intermediario en butanol como se ilustra en la Figura 1. Una “enzima de la vía de producción de butanol de diseño” se define como una enzima como sirve como catalizador de al menos uno de los pasos de la vía de producción de butanol de diseño. De acuerdo a la presente invención, un número de productos intermediarios del ciclo de Calvin pueden ser utilizados para crear una o más vías de producción de butanol de diseño; las enzimas requeridas para una vía de producción de butanol de diseño son seleccionadas dependiendo de cuál producto intermediario del ciclo de Calvin se desprende la vía de producción de butanol de diseño en el ciclo de Calvin.

En un ejemplo, una vía de diseño creada toma gliceraldehídos-3-fosfato y los convierte en butanol usando, por ejemplo, un conjunto de enzimas consistentes en gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa, piruvato quinasa, piruvato-ferredoxina oxido reductasa, tiolasa (o acetil-CoA acetiltransferasa), 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa (o trans-enoil-CoA reductasa), butirilaldehído deshidrogenasa (o aldehído/alcohol deshidrogenasa (AdhE2)), y butanol deshidrogenasa. En esta vía de diseño derivada de gliceraldehídos-3-fosfato, para la conversión de dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato a butanol, dos

moléculas de NADH son generadas a partir de NAD⁺ en el paso de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-difosfoglicerato catalizado por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; a su vez dos moléculas de NADH son convertidas a NAD⁺: uno en el paso catalizado por la 3-hidroxiacetoacil-CoA deshidrogenasa al reducir acetoacil-CoA a 3-hidroxiacetoacil-CoA y otra en el paso catalizado por la butiril-CoA deshidrogenasa al reducir crotonil-CoA a butiril-CoA. Consecuentemente, en esta vía de diseño derivada de gliceraldehídos-3-fosfato, el número de moléculas de NADH consumidas es balanceado con el número de moléculas de NADH generadas. Aún más, tanto el paso de la vía catalizado por la butiraldehído deshidrogenasa para reducir butiril-CoA a butiraldehído y el paso terminal catalizado por la butanol deshidrogenasa para reducir butiraldehído a butanol, pueden usar NADPH, el que puede ser generado por división del agua fotosintética y el gradiente de protones acoplado al proceso de transporte de electrones. Por lo tanto, esta vía de producción de butanol de diseño derivada de gliceraldehídos-3-fosfato puede operar continuamente.

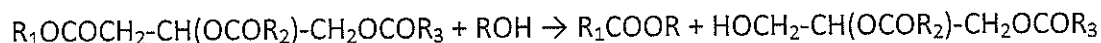
De acuerdo a una de varias representaciones, un gen para una lipasa de diseño es expresado en combinación con una vía de producción de alcohol (ROH) (de acuerdo a las Figs. 18, 19 y 20), lo que resulta en la producción de biodiesel (R₁COOR) a través de la siguiente reacción catalizada por lipasa:



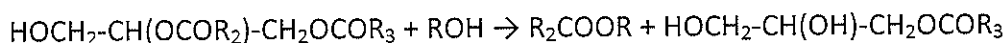
En donde el ácido graso (R₁COOH) proviene de las vías de síntesis de ácidos grasos naturales de la célula mientras que el alcohol (ROH) proviene de las vías de diseño de producción de alcohol que son expresadas en conjunto con la expresión de genes de diseño de la lipasa. Aquí, el grupo "R₁" representa a la cadena hidrocarbonada de un ácido graso. El grupo "R" representa la parte hidrocarbonada de un alcohol tal como una molécula de metanol, etanol, propanol, 1-butanol, isobutanol o pentanol.

De acuerdo a una de varias representaciones, las células huésped tienen típicamente vías de síntesis de lípidos nativos que pueden producir triglicéridos (R₁OCOCH₂-CH(OCOR₂)-CH₂OCOR₃) en los cuales "R₁", "R₂" y "R₃" representan las tres cadenas hidrocarbonadas de los grupos acilo. Por lo tanto, la expresión de la lipasa en combinación con las vías de producción de alcohol en las células huésped (Figs. 19 y 20), puede resultar en la producción de moléculas de biodiesel (R₁COOR, R₂COOR, y R₃COOR) a través de las

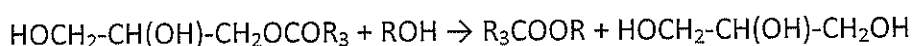
siguientes reacciones de transesterificación de triglicéridos catalizadas por lipasa. Primero, un triglicérido es transesterificado con alcohol (ROH) a un biodiesel ($R_1\text{COOR}$) y un diglicérido ($\text{HOCH}_2\text{-CH(OCOR}_2\text{)-CH}_2\text{OCOR}_3$):



Luego, el diglicérido ($\text{HOCH}_2\text{-CH(OCOR}_2\text{)-CH}_2\text{OCOR}_3$) del proceso anterior es transesterificado de nuevo a otra molécula de biodiesel ($R_2\text{COOR}$) y un monoglicérido ($\text{HOCH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{OCOR}_3$):



Finalmente, el monoglicérido ($\text{HOCH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{OCOR}_3$) es transesterificado para producir otra molécula de biodiesel ($R_3\text{COOR}$) con glicerol ($\text{HOCH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{OH}$) como subproducto:



Por lo tanto la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

2. Con respecto a la objeción formulada a la reivindicación 1 por no definir las operaciones unitarias de separación y recolección, se pone de presente que respecto a los procesos individuales de separación y recolección del combustible generado, se ha procedido a especificar en el actual pliego de reivindicaciones las etapas relevantes de “separación” y “recolección”. Además se pone de presente que dichas etapas se encuentran sustentadas en la memoria descriptiva ya que los organismos fotosintéticos de diseño con vías fotosintéticas mejoradas-dependientes de NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin (Figuras 1, y 4-10) pueden ser usados con un fotobiorreactor para la producción y recolección de butanol y/o alcoholes superiores relacionados. Este butanol y/o alcoholes superiores relacionados son seleccionados del grupo consistente en: 1-butanol, 2-metil-1-butanol, isobutanol, 3-metil-1-butanol, 1-hexanol, 1-octanol, 1-pentanol, 1-heptanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, 5-metil-1-heptanol, 4-metil-1-pentanol, 5-metil-1-hexanol, 6-metil-1-heptanol y combinaciones de estos.

Dichos organismos fotosintéticos de diseño tales como oxifotobacterias y algas transgénicas de diseño incluyen genes de vías fotosintéticas mejoradas-dependientes de NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin y tecnología de resguardo de bioseguridad para la producción fotobiológica mejorada de butanol y alcoholes superiores relacionados a partir de dióxido de carbono y agua. De acuerdo a una de varias representaciones, es una práctica preferida el crecer organismos fotosintéticos de diseño fotoautotróficamente usando dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) como fuentes de carbono y electrones en un medio de cultivo que contiene nutrientes inorgánicos. Los elementos nutrientes que son comúnmente requeridos para el crecimiento de un organismo fotosintético oxigénico son: N, P y K a concentraciones de alrededor de 1-10 mM, y Mg, Ca, S, y Cl a concentraciones de alrededor de 0,5 a 1,0 mM, más algunos elementos traza como Mn, Fe, Cu, Zn, B, Co, Mo entre otros a concentraciones μM . Todos los nutrientes minerales pueden ser suministrados en un medio acuoso mínimo que puede ser hecho con recetas bien establecidas de organismo fotosintéticos oxigénicos (tales como algas), medios de cultivo usando agua (agua dulce para algas de agua dulce de diseño; agua de mar para algas marinas de diseño tolerantes a la sal) y una cantidad relativamente pequeña de fertilizantes y sales minerales de bajo costo tales como bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) (o nitrato de amonio, urea, cloruro de amonio), fosfatos de potasio (K_2HPO_4 y KH_2PO_4), sulfato de magnesio heptahidrato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), cloruro de calcio (CaCl_2), sulfato de zinc heptahidrato ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sulfato de hierro (II) heptahidrato ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), y ácido bórico (H_3BO_3), entre otros. Esto es, grandes cantidades del alga de diseño (u oxifotobacterias) pueden ser crecidas a bajo costo en un corto periodo de tiempo debido a que en condiciones aeróbicas tales como en un charco abierto, el alga de diseño puede crecer fotoautotróficamente por sí misma usando el CO_2 atmosférico tan rápido como las cepas parentales tipo silvestre. Esta es una característica significativa (beneficio) de la invención que puede proveer una solución costo-efectiva en la generación de biocatalizador fotoactivos (los organismos fotosintéticos de diseño productores de biocombustibles tales como algas u oxifotobacterias de diseño) para la producción de energía solar renovable.

De acuerdo a una de varias representaciones, cuando un cultivo de un organismo fotosintético de diseño es crecido y está listo para la producción fotobiológica de butanol y/o alcoholes superiores relacionados, las células del organismo fotosintético de diseño son entonces inducidas para expresar las vías fotosintéticas mejoradas-dependientes de

NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin para la producción fotobiológica de butanol y/o alcoholes superiores relacionados a partir de dióxido de carbono y agua. El método de inducción es específico para el gen (o genes) de diseño. Por ejemplo, si cuando un promotor *nirA* es usado para controlar el gen (o genes) de la vía canalizada con el ciclo de Calvin tales como los de las SEQ ID NOS: 58–69 y 72 (y/o 73) que representan un *Thermosynechococcus* transgénico de diseño que incluye los genes de diseño de las vías fotosintéticas dependientes de NADPH mejoradas, canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato (ver Figura 4) para la producción fotobiológica de 1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua, el organismo *Thermosynechococcus* transgénico de diseño es crecido en un medio de cultivo líquido mínimo que contiene amonio (pero no nitrato) y otros nutrientes inorgánicos. Cuando el cultivo de *Thermosynechococcus* transgénico de diseño ha crecido y está listo para la producción del biocombustible butanol, se agrega el fertilizante nitrato al medio de cultivo para inducir la expresión de los genes de diseño controlados por el promotor *nirA* de las vías canalizadas con el ciclo de Calvin para la producción fotobiológica de 1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua.

Para el organismo (u organismos) fotosintético de diseño con vías controladas por promotores anaeróbicos tales como los *Nostoc* transgénicos de diseño que contienen los genes de diseño controlados por el promotor *hox* para vías fotosintéticas dependientes de NADPH mejoradas, canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato de SEQ ID NOS: 104–109, se pueden usar condiciones anaeróbicas para inducir la expresión del gen (o genes) de diseño para las vías de producción fotobiológica de 2-metil-1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua (Figura 5). Esto es, cuando un cultivo de *Nostoc* transgénicos de diseño es crecido y está listo para la producción fotobiológica de biocombustibles, sus células son luego colocadas (o selladas) bajo ciertas condiciones anaeróbicas para inducir la expresión de los genes de diseño controlados por *hox* para la producción fotobiológica de 2-metil-1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua.

Para aquellos organismos fotosintéticos de diseño que contienen un promotor de respuesta a la luz y calor y vías controladas por un promotor *nirA* tales como *Prochlorococcus* transgénicos de diseño que contienen un conjunto de vías fotosintéticas dependientes de NADPH mejoradas, canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato controladas por los promotores *groE* y *nirA* de las SEQ ID NOS:110–118, se

usa luz y calor en combinación con el uso de nitrato para inducir la expresión de los genes de las vías de producción fotobiológica de isobutanol a partir de dióxido de carbono y agua.

De acuerdo a otra representación, el uso de un alga marina de diseño o una oxifotobacteria marina permite el uso de agua de mar (salada) para la producción fotobiológica de biocombustibles sin el requerimiento de agua dulce o un suelo agrícola. Por ejemplo, un *Prochlorococcus marinus* de diseño que contiene los genes de diseño de SEQ ID NOS: 110–117 y 119–122 puede usar agua de mar y/o aguas subterráneas para el crecimiento fotoautotrófico y síntesis de 3-metil-1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua con las vías de diseño controladas por el promotor *groE* y canalizadas con el ciclo de Calvin (ver Figura 6). Los organismos fotosintéticos de diseño pueden ser usados también en un fotobiorreactor sellado el que opera en un desierto para la producción de isobutanol con una alta eficiencia de uso del agua que la pérdida de agua por evaporación y/o transpiración será mínima o nula comparado con lo que sucedería en un sistema abierto. Esto significa que esta representación puede representar a nueva tecnología de generación de energía renovable sin el requerimiento de tierra arable o fuentes de agua dulce.

De acuerdo a ciertas representaciones, el uso de oxifotobacterias de diseño que fijan nitrógeno permite la producción fotobiológica de biocombustibles sin el requerimiento de un fertilizante de nitrato. Por ejemplo, las *Nostoc* transgénicas de diseño que contienen genes controlados por el promotor *hox* de SEQ ID NOS: 104–109 es capaz de tanto fijar nitrógeno (N_2) y producir fotobiológicamente 2-metil-1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua (Figura 6). Por lo tanto, el uso de *Nostoc* transgénicas de diseño permite el crecimiento fotoautotrófico y la síntesis de 2-metil-1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua.

Algunas oxifotobacterias son diseñadas para realizar múltiples funciones. Por ejemplo, las *Cyanothece* transgénicas de diseño contienen genes de diseño controlados por el promotor *nirA* de SEQ ID NOS. 123–127 son capaces de (1) usar agua de mar, (2) fijar N_2 , y (3) producir fotobiológicamente 1-hexanola partir de dióxido de carbono y agua (Figura 8). El uso de este tipo de oxifotobacterias de diseño permite la producción fotobiológica de

biocombustibles avanzados tales como 1-hexanol usando agua de mar sin el requerimiento de un fertilizante de nitrato.

De acuerdo a una de varias representaciones, un método para la producción fotobiológica y recolección de butanol y alcoholes superiores relacionados incluye:

- a) introducir un organismo fotosintético de diseño a un sistema de biorreactor fotobiológico, el organismo fotosintético de diseño expresa un conjunto de enzimas configuradas para actuar en un producto intermediario del ciclo de Calvin y convertir este intermediario en butanol y alcoholes superiores relacionados;
- b) usar el poder reductor y la energía asociada al organismo fotosintético de diseño adquirido de la división fotosintética del agua y el gradiente de protones acoplado al proceso de transporte de electrones en el fotobiorreactor para sintetizar butanol y alcoholes superiores relacionados a partir de dióxido de carbono y agua; y
- c) usar un proceso de separación de producto para recolectar el butanol y/o alcoholes superiores relacionados sintetizados en el biorreactor.

En resumen, existe un número de representaciones de cómo organismos de diseño pueden ser usados para la producción fotobiológica de butanol (y/o alcoholes superiores relacionados). Una de las representaciones preferidas es de organismos de diseño para la producción directa de butanol a partir de CO_2 y H_2O con un reactor fotobiológico y la recolección de butanol usando un sistema de filtración y/o destilación/evaporación, el que incluye un proceso operacional específico descrito en una serie de pasos:

- a) Crear un organismo transgénico de diseño en un medio de cultivo mínimo usando CO_2 atmosférico como la fuente de carbono bajo condiciones aeróbicas (normales) antes de inducir la expresión de los genes de las vías de diseño productoras de butanol;
- b) Cuando el organismo de diseño es crecido y está listo para la producción de butanol, sellar o poner el organismo de diseño en una condición especial para la inducir la expresión de genes de diseño canalizados con el ciclo de Calvin;
- c) Cuando las enzimas de las vías de diseño se expresan, suministrar energía de luz visible tal como luz solar para que las células con los genes de diseño expresados

operen como catalizadores para la producción fotosintética de butanol y/o alcoholes superiores relacionados a partir de CO_2 y H_2O ;

d) Recolectar el producto butanol y/o alcoholes superiores relacionados por cualquier método conocido por aquellos con habilidades en el arte. Por ejemplo, recolectando el butanol y/o alcoholes superiores relacionados del reactor fotobiológico puede ser logrado por una combinación de técnicas filtración y destilación/evaporación.

El proceso anterior para usar organismos de diseño para la producción fotosintética y la recolección de butanol y/o alcoholes superiores relacionados puede ser repetido para una pluralidad de ciclos operacionales para lograr resultados más deseados. Cualquiera de los pasos a) hasta d) de este proceso descrito más arriba puede ser también ajustado de acuerdo a que la invención se ajuste a condiciones específicas. En la práctica, cualquiera de los pasos a) hasta d) del proceso puede ser aplicado totalmente o en parte, y/o puede ser ajustado en cualquier combinación para la producción fotobiológica mejorada de butanol y/o alcoholes superiores relacionados de acuerdo a esta invención.

La recolección de células microalgales desde un cultivo líquido es un desafío técnico significativo para lograr una recolección de bajo costo de la biomasa algal productora de biodiesel y otros productos algales de valor. Las dificultades técnicas provienen del hecho que microbios como las algas y cianobacterias tiene tamaños de micrómetros y sus membranas celulares típicamente contienen cargas negativas tales como las cabezas con carga negativa de los fosfolípidos de membrana plasmática. Las cargas negativas de la superficie de las células microbiales generalmente las mantienen alejadas unas de las otras, lo que representa un problema serio al tratar de recolectarlas desde un cultivo líquido. De acuerdo a una de varias representaciones, y como se muestra en la Fig. 20, este desafío técnico se puede superar al expresar algunos polipéptidos con carga positiva tales como polilisina en la superficie externa de las células microbiales para neutralizar las cargas de la superficie celular de manera tal que las células se pueden agregar resultando en una auto-floculación que aumenta dramáticamente la recolección de células microbiales tales como algas desde un cultivo líquido.

Los polipéptidos de diseño con carga positiva para expresión en la superficie de células microbiales son seleccionadas del grupo consistente en polipéptidos ricos en residuos de

lisina, polipéptidos ricos en residuos de arginina, polipéptidos ricos en residuos de histidina, polipéptidos ricos en residuos de lisina y arginina, polipéptidos ricos en residuos de lisina e histidina, polipéptidos ricos en residuos de lisina, arginina e histidina, polilisina fusionada con lipasa, polilisina fusionada con lipasa y poliamina, polipéptidos con carga positiva fusionados con lipasa, polilisina fusionada con lipasa y proteína fluorescente, y/o combinaciones de estos.

El uso de la SEQ ID NO: 225 en la transformación genética de un organismo fotosintético tal como *Synechocystis sp.* cepa PCC 6803 puede crear una cianobacteria de diseño tal como *Synechocystis* de diseño, en donde las células cianobacteriales en su masa de cultivo líquido pueden auto-flocular de manera inducible para aumentar la recolección de su biomasa luego de la inducción de la proteína de superficie celular unida proteína fluorescente verde -lipasa- polilisina- controlado por el promotor nirA (codificado por la SEQ ID NO: 225). La proteína fluorescente verde permite la visualización conveniente de la proteína de fusión expresada en la superficie celular bajo un microscopio de fluorescencia. La enzima lipasa expresada de esta manera en la superficie de las células cianobacteriales es perfecta para su uso como catalizador para la transesterificación no solo de lípidos cianobacteriales, sino que además de aceites de otras algas, aceites vegetales, aceites de cocina de desecho, y/o grasas animales para producir biodiesel como se reveló más arriba. Consecuentemente, el uso de las SEQ ID NOS. 225, 208 y 199–201 en una célula microbiana huésped tal como la cianobacteria *Synechocystis sp.* cepa PCC 6803 constituye un *Synechocystis* de diseño con vías de producción de metanol-biodiesel (ver Figura 18), en donde las células cianobacteriales en su cultivo líquido pueden auto-flocular para una recolección aumentada de su biomasa luego de la inducción de la de la proteína de superficie celular unida proteína fluorescente verde -lipasa- polilisina- controlado por el promotor nirA (codificado por la SEQ ID NO: 225).

Nótese, el uso de la SEQ ID NO: 232 en un organismo fotosintético huésped tal como *Synechococcus sp.* cepa PCC 7942 representa una cianobacteria de diseño, en donde las células cianobacteriales en su masa líquida de cultivo pueden auto-flocular de manera inducible para la recolección mejorada de su biomasa luego de la expresión de la lipasa unida con polilisina y controlada por el promotor nirA en la superficie celular de *Synechococcus sp.* cepa PCC 7942 (codificada por la SEQ ID NO: 232). La enzima lipasa

expresada de esta manera en la superficie celular es perfecta para su uso como catalizador en la transesterificación no solo de los lípidos de las algas verde-azules, sino que también de los aceites de algas, aceites vegetales, aceites de cocina de desecho, y/o grasas animales para producir el biocombustible revelado más arriba. Consecuentemente, el uso de la SEQ ID NO: 232 en combinación con SEQ ID NOS: 210 y 95–98 (y/o 99) en un organismo huésped fotosintético tal como *Synechococcus sp.* cepa PCC 7942 representa otra cianobacteria de diseño como *Synechococcus* con vías de diseño fotosintéticas y dependientes de NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato para la producción mejorada de butanol-biodiesel como se ilustra en las Figuras 4 y 20, en donde las células cianobacteriales en su masa líquida de cultivo pueden auto-flocular de manera inducible para la recolección mejorada de su biomasa luego de la expresión de la lipasa unida con polilisina y controlada por el promotor nirA en la superficie celular de *Synechococcus sp.* cepa PCC 7942 (codificada por la SEQ ID NO: 232).

Teniendo en cuenta lo anterior la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

IV. EN CUANTO A LA CARACTERIZACIÓN DEL RECURSO GENÉTICO Y LA NECESIDAD DE APORTAR CERTIFICADO DE DEPÓSITO

Con respecto a la necesidad de aportar certificado de depósito de acuerdo con el examinador, se pone de presente que estamos en desacuerdo ya que el capítulo descriptivo de la solicitud describe en detalle los microorganismos utilizados (Ver párrafos [0051] a [0490] de la solicitud prioritaria US 14/832,476) por lo que su contenido es suficiente para que la persona normal versada en la materia pueda reproducir la invención sin la necesidad de aportar una muestra del microorganismo en cuestión. Teniendo en cuenta lo anterior la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

V. EN CUANTO AL PODER Y LA EXISTENCIA Y REPRESENTACIÓN LEGAL DEL SOLICITANTE

Presento junto con este escrito el poder que me faculta para actuar en representación del solicitante, en el cual además se certifica su existencia y representación legal.

VI. EN CUANTO A LA CESIÓN DE LOS INVENTORES

Con respecto a la objeción formulada por el examinador en donde requiere el documento de cesión de los inventores, se pone de presente que el inventor de la presente solicitud es el mismo solicitante y por lo tanto la presentación de dicho documento no es necesaria. Teniendo en cuenta lo anterior la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

VII. EN CUANTO AL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

Con respecto a la copia certificada del documento de prioridad se pone de presente que dicho documento ya fue presentado en línea ante su despacho dentro del vencimiento correspondiente.

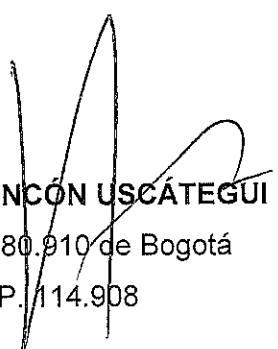
VIII. PETICIÓN

Teniendo en cuenta que la presente solicitud cumple con los requisitos de los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de 2000 y considerando que se ha dado respuesta a cada una de las observaciones de la Dirección de Nuevas Creaciones con respecto a otros aspectos que tienen que ver con la patentabilidad de la invención, solicito a su Despacho continuar con el trámite administrativo correspondiente.

IX. ANEXOS

1. Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 20 reivindicaciones;
2. Nuevo capítulo descriptivo;
3. Sustitución del poder otorgado a CAVELIER ABOGADOS a mi favor, para lo cual solicito me sea reconocida personería y así continuar con el trámite de este asunto en favor de la sociedad solicitante.

Señor Director,


ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI
C.C. 79.780.910 de Bogotá
T.P. 114.908

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

1. Un método para la producción autotrófica de alcoholes y biodiesel CARACTERIZADO porque comprende las etapas de:

- a) Introducir un organismo autótrofo transgénico en un sistema de reactores, incluyendo el organismo autótrofo transgénico una serie de transgenes comprendidas por las SEQ ID NOS 1-232, las que codifican para un conjunto de enzimas que confieren una vía fotoautotrófica o hidrogenotrófica para la producción de alcohol y biodiesel;b)
- crecer el organismo transgénico del paso a) en un medio de cultivo mínimo usando CO₂ atmosférico como fuente de carbono bajo condiciones aeróbicas;
- c) inducir una condición especial de crecimiento del organismo transgénico del paso a) para la inducir la expresión de genes de diseño canalizados con el ciclo de Calvin;
- d) suministrar energía de luz visible tal como luz solar para que las células con los genes de diseño expresados de las SEQ ID NOS. 1-232 operen como catalizadores para la producción fotosintética del alcohol o el biodiesel a partir de dióxido de carbono y agua;
- e) usar un proceso de separación de productos mediante filtración y destilación/evaporación, para recolectar el alcohol y biodiesel sintetizado en el biorreactor; y
- f) recolectar la biomasa del cultivo líquido presente en el biorreactor por medio de auto-floculación de las células transgénicas de diseño que están en la masa de cultivo líquida, las queauto-floculan de manera inducible para aumentar la recolección de su biomasa

cuando expresan las SEQ ID NOS. 222 y 227-232 que codifican polipéptidos de carga positiva que se expresan en la superficie celular microbiana transgénica.

2. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque emplea un sistema regulatorio de transcripción sensible a biocombustibles-alcohol en combinación con un marcador selectivo para mejorar la búsqueda de células transgénicas que tienen una producción aumentada de un biocombustible seleccionado del grupo consistente en butanol y alcoholes superiores relacionados.

3. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque dicho organismo autótrofo transgénico puede ser seleccionado entre una planta fotosintética transgénica, una célula fotosintética transgénica, un alga fotosintética, un alga verde azul, una cianobacteria transgénica y una bacteria transgénica que incluye al menos una vía fotosintética y una vía hidrogenotrófica de diseño para la producción autotrófica de un alcohol; y el alcohol es seleccionado del grupo consistente en metanol, etanol, propanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol, isobutanol, 3-metil-1-butanol, 1-hexanol, 1-octanol, 1-pentanol, 1-heptanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, 5-metil-1-heptanol, 4-metil-1-pentanol, 5-metil-1-hexanol, 6-metil-1-heptanol y combinaciones de estos.

4. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque dicho alcohol es simultáneamente y/o subsecuentemente utilizado por una lipasa en la transesterificación de triglicéridos y ácidos grasos para la producción de biodiesel.

5. Un organismo autótrofo transgénico para la producción autotrófica de alcoholes y biodiesel, CARACTERIZADO porque incluye al menos una de las secuencias SEQ ID NOS 1-232.

6. El organismo de la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque el organismo autótrofo transgénico es seleccionado entre algas eucariotas, algas verde azules (oxifotobacterias incluyendo cianobacterias y oxiclوروبacterias) y bacterias seleccionadas del grupo consistente en *Chlamydomonas reinhardtii*, *Platymonas subcordiformis*, *Chlorella fusca*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, '*Chlorella*' *ellipsoidea*, *Chlorella* spp., *Dunaliella salina*, *Dunaliella viridis*, *Dunaliella bardowil*, *Haematococcus pluvialis*; *Parachlorella kessleri*, *Betaphycus gelatinum*, *Chondrus crispus*, *Cyanidioschyzon merolae*, *Cyanidium caldarium*, *Galdieria sulphuraria*, *Gelidiella acerosa*, *Gracilaria changii*, *Kappaphycus alvarezii*, *Porphyra miniata*, *Ostreococcus tauri*, *Porphyra yezoensis*, *Porphyridium* spp., *Palmaria palmata*, *Gracilaria* spp., *Isochrysis galbana*, *Kappaphycus* spp., *Laminaria japonica*, *Laminaria* spp., *Monostroma* spp., *Nannochloris bacillaris*, *Nannochloris* spp., *Nannochloropsis oculata*, *Porphyra* spp., *Porphyridium* spp., *Undaria pinnatifida*, *Ulva lactuca*, *Ulva* spp., *Undaria* spp., *Phaeodactylum Tricornutum*, *Navicula saprophila*, *Cryptothecodinium cohnii*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Cyclotella cryptica*, *Euglena gracilis*, *Amphidinium* spp., *Symbiodinium microadriaticum*, *Macrocystis pyrifera*, *Ankistrodesmus braunii*, *Ankistrodesmus convolutus*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Ankistrodesmus stipitatus*, *Pavlova salina*, *Pavlova lutheri*, *Botryococcus braunii*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus rotundus*, *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus* sp. Ki4, *Scenedesmus* sp. LU4, *Scenedesmus quadricaudus*, *Scenedesmus obliquus*,

Thermosynechococcus elongatus BP-1, *Nostoc* sp. PCC 7120, *Synechococcus elongatus* PCC 6301, *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942, *Synechococcus* sp. cepa PCC 7002, *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803, *Prochlorococcus marinus* MED4, *Prochlorococcus marinus* MIT 9313, *Prochlorococcus marinus* NATL1A, *Prochlorococcus* SS120, *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*), *Spirulina pacifica*, *Lyngbya majuscula*, *Anabaena* sp., *Synechocystis* sp., *Synechococcus elongates*, *Synechococcus* (MC-A), *Trichodesmium* sp., *Richelia intracellularis*, *Synechococcus* WH7803, *Synechococcus* WH8102, *Nostoc punctiforme*, *Synechococcus* sp. cepa PCC 7943, *Synechocystis* PCC 6714 phycocyanin-deficient mutant PD-1, *Cyanothece* cepa 51142, *Cyanothece* sp. CCY0110, *Oscillatoria limosa*, *Lyngbya majuscula*, *Symploca muscorum*, *Gloeobacter violaceus*, *Prochloron didemni*, *Prochlorothrix hollandica*, *Synechococcus* (MC-A), *Trichodesmium* sp., *Richelia intracellularis*, *Prochlorococcus marinus*, *Prochlorococcus* SS120, *Synechococcus* WH8102, *Lyngbya majuscula*, *Symploca muscorum*, *Synechococcus bigranulatus*, cryophilic *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Nostoc* sp.-1, *Calothrix parietina*, thermophilic *Synechococcus bigranulatus*, *Synechococcus lividus*, thermophilic *Mastigocladus laminosus*, *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912, *Synechococcus vulcanus*, *Synechococcus* sp. cepa MA4, *Synechococcus* sp. cepa MA19, *Methanocella paludicola* SANAE, *Acinetobacter baumannii* ABNIH3, *Acinetobacter baumannii* ABNIH4, *Acinetobacter* sp. DR1, *Agrobacterium* sp. H13-3; *Agrobacterium vitis* S4, *Alcaligenes* sp., *Allochromatium vinosum* DSM 180, *Amycolatopsis mediterranei* S699, *Anoxybacillus flavithermus* WK1, *Aquifex aeolicus* VF5, *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304, *Archaeoglobus veneficus* SNP6, *Azospirillum* sp. B510, *Burkholderia cenocepacia* HI2424, *Caldicellulosiruptor bescii* DSM 6725, *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*, *Centipeda periodontii* DSM 2778, *Clostridium autoethanogenum*,

Clostridium ragsdalei, *Clostridium sticklandii* DSM 519, *Clostridium sticklandii*, *Corynebacterium glutamicum*, *Cupriavidus metallidurans* CH34, *Cupriavidus necator* N-1, *Desulfobacca acetoxidans* DSM 11109, *Exiguobacterium* sp. AT1b, *Ferrimonas balearica* DSM 9799, *Ferroglobus placidus* DSM 10642, *Geobacillus kaustophilus* HTA426, *Helicobacter bilis* ATCC 43879, *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6, *Hydrogenovibrio marinus*, *Klebsiella variicola* At-22, *Methanobacterium* sp. SWAN-1, *Methanobrevibacter ruminantium* M1, *Methanocaldococcus fervens* AG86, *Methanocaldococcus infernus* ME, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanocaldococcus* sp. FS406-22, *Methanocaldococcus vulcanius* M7, *Methanococcus aeolicus* Nankai-3, *Methanococcus maripaludis* C6, *Methanococcus maripaludis* S2, *Methanococcus voltae* A3, *Methanocorpusculum labreanum* Z, *Methanoculleus marisnigri* JR1, *Methanohalophilus mahii* DSM 5219, *Methanolinea tarda* NOBI-1, *Methanoplanus petrolearius* DSM 11571, *Methanoplanus petrolearius*, *Methanopyrus kandleri* AV19, *Methanoregula boonei* 6A8, *Methanosaeta harundinacea* 6Ac, *Methanosalsum zhilinae* DSM 4017, *Methanosarcina acetivorans* C2A, *Methanosarcina barkeri* str. Fusaro, *Methanosarcina mazei* Go1, *Methanosphaera stadtmanae*, *Methanospirillum hungatei* JF-1, *Methanothermobacter marburgensis* str. Marburg, *Methanothermobacter marburgensis*, *Methanothermobacter thermautotrophicus*, *Methanothermococcus okinawensis* IH1, *Methanothermus fervidus* DSM 2088, *Methylobacillus flagellates*, *Methylobacterium organophilum*, *Methylococcus capsulatus*, *Methylomicrobium kenyense*, *Methylomonas methanica* MC09, *Methylomonas* sp. LW13, *Methylosinus* sp. LW2, *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Methylotenera mobilis* JLW8, *Methylotenera versatilis* 301, *Methylovorus glucosetrophus* SIP3-4, *Moorella thermoacetica* ATCC 39073, *Moorella thermoacetica*, *Oligotropha*

carboxidovorans OM5, *Paenibacillus terrae* HPL-003, *Pelotomaculum thermopropionicum* SI, *Planctomyces brasiliensis* DSM 5305, *Pyrococcus furiosus* DSM 3638, *Pyrococcus horikoshii* OT3, *Pyrococcus yayanosii* CH1, *Ralstonia eutropha* H16, *Rubrivivax* sp., *Selenomonas noxia* ATCC 43541, *Shewanella baltica* BA175, *Stenotrophomonas* sp. SKA14, *Synechococcus* sp. JA-2-3B'a(2-13), *Synechococcus* sp. JA-3-3Ab, *Thermococcus gammatolerans* EJ3, *Thermococcus kodakarensis* KOD1, *Thermococcus onnurineus* NA1, *Thermococcus* sp. 4557, *Thermodesulfatator indicus* DSM 15286, *Thermofilum pendens* Hrk 5, *Thermotoga lettingae* TMO, *Thermotoga petrophila* RKU-1, *Thiocapsa roseopersicina*, *Thiomonas intermedia* K12, *Xanthobacter autotrophicus*, *Yersinia pestis* Antiqua, *Thermosynechococcus elongatus*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Methanosarcina barker* y *Microcoleus vaginatus*.

7. El organismo transgénico de la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque dicho organismo autótrofo transgénico incluye un conjunto de genes de diseño que expresan una vía fotoautotrófica de producción de metanol-biodiesel de diseño la que incluye: SEQ ID NO 58, 95, 96 y 132 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH), SEQ ID NO 12, 45, 47, 59, 100, 104, 110 y 133 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺), SEQ ID NO 199 y 202 (formiato deshidrogenasa), SEQ ID NO 200 y 203 (formaldehído deshidrogenasa), SEQ ID NO 53, 70, 71, 118, 141, 142, 201 y 204 (alcohol deshidrogenasa), y SEQ ID NO 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 216, 220, 222, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231 y 232 (lipasa).

8. El organismo transgénico de la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque dicho organismo autótrofo transgénico incluye un conjunto de genes de diseño que expresan vía hidrogenotrófica de producción de metanol-biodiesel de diseño la que incluye: SEQ ID NO 183 (hidrogenasa soluble reductora de NAD), SEQ ID NO 199 y 202 (formiato deshidrogenasa), SEQ ID NO 200 y 203 (formaldehído deshidrogenasa), SEQ ID NO 53, 70, 71, 118, 141, 142, 201 y 204 (alcohol deshidrogenasa), y SEQ ID NO 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 216, 220, 222, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231 y 232 (lipasa).

9. El organismo transgénico de la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque dicho organismo autótrofo transgénico incluye un conjunto de genes de diseño que expresan una vía fotoautotrófica de producción de etanol-biodiesel de diseño la que incluye: SEQ ID NO 58, 95, 96 y 132 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH), SEQ ID NO 12, 45, 47, 59, 100, 104, 110 y 133 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+), SEQ ID NO 10, 13, 43, 60 y 111 (fosfoglicerato mutasa), SEQ ID NO 9, 14, 42, 50, 61, 112, 130 (enolasa), SEQ ID NO 8, 15, 41, 51, 62, 131, (piruvato quinasa), SEQ ID NO 52 y 207 (piruvato decarboxilasa), SEQ ID NO 53, 70, 71, 118, 141, 142, 201 y 204 (alcohol deshidrogenasa), y SEQ ID NO 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 216, 220, 222, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231 y 232 (lipasa).

10. El organismo transgénico de la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque dicho organismo autótrofo transgénico incluye un conjunto de genes de diseño que expresan una vía fotoautotrófica de producción de butanol-biodiesel de diseño la que incluye: SEQ ID NO 12, 45,

47, 59, 100, 104, 110 y 133 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+), SEQ ID NO 10, 13, 43, 60 y 111 (fosfoglicerato mutasa), SEQ ID NO 9, 14, 42, 50, 61, 112, 130 (enolasa), SEQ ID NO 8, 15, 41, 51, 62, 131, (piruvato quinasa), SEQ ID NO 7, 16 y 40 (piruvato-ferrodoxina oxidorreductasa), SEQ ID NO (acetil-CoA acetiltransferasa), SEQ ID NO 6, 18, 39 y 174 (tiolasa), SEQ ID NO 5, 19, 175 (3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa), SEQ ID NO 4, 20, 37 y 176 (crotonasa), SEQ ID NO 90 y 161 (trans- enoil-CoA reductasa), SEQ ID NO 3, 21, 36 y 177 (butiril-CoA deshidrogenasa), SEQ ID NO 2, 22, 35 y 178 (butirilaldehído deshidrogenasa), SEQ ID NO 70, 71, 118, 128, 141, 142, 165, 201 y 204 (aldehído/alcohol deshidrogenasa, AdhE2), SEQ ID NO 1, 23, 34, 72, 73, 98, 99, 102, 103, 156, 157 y 179 (butanol deshidrogenasa), y SEQ ID NO 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 216, 220, 222, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231 y 232 (lipasa).

11. El organismo transgénico de la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque dicho organismo autótrofo transgénico incluye un conjunto de genes de diseño que expresan una vía fotoautotrófica de producción de butanol-biodiesel de diseño la que incluye: SEQ ID NO 58, 95, 96 y 132 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH), SEQ ID NO 12, 45, 47, 59, 100, 104, 110 y 133 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+), SEQ ID NO 10, 13, 43, 60 y 111 (fosfoglicerato mutasa), SEQ ID NO 9, 14, 42, 50, 61, 112, 130 (enolasa), SEQ ID NO 74 y 143 (fosfoenolpiruvato carboxilasa), SEQ ID NO 75 y 144 (aspartato aminotransferasa), SEQ ID NO 76 (aspartato quinasa), SEQ ID NO 77 (aspartato-semialdehído deshidrogenasa), SEQ ID NO 78 y 147 (homoserina deshidrogenasa), SEQ ID NO 79 (homoserina quinasa), SEQ ID NO 80 y 149 (treonina sintasa), SEQ ID NO 81 (treonina amonio-liasa), SEQ ID

NO 67, 119, 123 y 138 (2-isopropilmalato sintasa), SEQ ID NO 68, 124 y 139 (isopropilmalato isomerasa), SEQ ID NO 64, 66, 121, 125, 137 (3-isopropilmalato deshidrogenasa), SEQ ID NO 69, 97, 101, 117, 126 y 140 (2-cetoácido decarboxilasa), SEQ ID NO 70 y 118 (alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD), SEQ ID NO 53, 71, 118, 141, 142, 201 y 204 (alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH), SEQ ID NO 1, 23, 34, 72, 73, 98, 99, 102, 103, 156, 157 y 179 (butanol deshidrogenasa), y SEQ ID NO 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 216, 220, 222, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231 y 232 (lipasa).

12. El organismo transgénico de la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque dicho organismo autótrofo transgénico incluye un conjunto de genes de diseño que expresan una vía fotoautotrófica de producción de isobutanol-biodiesel de diseño la que incluye: SEQ ID NO 58, 95, 96 y 132 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH), SEQ ID NO 12, 45, 47, 59, 100, 104, 110 y 133 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺), SEQ ID NO 10, 13, 43, 60 y 111 (fosfoglicerato mutasa), SEQ ID NO 9, 14, 42, 50, 61, 112, 130 (enolasa), SEQ ID NO 8, 15, 41, 51, 62, 131, (piruvato quinasa), SEQ ID NO 105, 114 y 151 (acetolactato sintasa), SEQ ID NO 83, 106, 115 y 219 (cetoácido reductoisomerasa), SEQ ID NO 84, 107, 116 y 219 (dihidroxi ácido deshidratasa), SEQ ID NO 69, 97, 101, 117, 126 y 140 (2-cetoácido decarboxilasa), SEQ ID NO 70 y 118 (alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD), SEQ ID NO 53, 71, 118, 141, 142, 201 y 204 (alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH), y SEQ ID NO 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 216, 220, 222, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231 y 232 (lipasa).

13. El organismo transgénico de la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque dicho organismo autótrofo transgénico incluye un conjunto de genes de diseño que expresan una vía fotoautotrófica de producción de 3-metil-1-butanol-biodiesel de diseño la que incluye: SEQ ID NO 58, 95, 96 y 132 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH), SEQ ID NO 12, 45, 47, 59, 100, 104, 110 y 133 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺), SEQ ID NO 10, 13, 43, 60 y 111 (fosfoglicerato mutasa), SEQ ID NO 9, 14, 42, 50, 61, 112, 130 (enolasa), SEQ ID NO 8, 15, 41, 51, 62 y 131 (piruvato quinasa), SEQ ID NO 105, 114 y 151 (acetolactato sintasa), SEQ ID NO 83, 106, 115 y 219 (cetoácido reductoisomerasa), SEQ ID NO 84, 107, 116 y 219 (dihidroxi ácido deshidratasa), SEQ ID NO 67, 119, 123 y 138 (2-isopropilmalato sintasa), SEQ ID NO 65, 120 y 136 (3-isopropilmalato deshidratasa), SEQ ID NO 64, 66, 121, 125, 137 (3-isopropilmalato deshidrogenasa), SEQ ID NO 69, 97, 101, 117, 126 y 140 (2-cetoácido decarboxilasa), SEQ ID NO 70 y 118 (alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD), SEQ ID NO 53, 71, 118, 141, 142, 201 y 204 (alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH), SEQ ID NO 86, 122 y 155 (3-metilbutanal reductasa), y SEQ ID NO 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 216, 220, 222, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231 y 232 (lipasa).

14. El organismo transgénico de la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque dicho organismo autótrofo transgénico incluye un conjunto de genes de diseño que expresan una vía anaeróbica de producción de 1-butanol-biodiesel de diseño la que incluye: SEQ ID NO 180 (hidrogenasa convertidora de energía), SEQ ID NO 181 ([NiFe]-hidrogenasa), SEQ ID NO 183 (hidrogenasareductora de Coenzima F₄₂₀), hidrogenasa soluble, SEQ ID NO 182 (hetero disulfuro reductasa), SEQ ID NO 166 (formilmetanofurano deshidrogenasa), SEQ ID NO 167 (formil

transferasa), SEQ ID NO 188 (10 metenil-tetrahidrometanopterina ciclohidrolasa), SEQ ID NO 169 (10-metilen-H₄ metanopterinadeshidrogenasa), SEQ ID NO 170 (10-metilen-H₄ metanopterina reductasa), SEQ ID NO 171 (metil-H₄-metanopterina:proteína corrienoide hierro-sulfuro metiltransferasa), SEQ ID NO 172 (proteína corrienoide hierro-sulfuro), SEQ ID NO 173 (CO deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa), SEQ ID NO 6, 18, 39 y 174 (tiolasa), SEQ ID NO 5, 19, 175 (3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa), SEQ ID NO 4, 20, 37 y 176 (crotonasa), SEQ ID NO 3, 21, 36 y 177 (butiril-CoA deshidrogenasa), SEQ ID NO 2, 22, 35 y 178 (butirilaldehído deshidrogenasa), SEQ ID NO 1, 23, 34, 72, 73, 98, 99, 102, 103, 156, 157 y 179 (butanol deshidrogenasa), SEQ ID NO 53, 70, 71, 118, 141, 142, 201 y 204 alcohol deshidrogenasa, y SEQ ID NO 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 216, 220, 222, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231 y 232 (lipasa).

15. El organismo transgénico de la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque dicho organismo autótrofo transgénico incluye un conjunto de genes de diseño que expresan una vía anaeróbica de producción de 1-butanol-biodiesel de diseño la que incluye: SEQ ID NO 199 y 202 (formiato deshidrogenasa), SEQ ID NO 187 (10-formil-H₄ folato sintetasa), SEQ ID NO 188 (meteniltetrahidrofolato ciclohidrolasa), SEQ ID NO 189 (10-metilen-H₄ folatodeshidrogenasa), SEQ ID NO 170 (10-metilen-H₄ folato reductasa), SEQ ID NO 171 y 191 (metil-H₄-folato:proteína corrienoide hierro-sulfuro metiltransferasa), SEQ ID NO 172 y 192 (proteína corrienoide hierro-sulfuro), SEQ ID NO 173 (CO deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa), SEQ ID NO 6, 18, 39 y 174 (tiolasa), SEQ ID NO 5, 19, 175 (3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa), SEQ ID NO 4, 20, 37 y 176 (crotonasa), SEQ ID NO 3, 21, 36 y 177 (butiril-CoA deshidrogenasa), SEQ ID NO 2, 22, 35 y 178

(butirilaldehído deshidrogenasa), SEQ ID NO 1, 23, 34, 72, 73, 98, 99, 102, 103, 156, 157 y 179 (butanol deshidrogenasa), SEQ ID NO 53, 70, 71, 118, 141, 142, 201 y 204 (alcohol deshidrogenasa), y SEQ ID NO 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 216, 220, 222, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231 y 232 (lipasa).

16. El organismo transgénico de la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque dicho organismo autótrofo transgénico incluye un conjunto de genes de diseño que expresan una vía autotrófica de producción de metanol la que incluye SEQ ID NO 199 y 202 (formiato deshidrogenasa), SEQ ID NO 200 y 203 (formaldehído deshidrogenasa), y SEQ ID NO 53, 70, 71, 118, 141, 142, 201 y 204 (alcohol deshidrogenasa (ADH)).

17. El organismo transgénico de la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque el conjunto de enzimas incluye al menos una enzima seleccionada del grupo consistente en lipasa, formiato deshidrogenasa ($F_{ate}DH$), formaldehído deshidrogenasa ($F_{ald}DH$), alcohol deshidrogenasa (ADH), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , fosfoglicerato mutasa, enolasa, piruvato quinasa, citramalato sintasa, 2-metilmalato deshidratasa, 3-isopropilmalato deshidratasa, 3-isopropilmalato deshidrogenasa, 2-isopropilmalato sintasa, isopropilmalato isomerasa, 3-isopropilmalato isomerasa, isopropilmalato sintasa de diseño, isopropilmalato isomerasa de diseño, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño, deshidrogenasa de alcohol de cadena corta, hexanol deshidrogenasa, isopropilmalato sintasa

de diseño, isopropilmalato isomerasa de diseño, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño, y deshidrogenasa de alcohol de cadena corta de diseño.

18. El organismo transgénico de la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque dicho organismo autótrofo transgénico de diseño está hecho libre de cualquier gen de resistencia a antibióticos; para una mejor bioseguridad se utiliza una selección por complementación con nutrientes con *authotrophs* que son generados por la eliminación de un gen asociado con un nutriente esencial seleccionado del grupo consistente en la SEQ ID NO 220 (arginosuccinato liasa (*arg7*)), SEQ ID NO 215, 218, (nitrato reductasa), SEQ ID NO 83, 106, 115 y 219 (cetoácido reductoisomerasa) y SEQ ID NO 84, 107, 116, 153 y 219 (dihidroxi-ácido deshidratasa).

19. El organismo transgénico de la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque incluye un conjunto de genes ejemplificados con los constructos de diseño para expresar polipéptidos con carga que se expresan en la superficie celular microbial transgénica, seleccionados del grupo consistente en: polipéptidos ricos en residuos de lisina, polipéptidos ricos en residuos de arginina, polipéptidos ricos en residuos de histidina, polipéptidos ricos en residuos de lisina y arginina, polipéptidos ricos en residuos de lisina e histidina, polipéptidos ricos en residuos de lisina, arginina e histidina, SEQ ID NO 227 y 229, 230, 231, 232 (polilisina fusionada con lipasa), SEQ ID NO 222 (polilisina fusionada con lipasa y poliamina), polipéptidos con carga positiva fusionados con lipasa, SEQ ID NO 228 (polilisina fusionada con lipasa y proteína fluorescente), y polipéptidos con carga positiva fusionados con lipasa y proteína fluorescente.

20. El organismo transgénico de la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque el organismo autótrofo transgénico incluye una característica de resguardo de bioseguridad seleccionada del grupo consistente en un gen inducible de diseño para un canal de protones que se expresa con condiciones de inducción pre-determinadas, un gen inducible de diseño para un ARNi del ciclo de división celular que se expresa con condiciones de inducción pre-determinadas, un mutante con altos requerimientos de CO₂, y un organismo altamente termofílico como organismo huésped para la transformación con los genes para las vías de producción de biocombustible de diseño para crear organismos autótrofos de diseño con división celular controlable, y combinaciones de estos; donde además dicho organismo autótrofo transgénico incluye un conjunto de genes seleccionados del grupo consistente en: SEQ ID NO 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 216, 220, 222, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231 y 232 (lipasa), SEQ ID NO 199 y 202 (formiato deshidrogenasa (F_{ate}DH)), SEQ ID NO 200 y 203 (formaldehído deshidrogenasa (F_{ald}DH)), SEQ ID NO 53, 70, 71, 118, 141, 142, 201 y 204 (alcohol deshidrogenasa (ADH)), SEQ ID NO 58, 95, 96 y 132 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH), SEQ ID NO 12, 45, 47, 59, 100, 104, 110 y 133 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺), SEQ ID NO 10, 13, 43, 60 y 111 (fosfoglicerato mutasa), SEQ ID NO 9, 14, 42, 50, 61, 112, 130 (enolasa), SEQ ID NO 8, 15, 41, 51, 62 y 131 (piruvato quinasa), SEQ ID NO 52 y 207 (piruvato decarboxilasa), SEQ ID NO 53, 70, 71, 118, 141, 142, 201 y 204 (alcohol deshidrogenasa), SEQ ID NO 9, 14, 42, 50, 61, 112, 130 (enolasa), SEQ ID NO 8, 15, 41, 51, 62, 131, (piruvato quinasa), SEQ ID NO 7, 16 y 40 (piruvato-ferrodoxina oxidorreductasa), acetil-CoA acetiltransferasa, SEQ ID NO 6, 18, 39 y 174 (tiolasa), SEQ ID NO 5, 19, 175 (3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa), SEQ ID NO 4, 20, 37 y 176 (crotonasa), SEQ ID NO 90 y 161

(trans- enoil-CoA reductasa), SEQ ID NO 3, 21, 36 y 177 (butiril-CoA deshidrogenasa), SEQ ID NO 2, 22, 35 y 178 (butirilaldehído deshidrogenasa), SEQ ID NO 70, 71, 118, 128, 141, 142, 165, 201 y 204 (aldehído/alcohol deshidrogenasa), SEQ ID NO 1, 23, 34, 72, 73, 98, 99, 102, 103, 156, 157 y 179 (butanol deshidrogenasa), SEQ ID NO 74 y 143 (fosfoenolpiruvato carboxilasa), SEQ ID NO 75 y 144 (aspartato aminotransferasa), SEQ ID NO 76 (aspartato quinasa), SEQ ID NO 77 (aspartato-semialdehído deshidrogenasa), SEQ ID NO 78 y 147 (homoserina deshidrogenasa), SEQ ID NO 79 (homoserina quinasa), SEQ ID NO 80 y 149 (treonina sintasa), SEQ ID NO 81 (treonina amonio-liasa), SEQ ID NO 67, 119, 123 y 138 (2-isopropilmalato sintasa), SEQ ID NO 68, 124 y 139 (isopropilmalato isomerasa), SEQ ID NO 64, 66, 121, 125, 137 (3-isopropilmalato deshidrogenasa), SEQ ID NO 69, 97, 101, 117, 126 y 140 (2-cetoácido decarboxilasa), SEQ ID NO 53, 71, 118, 141, 142, 201 y 204 (alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH), SEQ ID NO 1, 23, 34, 72, 73, 98, 99, 102, 103, 156, 157 y 179 (butanol deshidrogenasa), SEQ ID NO 105, 114 y 151 (acetolactato sintasa), SEQ ID NO 83, 106, 115 y 219 (cetoácido reductoisomerasa), SEQ ID NO 84, 107, 116 y 219 (dihidroxi ácido deshidratasa), SEQ ID NO 69, 97, 101, 117, 126 y 140 (2-cetoácido decarboxilasa), SEQ ID NO 70 y 118 (alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD), SEQ ID NO 53, 71, 118, 141, 142, 201 y 204 (alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH), SEQ ID NO 105, 114 y 151 (acetolactato sintasa), SEQ ID NO 83, 106, 115 y 219 (cetoácido reductoisomerasa), SEQ ID NO 84, 107, 116 y 219 (dihidroxi ácido deshidratasa), SEQ ID NO 67, 119, 123 y 138 (2-isopropilmalato sintasa), SEQ ID NO 65, 120 y 136 (3-isopropilmalato deshidratasa), SEQ ID NO 64, 66, 121, 125, 137 (3-isopropilmalato deshidrogenasa), SEQ ID NO 69, 97, 101, 117, 126 y 140 (2-cetoácido decarboxilasa), SEQ ID NO 70 y 118 (alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD), SEQ ID NO 53, 71, 118, 141, 142, 201 y 204 (alcohol

deshidrogenasa dependiente de NADPH), SEQ ID NO 86, 122 y 155 (3-metilbutanal reductasa), hidrogenasa soluble tolerante al oxígeno (SH), hidrogenasa unida a membrana (MBH) tolerante al oxígeno, SEQ ID NO 180 (hidrogenasa convertidora de energía (*Ech en inglés*)), SEQ ID NO 184 (metil-H₄MPT: coenzima-M metiltransferasa (Mtr)), SEQ ID NO 185 (metiyl-coenzima M reductasa(Mcr)) , SEQ ID NO 182 (hetero disulfuro reductasa(Hdr)), SEQ ID NO 181 ([NiFe]-hidrogenasa (Mvh)), SEQ ID NO 183 (hidrogenasareductora de Coenzima F₄₂₀ (Frh)), A₁A₀-ATP sintasa, SEQ ID NO 199 y 202 (formiato deshidrogenasa), SEQ ID NO 187 (10-formil-H₄ folato sintetasa), SEQ ID NO 188 (meteniltetrahidrofolato ciclohrolasa), SEQ ID NO 189 (10-metilen-H₄ folatodeshidrogenasa), SEQ ID NO 170 (10-metilen-H₄ folato reductasa), SEQ ID NO 171 y 191 (metil-H₄-folato:proteína corrienode hierro-sulfuro metiltransferasa), SEQ ID NO 172 y 192 (proteína corrienode hierro-sulfuro), SEQ ID NO 173 (CO deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa), SEQ ID NO 166 (formilmetanofurano deshidrogenasa), SEQ ID NO 167 (formil transferasa), SEQ ID NO 188 (10-metenil-tetrahidrometanopterina ciclohrolasa), SEQ ID NO 169 (10-metilen-H₄ metanopterina deshidrogenasa), SEQ ID NO 170 (10-metilen-H₄ metanopterina reductasa), SEQ ID NO 171 (metil-H₄-metanopterina:proteína corrienode hierro-sulfuro metiltransferasa), SEQ ID NO 172 y 192 (proteína corrienode hierro-sulfuro), SEQ ID NO 173 (CO deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa), SEQ ID NO 6, 18, 39 y 174 (tiolasa), SEQ ID NO 5, 19, 175 (3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa), SEQ ID NO 4, 20, 37 y 176 (crotonasa), SEQ ID NO 3, 21, 36 y 177 (butiril-CoA deshidrogenasa), SEQ ID NO 178 (butirilaldehído deshidrogenasa), SEQ ID NO 1, 23, 34, 72, 73, 98, 99, 102, 103, 156, 157 y 179 (butanol deshidrogenasa), SEQ ID NO 69, 97, 101, 117, 126 y 140 (2-cetoácido decarboxilasa), SEQ ID NO 53, 70, 71, 118, 141, 142, 201 y 204 (alcohol deshidrogenasa), 2-metilbutiraldehído reductasa, SEQ ID NO 86, 122 y 155 (3-

metilbutanal reductasa), SEQ ID NO 92, 127 y 163 (hexanol deshidrogenasa), SEQ ID NO 93 y 164 (octanol deshidrogenasa), SEQ ID NO 94, 128 y 165 (deshidrogenasa de alcohol de cadena corta), y polipéptidos con carga positiva de diseño expresados en la superficie celular microbiana transgénica seleccionados del grupo consistente en: polipéptidos ricos en residuos de lisina, polipéptidos ricos en residuos de arginina, polipéptidos ricos en residuos de histidina, polipéptidos ricos en residuos de lisina y arginina, polipéptidos ricos en residuos de lisina e histidina, polipéptidos ricos en residuos de lisina, arginina e histidina, SEQ ID NO 227 y 229, 230, 231, 232 (polilisina fusionada con lipasa), SEQ ID NO 222 (polilisina fusionada con lipasa y poliamina), polipéptidos con carga positiva fusionados con lipasa, SEQ ID NO 228 (polilisina fusionada con lipasa y proteína fluorescente), y polipéptidos con carga positiva fusionados con lipasa y proteína fluorescente.

POWER OF ATTORNEY

PODER ESPECIAL

The undersigned / el(los) infrascrito(s)

(Nombre de la persona que firma)

James Weifu Lee

residing / con domicilio en

(Dirección de la persona que firma)

904 Lingale Arch, Chesapeake

on behalf of / en representación de

VA 23322 USA

hereby grant(s) / otorga(n) a:

Juan Pablo de la Jara Andrews y/o Arturo Covarrubias Vargas y/o Ximena Caulier Lillo y/o Daniela Castro González y/o Augusto Pérez Gallardo y/o Sofía Covarrubias Vargas, domiciliados en Enrique Foster Sur N° 39, Piso 9, Las Condes, Santiago, Chile

A power of attorney as ample and sufficient as may be required by law to represent, individually or jointly, in Chile and/or in other countries, before all courts, entities and administrative or judicial authorities with respect to any application, proceeding or litigation directly or indirectly related to general intellectual property rights, including patents of invention, utility models, industrial designs, industrial drawings, integrated circuit layouts or topography diagrams, trade secrets, know-how, trademarks, tradenames, advertising slogans, distinctive characters, geographical indications, denominations of origin, internet domain names, vegetal varieties, sanitary registrations, copyrights, related, and other relevant rights thereto.

To that effect, the aforesaid agents, either themselves or through their appointed or delegates, may proceed with the most ample and sufficient authority in order to carry out those matters entrusted to them. Under such authority, they or the representative appointed by them, may request from the relevant offices, entities and authorities the registration or renewal of all their trademarks, advertising slogans, distinctive characters, Internet domain names, patents, utility models, industrial designs, vegetal varieties or copyrights and related rights and all other intellectual and industrial property rights, for which purpose they are empowered to carry out before said offices and authorities, all of the necessary proceedings for the protection of intellectual and industrial property, such as filing applications and specifications, making statements and exercising remedies and filing claims; write and sign descriptions and amendments; modify, add and/or suppress claims; pay all taxes required by law; receive all forms of documents and securities; make amendments or request rectifications; dismiss actions voluntarily; request authorized copies; request certifications of any kind; give sworn statements or affidavits; assign and accept the assignment of applications, transfer, accept transfers and the subscription of any type of contract related to Intellectual and/or Industrial Property rights; limit applications; waive all or part of applications; request the voluntary cancellation of the registrations granted; request the approval and/or inscription of licensing contracts, franchising, transfer of technology, transfer or assignment of Intellectual and/or Industrial Property rights, and any other kind of contract; request the inscription of mergers, changes of names, attachments and garnishments and all kinds of precautionary measures; oppose and protest against any application or registration that in the attorneys' opinion may lead to confusion the trademarks, advertising slogans, distinctive characters, domain names, patents, utility models, industrial designs, know how, industrial or trade secrets, vegetal varieties or copyrights, and related principal's rights, also empowered at their sole discretion to waive or exercise judicial actions, remedies or legal deadlines, settle or compromise in and out of court, dismiss any recourses or claims presented, make statements or confessions in court on behalf of the principal, submit to arbitration and grant to arbitrators the powers of arbitrators not bound by legal principles, collect; appoint representatives; revoke prior representatives and powers of attorney; ratify measures taken by the attorneys or other people; represent the principal in court; bring, follow and reply to opposition and/or nullity, as well as criminal actions for forgery, usurpation or imitation, civil or commercial actions and any other administrative, civil or criminal lawsuits or legal actions, and the voluntary dismissal of the same; file appeals and any other legal or regulatory recourse.

Finally, this special power of attorney empowers the agents to perform all of the actions, procedures and proceedings necessary for the aforesaid purposes, before any Chilean or foreign judicial or administrative authority, and to delegate all or part of these powers and revoke any delegation of authority. This power of attorney also expressly ratifies all previous measures taken by the agents

Un poder tan amplio y suficiente como sea necesario conforme a Derecho, para que conjunta o separadamente los representen en Chile y/o en otros países, ante todos los tribunales, entidades y autoridades administrativas o judiciales que correspondan en cualquier solicitud, gestión, reconocimiento o litigio relacionado directa o indirectamente con derechos de propiedad intelectual en general, tales como patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, dibujos industriales, esquemas de trazado o topografías de circuitos integrados, secretos industriales, de fábrica o de comercio, know how, marcas comerciales, frases de propaganda, indicaciones geográficas, denominaciones de origen, nombres de dominio de internet, variedades vegetales, registros sanitarios, derechos de autor, derechos conexos y demás derechos relacionados.

Con tal objeto, los referidos mandatarios, ya sea ellos mismos o a través de personas designadas o delegadas por ellos mismos, podrán actuar con las más amplias y suficientes facultades para llevar a buen efecto la gestión encomendada. De esta forma podrán requerir de las oficinas, entidades y autoridades pertinentes, el registro o renovación de todas sus marcas comerciales, frases de propaganda, signos distintivos, nombres de dominio de Internet, patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, variedades vegetales o derechos de autor y derechos conexos y de todos los restantes derechos de Propiedad Intelectual y/o Industrial, estando facultados para efectuar ante las distintas oficinas y autoridades, todos los trámites necesarios para la protección de la Propiedad Intelectual y/o Industrial, tales como: presentar solicitudes y especificaciones, formular declaraciones, deducir recursos y reclamos; formular y firmar descripciones y enmiendas; modificar, agregar o suprimir reivindicaciones; pagar todos los impuestos determinado por la ley; recibir toda clase de documentos y valores; hacer modificaciones o solicitar rectificaciones; desistirse de procedimientos; solicitar copias autorizadas; solicitar certificaciones de cualquier tipo; prestar declaraciones juradas; ceder solicitudes y aceptar cesiones de solicitudes, transferir, aceptar transferencias y suscribir cualquier tipo de contratos relativos a derechos de Propiedad Intelectual y/o Industrial; limitar las solicitudes; desistirse en todo o en parte de las solicitudes; solicitar la cancelación voluntaria de los registros concedidos; solicitar la aprobación o inscripción de contratos de licencias, franchising, transferencias de tecnología, transferencias o cesiones de derechos de Propiedad Intelectual y/o Industrial, y cualesquiera otros contratos; solicitar la inscripción de fusiones, cambios de nombres, embargos, prendas y todo tipo de medidas precautorias; formular oposición y/o solicitar la nulidad contra cualquiera solicitud o registro que pudieran prestarse a confusión con las marcas comerciales, frases de propaganda, signos distintivos, nombres de dominio de Internet, patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, know how, secretos industriales o de comercio, variedades vegetales o derechos de autor y/o derechos conexos del mandante, con facultad, asimismo, a su discreción, de renunciar o no a acciones judiciales, recursos o plazos legales, transigir judicial y extrajudicialmente, desistirse de los recursos o de la acción deducida, absolver posiciones, someter a arbitraje y conferir a los árbitros las facultades de arbitadores, percibir; designar patrocinantes; revocar patrocinios y poderes anteriores; ratificar lo obrado por ellos o por otras personas; representar al poderdante en juicio; iniciar, proseguir y contestar demandas de oposición y/o nulidad, así como acciones penales por falsificación, usurpación o imitación, acciones civiles o comerciales, y cualesquiera otros juicios o acciones legales, sean de naturaleza administrativa, civil o criminal, y desistirse de ellos; presentar apelaciones y cualquier otro recurso legal o reglamentario. Finalmente, este poder especial faculta a los mandatarios para practicar todos los actos, gestiones y diligencias necesarios a los fines indicados, ante cualquier autoridad administrativa o judicial, chilena o extranjera, pudiendo delegar este poder, en todo o parte, y dejar sin efecto las delegaciones efectuadas. Quedan expresamente ratificadas por el presente cualesquiera gestiones anteriormente realizadas por los apoderados.

James Weifu Lee 10/12/2016

James Welfu Lee

Signature / Firma

James Welfu Lee 10/12/2016

CHRISTOPHER K. ARTHUR
NOTARY PUBLIC
COMMONWEALTH OF VIRGINIA
MY COMMISSION EXPIRES JULY 31, 2018
COMMISSION # 7617664

PUBLIC NOTARY:

I hereby authorize the signature of James Welfu Lee

JAMES WELFU LEE

On behalf of and representing:

CHRISTOPHER K ARTHUR

Whose document evidencing his/her legal capacity of agent has been sighted by me.

NOTARIO PÚBLICO:

Autorizo la Firma de don

En nombre y representación de

cuya personería he tenido a la vista.

Witness my hand and official seal,
this 13TH day of OCTOBER 2016

Christopher K. Arthur

Notary Public

My Commission Expires: 7-31-2018

REPRESENTACION

REPRESENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

James Weifu Lee

domiciliado (s) 904 Lingdale Arch Chesapeake, Virginia
en/of 23322, U.S.A

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Círculo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial e Intelectual, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial and Intellectual Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.

The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed

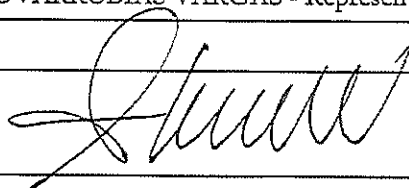
apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 14 de octubre de 2016
En/in Santiago, Chile

Por/by Arturo COVARRUBIAS VARGAS - Representante legal

Firma/Signature



Autorizo la firma de don ARTURO COVARRUBIAS VARGAS, C.I. N° 8.777.581-K, en la calidad en que comparece, en virtud de haber tenido a la vista la cédula de identidad respectiva. Doy fe.- Santiago, 20 de octubre de 2016.-



Señor Director

NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Asunto: Solicitud de patente para: **PRODUCCIÓN FOTOAUTOTRÓFICA
E HIDROGENOTRÓFICA DE ALCOHOLES Y BIODIESEL**
Expediente : NC2016/0001048
Solicitante : **JAMES WEIFU LEE**

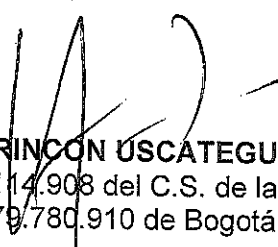
Yo, ADRIANA ZAPATA GIRALDO mayor de edad, vecina de esta ciudad, identificada con cédula de ciudadanía No. 51.680.061 de Bogotá, en mi calidad de representante legal de la sociedad CAVELIER ABOGADOS domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35, en desarrollo de la representación que le fue otorgada por el solicitante **JAMES WEIFU LEE**, confiero poder a los doctores ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI, identificado con cédula de ciudadanía No. 79.780.910 de Bogotá, portador de la tarjeta profesional No. 114.908, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 de Usaquén, portadora de la Tarjeta Profesional No. 23.555, JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL, identificado con la cédula de ciudadanía No. 16.209.380 de Cartago (Valle), portador de la Tarjeta Profesional No. 40.119 y EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY identificada con la cédula de ciudadanía No. 52.006.265 de Bogotá, portadora de la Tarjeta Profesional No. 65.794, para continuar con el trámite de la patente en referencia.

Los apoderados quedan facultados para interponer recursos, transigir, conciliar, desistir, cancelar, recibir, renunciar, sustituir y revocar las sustituciones, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Señor Director,


ADRIANA ZAPATA GIRALDO
C.C. No. 51.680.061 de Bogotá

Acepto:


ANDRES RINCÓN USCÁTEGUI
T.P.A. No. 114.908 del C.S. de la J
C.C. No. 79.780.910 de Bogotá

AML/NCA/COLO-22021-801-001-8 **"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"**

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel: (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7748 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 852 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731 - COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

MEMORIA DESCRIPTIVA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona de manera general a la tecnología para la producción de biocombustible con medidas de protección de bioseguridad. Más específicamente, la presente invención provee de una metodología autotrófica de producción avanzada de biocombustible basada en plantas transgénicas de diseño, tales como algas transgénicas, algas verde-azules (cianobacteria y oxiclوروبacteria), células vegetales o células bacteriales las que son creadas para usar el poder reductor (NADPH) o el hidrógeno (H_2), y la energía (ATP) adquirida de los procesos fotosintéticos y/o hidrogenotróficos para la síntesis autotrófica de alcoholes y biodiesel a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O).

REFERENCIA A LA LISTA DE SECUENCIAS

La presente invención contiene referencias a secuencias de aminoácidos y/o secuencias de ácidos nucleicos que han sido enviadas conjuntamente en la presente como el archivo de texto con las listas de secuencias "JWL_004_US3_SeqListingFull_ST25.txt" actualizada en Julio 28, 2015 desde "JWL_004_PCT_SeqListingFull_ST25.txt" actualizada en Diciembre 18, 2011 desde el archivo electrónico de "JWL_004_US1_SeqListingFull_ST25.txt", tamaño del archivo 429KB, creado en Marzo 29, 2011, en formato electrónico usando el Sistema de Llenado Electrónico de la oficina de Patentes y Marca registrada de EE.UU. La mencionada lista de secuencias fue preparada con *PatentIn* 3.5, el que cumple con todos los requerimientos de formato especificados en el *World Intellectual Property Organization Standard* (WIPO) ST.25 y la norma final de Estados Unidos (en inglés, US), y está incorporada aquí como por referencia en su integridad incluyendo de acuerdo a 37 C.F.R. §1.52 (e)(5) cuando es aplicable. Las secuencias de aminoácidos y/o ácidos nucleicos también han sido enviadas como la lista de secuencias como archivo pdf "JWL_004_US3_SeqListingFull_ST25.pdf", y el contenido íntegro de todos estos archivos está incorporado aquí por referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

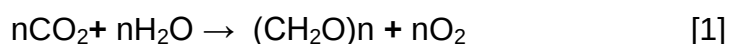
Butanol, alcoholes superiores relacionados y biodiesel pueden ser usados como combustible líquido para hacer andar motores tales como los de los autos. El butanol puede reemplazar a la gasolina y el contenido energético de ambos combustibles es relativamente similar (110.000 Btu por galón para el butanol; 115.000 Btu por galón para la gasolina). El butanol tiene muchas propiedades superiores como un combustible alternativo cuando se compara con el etanol. Estas incluyen: 1) El butanol tiene un contenido energético mayor (110,000 Btu por galón de butanol) que el etanol (84,000 Btu por galón de etanol); 2) El butanol es seis veces menos “evaporativo” que el etanol y 13,5 veces menos evaporativo que la gasolina, haciéndolo más seguro para usarlo como oxigenante y por ende eliminando la necesidad de mezclas muy especiales durante las temporadas de invierno y verano; 3) el butanol puede ser transportado con la infraestructura actualmente existente incluyendo las tuberías o ductos para gasolina mientras que el etanol debe ser transportado vía tren, barcaza o camión; y 4) el butanol puede ser usado como reemplazo de la gasolina galón por galón p.ej. 100% o en cualquier porcentaje mientras que el etanol puede ser solo usado como un aditivo hasta un máximo de 85% (E-85) y en ese caso sólo luego de una modificación significativa del motor (mientras que el butanol puede funcionar como un reemplazo del combustible al 100% sin tener que modificar el motor del auto).

Existe un mercado potencial significativo para el butanol, relacionado con alcoholes superiores y biodiesel como combustibles líquidos en el actual sistema de energía y transporte. El butanol es usado también como un solvente industrial. En los Estados Unidos, el butanol es actualmente manufacturado a partir del petróleo. Históricamente (1900s–1950s), el biobutanol fue manufacturado a partir del maíz y melaza en un proceso de fermentación que además produce acetona y etanol y que se conoce como fermentación ABE (acetona, butanol, etanol) típicamente con algunas bacterias productoras de butanol tales como *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*. EE.UU. perdió su suministro de azúcar de bajo costo desde Cuba alrededor 1954, sin embargo, la producción de butanol por fermentación declinó principalmente porque el precio del petróleo bajó por debajo del azúcar. Recientemente, existe un renovado interés I+D en producir butanol y/o etanol a partir de biomasa tales como harina de maíz (maicena) usando un proceso de fermentación con *Clostridia*-y/o levadura. Sin

embargo, similar a la situación del proceso de “producción de etanol de harina de maíz” también requiere un número de pasos que consumen energía incluyendo el cultivo-cosecha agrícola del maíz, recolección de los granos de maíz, procesamiento de la maicena a partir de los granos de maíz, y fermentación maicena-a-azúcar-a-butanol. El proceso de “producción de butanol de maicena” podría también costar probablemente una energía similar al valor de energía de su producto butanol. Esto no es sorprendente, y se puede entender porque la maicena que la tecnología actual puede usar representa solo una pequeña fracción de la biomasa total del grano de maíz que incluye el tallo, hojas y raíces del maíz. Los rastrojos del maíz son comúnmente descartados en los campos agrícolas donde se descomponen de vuelta a CO₂, porque representan una gran masa lignoceluloica que la industria de biorefinería actual no puede usar eficientemente para la producción de etanol o butanol. Existen iniciativas de investigación que están tratando de producir etanol o butanol a partir de los materiales de biomasa lignoceluloide de plantas- un concepto llamado “etanol celulósico” o “butanol celulósico”. Sin embargo, la biomasa de plantas ha evolucionado en mecanismos efectivos para resistir el asalto a sus azúcares estructurales de su pared celular por parte de los reinos animales y microbiales. Esta propiedad reside en un recalcitrante natural, el que crea obstáculos a una transformación costo-efectiva de la biomasa lignocelulósica a azúcares fermentables. Entonces, uno de los problemas conocido como “recalcitrancia lignocelulósica” representa una barrera técnica formidable a la conversión costo-efectiva de la biomasa de las plantas a azúcares fermentables. Esto significa que, debido al problema recalcitrante, las biomásas lignocelulósicas (tales como rastrojos de maíz, pastos o malezas, y material de plantas leñosas) no pueden ser fácilmente convertidas a azúcares fermentables para producir etanol o butanol sin hacerle un pretratamiento determinado, el que comúnmente se asocia con un alto costo de procesamiento. A pesar de más de 50 años de esfuerzos I+D en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica y en el procesamiento en la producción de butanol, el problema de la recalcitrancia lignocelulósica aún se mantiene como una barrera técnica formidable que hasta ahora no ha podido ser eliminada. Aún más, los pasos para el cultivo, recolección, proceso de pretratamiento, y fermentación de celulosa-a-azúcar-a-butanol de la biomasa lignocelulósica, cuestan todos una gran

cantidad de energía. Por ende, cualquier tecnología nueva que pueda saltarse estos problemas “cuello de botella” será de gran utilidad.

Las oxifotobacterias (también conocidas como algas verde-azules incluyendo cianobacterias y oxiclorobacterias) y algas (tales como *Chlamydomonas reinhardtii*, *Platymonas subcordiformis*, *Chlorella fusca*, *Dunaliella salina*, *Ankistrodesmus braunii*, y *Scenedesmus obliquus*), las que pueden realizar asimilación fotosintética de CO₂ con la evolución de O₂ a partir de agua en un medio de cultivo líquido con una conversión energética solar-a-biomasa máxima teórica de alrededor de un 10%, tienen un tremendo potencial de ser una fuente limpia y renovable de energía. Sin embargo, las plantas fotosintéticas oxigénicas tipo silvestre, tales como algas verde-azules y algas eucariotas, no poseen la habilidad de producir butanol directamente del CO₂ y H₂O. La fotosíntesis tipo silvestre usa el poder reductor (NADPH) y la energía (ATP) de la división del agua fotosintética y el gradiente de protones acoplado al proceso de transporte de electrones a través del sistema de la membrana tilacoidal para reducir el CO₂ a carbohidratos (CH₂O)_n tales como almidón con una serie de enzimas lo que se denomina colectivamente como "el ciclo de Calvin" en la región del estroma de los cloroplastos de algas o plantas verdes. El resultado neto del proceso fotosintético tipo silvestre es la conversión de CO₂ y H₂O en carbohidratos (CH₂O)_n y O₂ usando la energía solar de acuerdo a la siguiente reacción:



Los carbohidratos (CH₂O)_n son luego convertidos en todo tipo de material celular más complejo (biomasa) incluyendo proteínas, lípidos y celulosa y otros materiales de la pared celular durante el crecimiento celular y metabolismo.

En algunos tipos de algas tales como *Chlamydomonas reinhardtii*, algunas de las reservas orgánicas tales como almidón pueden ser lentamente metabolizadas a etanol (pero no a butanol) a través de una vía fermentativa metabólica secundaria. La vía fermentativa metabólica de las algas es similar al proceso de fermentación de las levaduras, por el cual el almidón se rompe en azúcares más pequeñas tales como glucosa la que es a su vez, transformada en piruvato mediante un proceso de glicólisis. El piruvato puede ser luego transformado a formiato, acetato, y etanol mediante pasos metabólicos adicionales (Gfeller y Gibbs (1984) “Fermentative metabolism of

Chlamydomonas reinhardtii,” *Plant Physiol.* 75:212-218). La eficiencia de este proceso metabólico secundario es limitada, debido a que probablemente usa solo una pequeña fracción de la limitada reserva orgánica tal como el almidón en las células de alga. Aún más, el proceso metabólico secundario nativo de las algas no puede producir butanol. Como se mencionó anteriormente, el butanol (y/o alcoholes superiores relacionados) tiene muchas propiedades físicas superiores para servir como reemplazo de la gasolina como combustible. Por eso, es necesario un nuevo mecanismo fotobiológico y/o hidrogenotrófico productor de butanol (y/o alcoholes relacionados y biodiesel) con una alta eficiencia de conversión de energía.

La aplicación Internacional No. PCT/US2009/034801 revela un conjunto de métodos de organismo fotosintéticos de diseño (tales como plantas transgénicas de diseño, células vegetales, algas y oxifotobacterias) para la producción fotobiológica de butanol a partir de dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O).

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención revela vías de diseño fotosintéticas y/o hidrogenotróficas, los genes de diseño y los organismos de diseño asociados para la producción autotrófica de alcoholes y/o biodiesel los que son seleccionados del grupo que consiste en: metanol, etanol, propanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol, isobutanol, 3-metil-1-butanol, 1-hexanol, 1-octanol, 1-pentanol, 1-heptanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, 5-metil-1-heptanol, 4-metil-1-pentanol, 5-metil-1-hexanol, 6-metil-1-heptanol, biodiesel, y las combinaciones de estos.

Los organismos autótrofos de diseño tales como oxifotobacterias y algas de diseño incluyen genes de diseño para vías fotosintéticas y/o hidrogenotróficas y tecnología de resguardo de bioseguridad para la síntesis autotrófica de metanol, etanol, butanol y alcoholes superiores relacionados a partir de dióxido de carbono y agua, en donde el alcohol es simultáneamente y/o subsecuentemente utilizado para una por una lipasa en la transesterificación de triglicéridos y ácidos grasos para la producción de biodiesel.

De acuerdo a una de varias representaciones, el organismo autótrofo transgénico de diseño incluye una célula transgénica de seleccionada del grupo consistente en algas verde-azules (oxifotobacterias incluyendo cianobacterias y oxiclorobacterias), bacterias hidrogenotróficas, bacterias fermentativas, arqueas metanógenas, plantas acuáticas,

células vegetales, algas verdes, algas rojas, algas pardas, diatomeas, algas marinas, algas de agua dulce, cepas de algas tolerantes a la sal, cepas de algas tolerantes al frío, cepas de algas tolerantes al calor, mutantes deficientes en pigmentos antena, cepas de algas tolerantes al butanol, cepas de algas tolerantes a alcoholes superiores, oxifotobacterias tolerantes al butanol, bacterias hidrogenotróficas y arqueas metanógenas tolerantes al butanol, oxifotobacterias tolerantes a alcoholes superiores, bacterias hidrogenotróficas tolerantes al alcohol, bacterias fermentativas tolerantes al alcohol, algas tolerantes al biodiesel, cianobacterias tolerantes al biodiesel, bacterias fermentativas tolerantes al biodiesel, y bacterias hidrogenotróficas tolerantes al biodiesel, algas tolerantes al alcohol y al biodiesel, cianobacterias tolerantes al alcohol y al biodiesel, bacterias fermentativas tolerantes al alcohol y al biodiesel, bacterias hidrogenotróficas tolerantes al alcohol y al biodiesel, y arqueas metanógenas tolerantes al alcohol y al biodiesel, y combinaciones de estas.

De acuerdo a otra representación, el organismo autótrofo transgénico de diseño incluye un conjunto de genes de diseño que expresan una vía fotoautotrófica de producción de metanol-biodiesel de diseño la que incluye: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , formiato deshidrogenasa, formaldehído deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, y lipasa

De acuerdo a otra representación, el organismo autótrofo transgénico incluye un conjunto de genes de diseño que expresan vía hidrogenotrófica de producción de metanol-biodiesel de diseño la que incluye: hidrogenasa soluble reductora de NAD, formiato deshidrogenasa, formaldehído deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, y lipasa

De acuerdo a otra representación, el organismo autótrofo transgénico incluye un conjunto de genes de diseño que expresan una vía fotoautotrófica de producción de etanol-biodiesel de diseño la que incluye: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , fosfoglicerato mutasa, enolasa, piruvato quinasa, piruvato decarboxilasa, alcohol deshidrogenasa, y lipasa

De acuerdo a otra representación, el organismo autótrofo transgénico incluye un conjunto de genes de diseño que expresan una vía fotoautotrófica de producción de

butanol-biodiesel de diseño la que incluye: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , fosfoglicerato mutasa, , enolasa, piruvato quinasa, piruvato-ferrodoxina oxidoreductasa, acetil-CoA acetiltransferasa, tiolasa, 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, crotonasa, trans- enoil-CoA reductasa, butiril-CoA deshidrogenasa, butirilaldehído deshidrogenasa, aldehído/alcohol deshidrogenasa (AdhE2), butanol deshidrogenasa, y lipasa.

De acuerdo a otra representación, el organismo autótrofo transgénico de diseño incluye un conjunto de genes de diseño que expresan una vía fotoautotrófica de producción de butanol-biodiesel de diseño la que incluye: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , fosfoglicerato mutasa, enolasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, aspartato aminotransferasa, aspartato quinasa, aspartato-semialdehído deshidrogenasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina quinasa, treonina sintasa, treonina amonioliasa, 2-isopropilmalato sintasa, isopropilmalato isomerasa, 3-isopropilmalato deshidrogenasa, 2-cetoácido decarboxilasa, alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD, alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH, butanol deshidrogenasa, y lipasa.

De acuerdo a otra representación, el organismo autótrofo transgénico de diseño incluye un conjunto de genes de diseño que expresan una vía fotoautotrófica de producción de isobutanol-biodiesel de diseño la que incluye: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , fosfoglicerato mutasa, enolasa, piruvato quinasa, acetolactato sintetasa, cetoácido reductoisomerasa, dihidroxi ácido deshidratasa, 2-cetoácido decarboxilasa, alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD, alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH, y lipasa.

De acuerdo a otra representación, el organismo autótrofo transgénico de diseño incluye un conjunto de genes de diseño que expresan una vía fotoautotrófica de producción de 3-metil-1-butanol-biodiesel de diseño la que incluye: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , fosfoglicerato mutasa, enolasa, piruvato quinasa, acetolactato sintetasa, cetoácido reductoisomerasa, dihidroxi ácido deshidratasa, 2-isopropilmalato sintasa, 3-isopropilmalato deshidratasa, 3-isopropilmalato deshidrogenasa, 2-cetoácido

decarboxilasa, alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD, alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH, 3-metilbutanal reductasa, y lipasa.

De acuerdo a otra representación, el organismo autótrofo transgénico de diseño incluye un conjunto de genes de diseño que expresan una vía anaeróbica de producción de 1-butanol-biodiesel de diseño la que incluye: hidrogenasa convertidora de energía, [NiFe]-hidrogenasa, hidrogenasareductora de Coenzima F₄₂₀, hidrogenasasoluble, hetero disulfuro reductasa, formilmetanofurano deshidrogenasa, formil transferasa, 10 metenil-tetrahidrometanopterina ciclohidrolasa, 10-metilen-H₄ metanopterina Deshidrogenasa, 10-metilen-H₄ metanopterina reductasa, metil-H₄-metanopterina:proteína corrienoide hierro-sulfuro metiltransferasa, proteína corrienoide hierro-sulfuro, CO deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa, tiolasa, 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa, butirilaldehído deshidrogenasa, butanol deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, y lipasa.

De acuerdo a otra representación, el organismo autótrofo transgénico de diseño está hecho libre de cualquier gen de resistencia a antibióticos; para una mejor bioseguridad se utiliza una selección por complementación con nutrientes con *autótrofos* especiales que son generados por la eliminación de un gen asociado con un nutriente esencial seleccionado del grupo consistente en arginosuccinato liasa (*arg7*), nitrato reductasa, cetoácido reductoisomerasa y dihidroxi-ácido deshidratasa.

De acuerdo a otra representación, polipéptidos con carga positiva de diseño que se expresan en la superficie celular microbiana transgénica son seleccionados del grupo consistente en polipéptidos ricos en residuos de lisina, polipéptidos ricos en residuos de arginina, polipéptidos ricos en residuos de histidina, polipéptidos ricos en residuos de lisina y arginina, polipéptidos ricos en residuos de lisina e histidina, polipéptidos ricos en residuos de lisina, arginina e histidina, polilisina fusionada con lipasa, polilisina fusionada con lipasa y poliamina, polipéptidos con carga positiva fusionados con lipasa, polilisina fusionada con lipasa y proteína fluorescente, y polipéptidos con carga positiva fusionados con lipasa y proteína fluorescente. Las células transgénicas de diseño en su masa líquida de cultivo auto-floculan de manera inducible para una recolección mejorada de su biomasa luego de la expresión de polipéptidos de diseño con carga positiva en la superficie celular.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Fig. 1 presentalas vías de producción de butanol de diseño que nacen del ciclo de Calvin usando el poder reductor (NADPH) y la energía (ATP) de la división del agua fotosintética y el gradiente de protones acoplado al proceso de transporte de electrones para reducir el CO_2 a butanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ con una serie de reacciones enzimáticas.

La Fig. 2^a presenta un constructo de ADN para el gen o los genes de producción de butanol de diseño.

La Fig. 2B presenta un constructo de ADN para el gen de diseño de conversión NADPH/NADH, para la inter-conversión de NADPH/NADH.

La Fig. 2C presenta un constructo de ADN para un gen (o genes) de diseño para un ARNi inhibidor de la síntesis almidón/glicógeno.

La Fig. 2D presenta un constructo de ADN para un gen (o genes) de diseño para la degradación de almidón-glicólisis.

La Fig. 2E presenta un constructo de ADN para un gen (o genes) de diseño para una vía de producción de butanol para su expresión citosólica.

La Fig. 2F presenta un constructo de ADN para un gen (o genes) de diseño para una vía de producción de butanol con dos sitios de recombinación para la transformación genética integrativa en oxifotobacterias.

La Fig. 2G presenta un constructo de ADN para un gen (o genes) de diseño para el control de la bioseguridad.

La Fig. 2H presenta un constructo de ADN para un gen (o genes) de diseño para un canal de protones.

La Fig. 3A ilustra un organismo de división celular controlable de diseño que posee dos funciones claves: mecanismo(s) de bioseguridad de diseño y vía (s) de producción de biodiesel de diseño.

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

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

La Fig.4 presenta vías derivadas del ciclo de Calvin y vías fotosintéticas aumentadas en NADPH que usan el poder reductor (NADPH) y la energía (ATP) de la división del agua fotosintética y el gradiente de protones acoplado al proceso de transporte de electrones para reducir el CO_2 a 1-butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) con una serie de reacciones enzimáticas.

La Fig. 5 presenta vías derivadas del ciclo de Calvin y vías fotosintéticas aumentadas en NADPH que usan NADPH y ATP de la división del agua fotosintética y el gradiente de protones acoplado al proceso de transporte de electrones para reducir el CO_2 a 2-metil-1-butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$) con una serie de reacciones enzimáticas.

La Fig. 6 presenta vías derivadas del ciclo de Calvin y vías fotosintéticas aumentadas en NADPH que usan NADPH y ATP de la división del agua fotosintética y el gradiente de protones acoplado al proceso de transporte de electrones para reducir el CO_2 a isobutanol ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{OH}$) y 3-metil-1-butanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) con una serie de reacciones enzimáticas.

La Fig. 7 presenta vías derivadas del ciclo de Calvin y vías fotosintéticas aumentadas en NADPH que usan NADPH y ATP de la división del agua fotosintética y el gradiente de protones acoplado al proceso de transporte de electrones para reducir el CO_2 a 1-hexanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) y 1-octanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) con una serie de reacciones enzimáticas.

La Fig. 8 presenta vías derivadas del ciclo de Calvin y vías fotosintéticas aumentadas en NADPH que usan NADPH y ATP de la división del agua fotosintética y el gradiente de protones acoplado al proceso de transporte de electrones para reducir el CO_2 a 1-pentanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 1-hexanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), y 1-heptanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) con una serie de reacciones enzimáticas.

La Fig. 9 presenta vías derivadas del ciclo de Calvin y vías fotosintéticas aumentadas en NADPH que usan NADPH y ATP de la división del agua fotosintética y el gradiente de protones acoplado al proceso de transporte de electrones para reducir el CO_2 a 3-metil-1-pentanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 4-metil-1-hexanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), y 5-metil-1-heptanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) con una serie de reacciones enzimáticas.

La Fig. 10 presenta vías derivadas del ciclo de Calvin y vías fotosintéticas aumentadas en NADPH que usan NADPH y ATP de la división del agua fotosintética y el gradiente

de protones acoplado al proceso de transporte de electrones para reducir el CO_2 a 4-metil-1-pentanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 5-metil-1-hexanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), y 6-metil-1-heptanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) con una serie de reacciones enzimáticas.

La Fig. 11 ilustra un organismo de diseño con hidrogenasas tolerantes al oxígeno de diseño y vías derivadas del ciclo de Calvin de diseño para la producción de biodiesel para la producción quimiolitotrófica aeróbica de biocombustibles tales como butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) a partir de hidrógeno (H_2), dióxido de carbono (CO_2) y oxígeno (O_2).

La Fig. 12 ilustra un organismo de diseño que incluye un sistema hidrogenotrófico anaeróbico de diseño con una (o más) vía (s) reductiva-Acetil-CoA de producción de biocombustibles para la producción quimiolitotrófica anaeróbica de 1-butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) a partir de hidrógeno (H_2) y dióxido de carbono (CO_2).

La Fig. 13 presenta una vía reductiva-Acetil-CoA de producción de biocombustibles de diseño para la producción hidrogenotrófica anaeróbica de 1-butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) a partir de dióxido de carbono (CO_2) con una serie de reacciones enzimáticas.

La Fig. 14 presenta una vía reductiva-Acetil-CoA dependiente de ATP de producción de biocombustibles de diseño para la producción hidrogenotrófica anaeróbica de 1-butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) a partir de dióxido de carbono (CO_2) con una serie de reacciones enzimáticas.

La Fig. 15 ilustra un organismo de diseño que incluye un sistema hidrogenotrófico metanogénico de diseño con una (o más) vía (s) reductiva-Acetil-CoA de producción de biocombustibles para la producción quimiolitotrófica anaeróbica de 1-butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) y metano (CH_4) a partir de hidrógeno (H_2) y dióxido de carbono (CO_2).

La Fig. 16 presenta una vía reductiva-Acetil-CoA de producción de biocombustibles de diseño para la producción hidrogenotrófica anaeróbica de 1-butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) y metano (CH_4) a partir de dióxido de carbono (CO_2) con una serie de reacciones enzimáticas.

La Fig. 17 presenta una vía reductiva-Acetil-CoA dependiente de ATP de producción de biocombustibles de diseño para la producción hidrogenotrófica de 1-butanol

($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) y metano (CH_4) a partir de dióxido de carbono (CO_2) con una serie de reacciones enzimáticas.

La Fig. 18 presenta una vía de producción de metanol-biodiesel autotrófica con un proceso de conversión de NADPH/NADH.

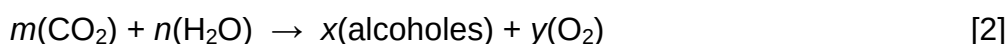
La Fig. 19 presenta una célula hidrogenotrófica de diseño para la síntesis autotrófica de alcohol y biodiesel a partir de dióxido de carbono (CO_2) e hidrógeno molecular (H_2).

La Fig. 20 presenta una célula autotrófica de diseño como un alga transgénica con lipasa y polipéptidos con carga positiva tal como polilisina expresada en la superficie celular para la producción autotrófica (como p.ej. fotosintética) de alcohol y biodiesel a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) y que permite la auto-floculación para aumentar la recolección de las células desde el cultivo líquido.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a la tecnología de producción autotrófica de metanol, etanol, butanol y alcoholes superiores relacionados, y biodieselbasados en organismos autótrofos de diseño tales como plantas transgénicas de diseño (p.ej., algas y oxifotobacterias), células vegetales, o bacterias. En este contexto y durante toda esta especificación, un “alcohol superior” o “alcohol superior relacionado” se refiere a un alcohol que incluye al menos cuatro átomos de carbono, que incluye tanto alcoholes de cadena lineal o ramificados tales como 1-butanol y 2-metil-1-butanol. Contrariamente un “alcohol relacionado” se refiere a un alcohol que incluye al menos un átomo de carbono. Las vías derivadas del ciclo de Calvin y las vías fotosintéticas aumentadas en NADPH se construyen con enzimas de diseño que se expresan por el uso de genes de diseño en organismos fotosintéticos huéspedes tales como algas y oxifotobacterias (incluyendo cianobacterias y oxiclorobacterias), organismos para la producción fotobiológica de butanol y alcoholes superiores relacionados. Los mencionados butanol y alcoholes relacionados son seleccionados del grupo consistente en: metanol, etanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol, isobutanol, 3-metil-1-butanol, 1-hexanol, 1-octanol, 1-pentanol, 1-heptanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, 5-metil-1-heptanol, 4-metil-1-pentanol, 5-metil-1-hexanol, y 6-metil-1-heptanol. Las plantas y células vegetales de diseño son creadas usando técnicas de ingeniería genética de manera tal que se puede controlar el mecanismo endógeno de regulación

de la fotosíntesis, y el poder reductor (NADPH) y la energía (ATP) adquiridos de la división del agua fotosintética y el gradiente de protones acoplado al proceso de transporte de electrones puede ser usado para la síntesis inmediata de alcoholes, tales como 1-butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) y 2-metil-1-butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$), a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) de acuerdo a la siguiente reacción de proceso (en donde, m , n , x e y son sus coeficientes molares) en concordancia de la presente invención:



Los métodos de producción fotobiológicos de alcoholes de la presente invención eliminan completamente el problema de la recalcitrancia lignocelulósica al evitar el problema del embotellamiento de la tecnología de biomasas. Como se muestra en la Fig. 1, por ejemplo, el proceso fotosintético en un organismo de diseño usa efectivamente el poder reductor (NADPH) y la energía (ATP) de la división del agua fotosintética y el gradiente de protones acoplado al proceso de transporte de electrones para la síntesis inmediata de butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) directamente a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) sin ser desviados a otras vías de síntesis de materiales lignocelulósicos no deseados los que son muy duros y usualmente muy ineficientes de usar para la industria de la biorefinería. Esta aproximación es muy distinta al proceso existente de “producción de butanol a partir de harina de maíz (maicena)”. De acuerdo con esta invención, el butanol puede ser producido directamente a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) sin tener que pasar por muchos de los pasos que consumen energía que el proceso de producción de butanol a partir de maicena si tiene que pasar, incluyendo el cultivo del maíz, cosecha de los granos de maíz, procesamiento de los granos de maíz a harina, y la fermentación harina-a-azúcar-a-butanol. Como resultado, se espera que la tecnología de producción de butanol fotosintética de la presente invención tenga una eficiencia mucho mayor (más de 10 veces) de conversión de energía solar a butanol que la tecnología actual. Asumiendo una eficiencia del 10% de conversión de energía solar para el proceso de producción fotosintético de butanol, la producción máxima teórica (ganancia) puede ser de alrededor de 72.000 kg de butanol por acre por año, lo que puede mantener alrededor de 70 autos (por año por acre). Por lo tanto, esta invención puede entregar

una significativa capacidad a la sociedad para ayudar a asegurar la seguridad de disponibilidad de energía. La presente invención puede también ayudar a proteger el medioambiente de la Tierra de la peligrosa acumulación de CO₂ en la atmósfera, ya que los presentes métodos convierten el CO₂ directamente en energía limpia de butanol.

Una característica fundamental de la presente metodología es utilizar una planta (p.ej. un alga o oxifotobacteria) o células vegetales, introduciendo a la planta o a las células vegetales moléculas de ácidos nucleicos que codifican para un conjunto de enzimas que pueden actuar en un producto intermediario del ciclo de Calvin y convertir el producto intermediario en butanol como se ilustra en la Figura 1, en lugar de producir almidón u otros materiales celulares complicados (biomasa) como son los productos finales en las vías fotosintéticas tipo silvestre. Concordantemente, la presente invención provee, *inter alia*, métodos para producir butanol y/o alcoholes relacionados basados en una planta de diseño (tal como un alga de diseño y una oxifotobacteria de diseño), un tejido vegetal de diseño, o una célula vegetal de diseño, constructos de ADN que codifican genes para una vía (o vías) de producción de butanol o de alcoholes superiores relacionados de diseño, así como también como las algas de diseño, oxifotobacterias de diseño (incluyendo cianobacterias de diseño), bacterias fermentativas de diseño, bacterias hidrogenotróficas de diseño, plantas de diseño, tejidos vegetales de diseño, y las plantas de diseño creadas. Los variados aspectos de la presente invención son descritos con mayor detalle a continuación.

Organismo Fotosintéticos Huéspedes

De acuerdo a la presente invención, un organismo o célula de diseño para la producción fotosintética de butanol y/o alcoholes superiores relacionados de la invención pueden ser creados utilizando como huésped cualquier planta (incluyendo alga y oxifotobacteria), tejido vegetal, o células vegetales que tengan una capacidad fotosintética, o sea, un aparato fotosintético activo y una vía enzimática que captura la energía lumínica a través de la fotosíntesis, usando esta energía para convertir sustancias inorgánicas en materia orgánica. Preferentemente, el organismo huésped debe poseer una tasa de fijación fotosintética de CO₂ adecuada, por ejemplo, para poder producir butanol fotosintético (y/o alcoholes superiores relacionados) a partir de CO₂ y H₂O al menos alrededor de 1.450 kg de butanol por acre por año, más

preferentemente, 7.270 kg de butanol por acre por año, o aún más preferentemente, 72.700 kg butanol por acre por año.

En una representación preferida, una planta acuática es utilizada para crear la planta de diseño. Las plantas acuáticas, también llamadas plantas higrófitas, son plantas que viven en un o sobre un ambiente acuático, tales como agua (incluyendo sobre o bajo la superficie del agua) o en un suelo permanentemente saturado de agua. Como se usa aquí, las plantas acuáticas incluyen, por ejemplo, algas, algas verde-azules (cianobacterias y oxiclrobacterias), hierbas acuáticas sumergidas (*Hydrilla verticillata*, *Elodea densa*, *Hippuris vulgaris*, *Aponogeton Boivinianus*, *Aponogeton Rigidifolius*, *Aponogeton Longiplumulosus*, *Didiplis Diandra*, *Vesicularia Dubyana*, *Hygrophilia Augustifolia*, *Micranthemum Umbrosum*, *Eichhornia Azurea*, *Saururus Cernuus*, *Cryptocoryne Lingua*, *Hydrotriche Hottoniiflora*, *Eustralis Stellata*, *Vallisneria Rubra*, *Hygrophila Salicifolia*, *Cyperus Helfer*, *Cryptocoryne Petchii*, *Vallisneria americana*, *Vallisneria Torta*, *Hydrotriche Hottoniiflora*, *Crassula Helmsii*, *Limnophila Sessiliflora*, *Potamogeton Perfoliatus*, *Rotala Wallichii*, *Cryptocoryne Becketii*, *Blyxa Aubertii*, *Hygrophila Difformmis*), lentejas de agua (*Spirode la polyrrhiza*, *Wolffia globosa*, *Lemna trisulca*, *Lemna gibba*, *Lemna minor*, *Landoltia punctata*), repollitos de agua (*Pistia stratiotes*), botones de oro (*Ranunculus*), castañas de agua (*Trapa natans* y *Trapa bicornis*), nenúfares (*Nymphaea lotus*, *Nymphaeaceae* y *Nelumbonaceae*), Jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*), *Bolbitis heudelotii*, *Cabomba* sp., pasto marino (*Heteranthera Zosterifolia*, *Posidoniaceae*, *Zosteraceae*, *Hydrocharitaceae*, y *Cymodoceaceae*). El butanol (y/o alcoholes superiores relacionados) producido por una planta acuática puede difundir en el agua, permitiendo el crecimiento normal de las plantas y una producción más robusta de butanol a partir de las plantas. Los cultivos líquidos de tejidos vegetales de plantas acuáticas (incluyendo, pero no limitado a, algas multicelulares) o las células (incluyendo, pero no limitado a, algas unicelulares) son también altamente preferidos de usar, ya que las moléculas de butanol (y/o alcoholes superiores relacionados) producidas por una vía (o más) de producción de butanol (y/o alcoholes superiores relacionados) de diseño pueden difundir rápidamente fuera de las células o tejidos hacia el medio líquido de agua, el que puede servir como un gran estanque para almacenar la producción de butanol (y/o alcoholes superiores

relacionados) que pueden ser subsecuentemente recolectados por técnicas de filtración y/o destilación/evaporación.

Aunque las plantas o células acuáticas son los organismos huéspedes preferidos para ser usados en los métodos de la presente invención, también se pueden usar tejidos y células de organismos no-acuáticos para crear tejidos o células para la producción fotosintética de butanol (y/o alcoholes superiores relacionados), siempre que sean fotosintéticos y que puedan ser cultivados en un medio líquido. Por ejemplo, los siguientes tejidos o células de plantas no-acuáticas pueden también ser seleccionados para su uso como organismo huésped en esta invención: cultivo de tejido de brotes fotoautotóxicos del árbol leñoso de la manzana *Feronia limonia*, los cultivos de callos clorofílicos de la planta del maíz *Zea mays*, los cultivos de raíces verdes de especies de Asteraceae y Solanaceae, los cultivos de tejido de parénquima del tallo de la caña de azúcar, el cultivo de tejido de la briofita *Physcomitrella patens*, los cultivos de células fotosintéticas en suspensión de la planta de la soya (*Glycine max*), el cultivo de células fotoautotróficas y fotomixotróficas de Tabaco verde (*Nicotiana tabacum L.*), el cultivo de células en suspensión de *Gisekia pharnaceoides* (una planta C₄), los cultivos de líneas fotosintéticas en suspensión de *Amaranthus powellii* Wats., *Datura innoxia* Mill., *Gossypium hirsutum L.*, y el híbrido de fusión *Nicotiana tabacum* x *Nicotiana glutinosa L.*

Por "medio líquido" se refiere a agua líquida más cantidades relativamente pequeñas de nutrientes inorgánicos (p.ej., N, P, K etc., comúnmente en forma de sales) para los cultivos fotoautotróficos; y a veces incluyendo también algunos sustratos orgánicos (p.ej., sacarosa, glucosa, o acetato) para cultivos fotomixotróficos y/o fotoheterotróficos. En una representación especialmente preferida, la planta utilizada en el método de producción de butanol (y/o alcoholes superiores relacionados) de la presente invención es un alga o un alga verde-azul. El uso de algas o algas verde-azules tiene una serie de ventajas. Estas pueden crecer en un charco abierto en grandes cantidades y a bajo costo. La recolección y purificación del butanol (y/o alcoholes superiores relacionados) de la fase acuosa es también fácilmente logrado por destilación/evaporación o por separación por membranas.

Algas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen tanto algas unicelulares como multicelulares. Las algas multicelulares que pueden ser

seleccionadas para su uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a, macroalgas tales como *Ulva latissima* (lechuga de mar), *Ascophyllum nodosum*, *Codium fragile*, *Fucus vesiculosus*, *Euclima denticulatum*, *Gracilaria gracilis*, *Hydrodictyon reticulatum*, *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida*, *Saccharina japonica*, *Porphyra yezoensis*, y *Porphyra tenera*. Algas adecuadas también pueden ser elegidas de las siguientes divisiones de algas: algas verdes (Chlorophyta), algas rojas (Rhodophyta), algas pardas (Phaeophyta), diatomeas (Bacillariophyta), y algas verde-azules (Oxifotobacterias incluyendo Cyanophyta y Prochlorophytes). Ordenes adecuados de algas verdes incluyen Ulvales, Ulotrichales, Volvocales, Chlorellales, Schizogoniales, Oedogoniales, Zygnematales, Cladophorales, Siphonales, y Dasycladales. Géneros adecuados de Rhodophyta son Porphyra, Chondrus, Cyanidioschyzon, Porphyridium, Gracilaria, Kappaphycus, Gelidium y Agardhiella. Géneros adecuados de Phaeophyta son Laminaria, Undaria, Macrocystis, Sargassum y Dictyosiphon. Géneros adecuados de Cyanophyta (también conocidos como Cianobacterias) incluyen (pero no se limitan a) Phoridium, Synechocystis, Synechococcus, Oscillatoria, y Anabaena. Géneros adecuados de Prochlorophytes (también conocidos como oxiclorobacterias) incluyen (pero no se limitan a) Prochloron, Prochlorothrix, y Prochlorococcus. Géneros adecuados de Bacillariophyta son Cyclotella, Cylindrotheca, Navicula, Thalassiosira, y Phaeodactylum. Las especies preferidas de algas para su uso en la presente invención incluyen *Chlamydomonas reinhardtii*, *Platymonas subcordiformis*, *Chlorella fusca*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, '*Chlorella*' *ellipsoidea*, *Chlorella* spp., *Dunaliella salina*, *Dunaliella viridis*, *Dunaliella bardowil*, *Haematococcus pluvialis*; *Parachlorella kessleri*, *Betaphycus gelatinum*, *Chondrus crispus*, *Cyanidioschyzon merolae*, *Cyanidium caldarium*, *Galdieria sulphuraria*, *Gelidiella acerosa*, *Gracilaria changii*, *Kappaphycus alvarezii*, *Porphyra miniata*, *Ostreococcus tauri*, *Porphyra yezoensis*, *Porphyridium* sp., *Palmaria palmata*, *Gracilaria* spp., *Isochrysis galbana*, *Kappaphycus* spp., *Laminaria japonica*, *Laminaria* spp., *Monostroma* spp., *Nannochloris bacillaris*, *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis oculata*, *Porphyra* spp., *Porphyridium* spp., *Undaria pinnatifida*, *Ulva lactuca*, *Ulva* spp., *Undaria* spp., *Phaeodactylum Tricornutum*, *Navicula saprophila*, *Cryptothecodinium cohnii*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Cyclotella cryptica*, *Euglena gracilis*, *Amphidinium* sp., *Symbiodinium microadriaticum*, *Macrocystis pyrifera*, *Ankistrodesmus braunii*, *Ankistrodesmus*

convolutus, *Ankistrodesmus falcatus*, *Ankistrodesmus stipitatus*, *Pavlova salina*, *Pavlova lutheri*, *Botryococcus braunii*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus rotundus*, *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus sp. Ki4*, *Scenedesmus sp. LU4*, *Scenedesmus quadricaudus*, y *Scenedesmus obliquus*.

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

La selección adecuada del organismo fotosintético huésped de acuerdo a sus antecedentes genéticos y a ciertas características especiales también será de gran beneficio. Por ejemplo, un alga de diseño fotosintética productora de butanol creada a partir de un alga criofílica (psychrophiles) la que puede crecer en la nieve y el hielo, y/o de cepas huéspedes tolerantes al frío tales como la cepa de frío CCMG1619 de *Chlamydomonas*, la que ha sido caracterizada como capaz de realizar la división fotosintética del agua incluso a 4°C (Lee, Blankinship y Greenbaum (1995),

"Temperature effect on production of hydrogen y oxygen by *Chlamydomonas* cold cepa CCMP1619 y wild type 137c," *Applied Biochemistry and Biotechnology* 51/52:379–386), permite la producción fotobiológica de butanol incluso durante las temporadas frías o en regiones tales como Canada. Al mismo tiempo, un alga de diseño creada a partir de un organismo fotosintético termofílico/termotolerante tales como las algas termofílicas *Cyanidium caldarium* y *Galdieria sulphuraria* y/o cianobacterias (algas verde-azules) termofílicas tales como *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 y *Synechococcus bigranulatus* pueden permitir que la práctica de esta invención sea bien extendida durante las temporadas de calor o en áreas tales como México y la región sudoeste de los Estados Unidos incluyendo Nevada, California, Arizona, Nuevo México y Texas, en donde el clima es a menudo muy caluroso. Además, un alga fotosintética productora de butanol de diseño creada de un alga marina, tal como *Platymonas subcordiformis*, permite la práctica de esta invención usando agua de mar, mientras que el alga de diseño creada de un alga de agua dulce tal como *Chlamydomonas reinhardtii* puede usar agua dulce. Otras opciones adicionales de un alga fotosintética de diseño productora de butanol (y/o alcoholes superiores relacionados) incluyen los beneficios de un tamaño reducido del complejo antena de clorofila, lo que ha demostrado aumentar la productividad fotosintética (Lee, Mets, y Greenbaum (2002). "Improvement of photosynthetic efficiency at high light intensity through reduction of chlorophyll antenna size," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98–100: 37-48) y la tolerancia al butanol (y/o alcoholes superiores relacionados) lo que permite una producción fotosintética más robusta y eficiente del (y/o alcoholes superiores relacionados) a partir de CO₂ y H₂O. Mediante el uso de un mutante deficiente en ficocianina de *Synechocystis* PCC 6714, se ha demostrado experimentalmente que la fotoinhibición puede ser reducida al reducir también el contenido de pigmentos recolectores de luz (Nakajima, Tsuzuki, y Ueda (1999) "Reduced photoinhibition of a phycocyanin-deficient mutant of *Synechocystis* PCC 6714", *Journal of Applied Phycology* 10: 447-452). Estas características opcionales pueden ser incorporadas a un alga de diseño, por ejemplo, mediante el uso de un mutante resistente al butanol o deficiente en clorofila-antena (p.ej., *Chlamydomonas reinhardtii* cepa DS521) como organismo huésped, para la transformación génica con los genes de vías de producción de butanol de diseño. Por lo tanto, en una de varias representaciones, el organismo huésped es seleccionado del

grupo consistente en plantas acuáticas, células vegetales, algas verdes, algas rojas, algas pardas, algas verde-azules (oxifotobacterias incluyendo cianobacterias y oxiclrobacterias), bacterias hidrogenotróficas, bacterias fermentativas, arqueas metanógenas, diatomeas, algas marinas, algas de agua dulce, algas unicelulares, algas multicelulares, pasto marino, cepas de algas tolerantes a la sal, cepas de algas tolerantes al frío, cepas de algas tolerantes al calor, mutantes deficientes en pigmentos antena, cepas de algas tolerantes al butanol, mutantes deficientes en pigmentos del complejo antena recolectables por luz, cepas de algas tolerantes al butanol, cepas de algas tolerantes a alcoholes superiores, oxifotobacterias tolerantes al butanol, bacterias hidrogenotróficas y arqueas metanógenas tolerantes al butanol, oxifotobacterias tolerantes a alcoholes superiores, bacterias hidrogenotróficas tolerantes al alcohol, bacterias fermentativas tolerantes al alcohol, algas tolerantes al biodiesel, cianobacterias tolerantes al biodiesel, bacterias fermentativas tolerantes al biodiesel, y bacterias hidrogenotróficas tolerantes al biodiesel, algas tolerantes al alcohol y al biodiesel, cianobacterias tolerantes al alcohol y al biodiesel, bacterias fermentativas tolerantes al alcohol y al biodiesel, bacterias hidrogenotróficas tolerantes al alcohol y al biodiesel, y arqueas metanógenas tolerantes al alcohol y al biodiesel, y combinaciones de estas.

Creando una Vía de Producción de Butanol de Diseño en un Huésped

Seleccionando enzimas de diseño apropiadas

Una de las características claves de la presente invención es la creación de una vía de producción de butanol de diseño para controlar y trabajar con los mecanismos fotosintéticos naturales para alcanzar una síntesis deseable de butanol directamente de CO_2 y H_2O . Los mecanismos fotosintéticos naturales incluyen (1) división del agua fotosintética y el gradiente de protones acoplado al proceso de transporte de electrones a través del sistema de la membrana tilacoidal, el que produce el poder reductor (NADPH) y la energía (ATP), y (2) el ciclo de Calvin que reduce CO_2 por el consumo del poder reductor (NADPH) y la energía (ATP).

De acuerdo a la presente invención, una serie de enzimas son usadas para crear una vía de producción de butanol de diseño que toma un producto intermediario del ciclo de Calvin y convierte este producto intermediario en butanol como se ilustra en la Figura 1.

Una “enzima de la vía de producción de butanol de diseño” es acá definida como una enzima como sirve como catalizador de al menos uno de los pasos de la vía de producción de butanol de diseño. De acuerdo a la presente invención, un número de productos intermediarios del ciclo de Calvin pueden ser utilizados para crear una o más vías de producción de butanol de diseño; las enzimas requeridas para una vía de producción de butanol de diseño son seleccionadas dependiendo de cuál producto intermediario del ciclo de Calvin se desprende la vía de producción de butanol de diseño en el ciclo de Calvin.

En un ejemplo, una vía de diseño creada toma gliceraldehídos-3-fosfato y los convierte en butanol usando, por ejemplo, un conjunto de enzimas consistentes en, como se muestra con las etiquetas numéricas **01-12** en La Figura 1, gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa **01**, fosfogliceratoquinasa **02**, fosfogliceratomutasa **03**, enolasa **04**, piruvatoquinasa **05**, piruvato-ferredoxina oxidoreductasa **06**, tiolasa (o acetil-CoA acetiltransferasa) **07**, 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa **08**, crotonasa **09**, butiril-CoA deshidrogenasa (o trans-enoil-CoA reductasa) **10**, butiraldehído deshidrogenasa (o aldehído/alcohol deshidrogenasa (AdhE2)) **11**, y butanol deshidrogenasa **12**. En esta vía de diseño derivada de gliceraldehídos-3-fosfato, para la conversión de dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato a butanol, dos moléculas de NADH son generadas a partir de NAD⁺ en el paso de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-difosfoglicerato catalizado por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa **01**; a su vez dos moléculas de NADH son convertidas a NAD⁺: uno en el paso catalizado por la 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa **08** al reducir acetoacetil-CoA a 3-hidroxibutiril-CoA y otra en el paso catalizado por la butiril-CoA deshidrogenasa **10** al reducir crotonil-CoA a butiril-CoA. Consecuentemente, en esta vía de diseño derivada de gliceraldehídos-3-fosfato (**01-12**), el número de moléculas de NADH consumidas es balanceado con el número de moléculas de NADH generadas. Aún más, tanto el paso de la vía catalizado por la butiraldehíododeshidrogenasa **11** (para reducir butiril-CoA a butiraldehído) y el paso terminal catalizado por la butanol deshidrogenasa **12** (para reducir butiraldehído a butanol) pueden usar NADPH, el que puede ser generado por división del agua fotosintética y el gradiente de protones acoplado al proceso de transporte de electrones. Por lo tanto, esta vía de producción de butanol de diseño derivada de gliceraldehídos-3-fosfato puede operar continuamente.

En otro ejemplo una vía de diseño creada toma el producto intermediario, 3-fosfoglicerato, y lo convierte en butanol usando, por ejemplo, un conjunto de enzimas consistente en (como se muestra con las etiquetas numéricas **03-12** en la Figura 1) fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvatoquinasa **05**, piruvato-ferredoxina oxidoreductasa **06**, tiolase (o acetil-CoA acetiltransferasa) **07**, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa **08**, crotonasa **09**, butiril-CoA deshidrogenasa (o trans-enoil-CoA reductasa) **10**, butirilaldehído deshidrogenasa (o aldehído/alcohol deshidrogenasa (AdhE2)) **11**, y butanol deshidrogenasa **12**. Vale la pena notar que las últimas diez enzimas (**03-12**) de la vía de producción de butanol de diseño derivada de gliceraldehídos-3-fosfato (**01-12**) son idénticas de aquellas utilizadas en la vía de diseño derivada de 3-fosfoglicerato (**03-12**). En otras palabras, las enzimas de diseño (**01-12**) de la vía de producción de diseño derivada de gliceraldehídos-3-fosfato permiten la producción de butanol desde tanto el punto de 3-fosfoglicerato como del punto de gliceraldehído-3-fosfato en el ciclo de Calvin. Estas dos vías, sin embargo, tienen características distintas. A diferencia de la vía de producción de butanol derivada de gliceraldehído-3-fosfato, la vía derivada de 3-fosfoglicerato que consiste en las actividades de solo diez enzimas (**03-12**) no puede generar por sí misma ningún NADH que es requerido para su uso en dos partes: uno en el paso catalizado por la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa **08** para reducir acetoacil-CoA a 3-hidroxiacil-CoA, y el otro es el paso catalizado por la butiril-CoA deshidrogenasa **10** para reducir crotonil-CoA a butiril-CoA. Esto es, si (o cuando) una 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y/o una butiril-CoA deshidrogenasa que puede usar estrictamente solo NADH pero no NADPH es empleada, requerirá una fuente de suministro de NADH de la vía derivada de 3-fosfoglicerato (**03-12**) para operar. Consecuentemente, en orden para que la vía de producción de butanol derivada de 3-fosfoglicerato pueda operar, es importante usar una 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa **08** y una butiril-CoA deshidrogenasa **10** que puede usar NADPH el que puede ser suministrado por el proceso de transporte de electrones foto-dependiente. Por lo tanto, es una práctica preferida usar una 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y una butiril-CoA deshidrogenasa que puede usar NADPH o tanto NADPH como NADH (o sea, NAD(P)H) para la vía de producción de butanol de diseño derivada de 3-fosfoglicerato (**03-12** en Figura 1). Alternativamente, cuando una 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa

y una butiril-CoA deshidrogenasa que solo pueden usar NADH son empleadas, es preferible aquí usar una representación adicional que puede conferir un mecanismo de conversión NADPH/NADH (para suministrar NADH al convertir NADPH a NADH, ver más detalles luego en el texto) en el organismo de diseño para facilitar la producción fotosintética de butanol a través de la vía de diseño derivada de 3-fosfoglicerato.

En otro ejemplo, una vía de diseño creada toma fructosa-1,6-difosfato y la convierte en butanol usando, como se muestra con las etiquetas numéricas **20-33** en Figura 1, un conjunto de enzimas consistentes en aldolasa **20**, triosafosfato isomerasa **21**, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa **22**, fosfogliceratoquinasa **23**, fosfogliceratomutasa **24**, enolasa **25**, piruvatoquinasa **26**, piruvato-NADP⁺ oxidoreductasa (o piruvato-ferredoxina oxidoreductasa) **27**, tiolasa **28**, 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa **29**, crotonasa **30**, butiril-CoA deshidrogenasa **31**, butirilaldehído deshidrogenasa **32**, y butanol deshidrogenasa **33**, con aldolasa **20** y triosafosfato isomerasa **21** siendo las únicas dos enzimas adicionales relativas a la vía de producción de diseño derivada de gliceraldehídos-3-fosfato. El uso de la piruvato-NADP⁺ oxidoreductasa **27** (en lugar de la piruvato-ferredoxina oxidoreductasa) en catalizar la conversión de una molécula de piruvato a Acetil-CoA permite la producción de un NADPH, el que puede ser usado en algunos otros pasos de la vía de producción de butanol. La adición de otra enzima más en el organismo de diseño, la fosfofructosa quinasa **19**, permite la creación de otra vía de diseño que se deriva del punto de la fructosa-6-fosfato en el ciclo de Calvin para la producción de butanol. Similar a la vía de producción de butanol derivada de gliceraldehído-3-fosfato, tanto la vía derivada de fructosa-1,6-difosfato (**20-33**) y la vía derivada de fructosa-6-fosfato (**19-33**) pueden generar por ellas mismas NADH para su uso en la vía en el paso catalizado por la 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa **29** para reducir acetoacetil-CoA a 3-hidroxibutiril-CoA y en el paso catalizado por la butiril-CoA deshidrogenasa **31** para reducir crotonil-CoA a butiril-CoA. En cada una de estas vías de producción de butanol de diseño, los números de las moléculas de NADH consumidas están balanceados con los números de las moléculas de NADH generadas; y tanto la butirilaldehído deshidrogenasa **32** (que cataliza el paso de reducir butiril-CoA a butirilaldehído) como la alcohol deshidrogenasa **33** (que cataliza el paso terminal de reducir butirilaldehído a butanol) pueden usar NADPH, el que puede ser regenerado por la división fotosintética del agua

y el gradiente de protones acoplado al proceso de transporte de electrones. Por lo tanto, estas vías de producción de butanol de diseño pueden operar continuamente.

La Tabla 1 muestra ejemplos de las enzimas incluyendo aquellas identificadas más arriba para la construcción de vías de producción de butanol de diseño. A lo largo de esta especificación, cuando una enzima es referenciada, tal como, por ejemplo, cualquiera de las enzimas que aparecen en la Tabla 1, incluye sus isoenzimas, análogos funcionales, y enzimas modificadas de diseño y combinaciones de estas. Estas enzimas pueden ser seleccionadas para su uso en la construcción de las vías de producción de butanol de diseño (tales como las ilustradas en la Figura 1). Las “isoenzimas o análogos funcionales” se refiere a ciertas enzimas que tienen la misma función catalítica pero pueden o no pueden tener exactamente la misma estructura proteica. La característica más esencial de una enzima es su sitio activo que cataliza la reacción enzimática. Por lo tanto, algún fragmento(s) proteico(s) de las enzimas o subunidad(es) que contienen dichos sitios activos catalíticos pueden ser también seleccionados para su uso en esta invención. Por varias razones, algunas de las enzimas naturales contienen no solo la estructura catalítica esencial pero también algunos otros componentes estructurales que pueden no ser deseables para una aplicación determinada. Con técnicas de diseño asistidas por bioinformática, es posible seleccionar la estructura (o las estructuras) catalítica esencial para su uso en la construcción de un constructo de ADN de diseño que codifica para una enzima de diseño deseada. Por lo tanto, en una de varias representaciones, un gen para una enzima de diseño es creada por la síntesis artificial de un constructo de ADN de acuerdo al diseño de la secuencia molecular asistido por bioinformática. Con la aproximación asistida por computación de biología sintética, cualquier secuencia de ADN (o sea de la estructura de la proteína) una enzima de diseño puede ser modificada selectivamente para lograr resultados más deseables por diseño. Por lo tanto, los términos “secuencias modificadas de diseño” y “enzimas modificadas de diseño” son aquí definidas como las secuencias de ADN y las enzimas proteicas que son modificadas con diseño molecular asistido por bioinformática. Por ejemplo, cuando un constructo de ADN para una enzima destinada al cloroplasto es diseñada a partir de la la secuencia de una enzima mitocondrial, es una práctica preferida el modificar algunas de las estructuras proteicas, por ejemplo, cortando selectivamente algún componente

(o componentes) tales como la secuencia del péptido de tránsito mitocondrial que nos es necesario para esta aplicación, y/o agregando algunas secuencias de estructuras de péptidos tales como la secuencia del péptido de tránsito de cloroplastos (p.ej. un péptido de 135 pb de la subunidad pequeña del péptido de tránsito de Rubisco (RbcS2)) que es necesario para conferir la habilidad en la inserción destinada a cloroplasto en la proteína de diseño. Por lo tanto, una de varias representaciones emplea flexiblemente las enzimas, sus isoenzimas, análogos funcionales, enzimas modificadas de diseño, y/o las combinaciones de estas en la construcción de una vía (o vías) de producción de butanol de diseño.

Como se muestra en la Tabla 1, muchos de los genes para las enzimas identificadas han sido clonados y/o secuenciados desde varios organismos. Los datos de secuencias del ADN genómico y/o del ARNm pueden ser usados para diseñar y sintetizar los constructos de ADN de diseño para la transformación de un huésped que puede ser un alga, oxifotobacteria, planta, tejido o células vegetales, para crear un organismo de diseño para la producción fotobiológica de butanol (Figura 1). Sin embargo, debido a las posibles variaciones a menudo asociadas con organismos de varias fuentes y compartimientos celulares con respecto al organismo huésped específico y su ambiente cloroplasto/tilacoide en donde operará la vía (o vías) de producción de butanol de diseño en conjunto con el ciclo de Calvin, ciertos aspectos del arte de la ingeniería molecular en el diseño del constructo de ADN que incluyen la optimización del uso de codones y la modificación de secuencias son a menudo necesarios para que un constructo de ADN de diseño (Figura 2) funcione bien. Por ejemplo, al crear un alga eucariota productora de butanol de diseño, si las secuencias provienen de enzimas (secuencias) citosólicas, una secuencia funcional para destinación a cloroplasto puede ser agregada para conferir la capacidad a un gen para una enzima que no está destinada normalmente al cloroplasto, que se inserte en el cloroplasto huésped para conferir la función de la vía de producción de butanol de diseño. Aún más, para conferir conmutabilidad a una vía de producción de butanol de diseño, es también importante incluir una secuencia de un promotor funcional inducible tal como el gen del promotor de una hidrogenasa (Hyd1) o una nitrato reductasa (Nia1), o una nitrito reductasa (nirA) en alguno(s) de los constructos de ADN de diseño ilustrados en la Fig. 2A para controlar la expresión del gen(o genes) de diseño.

Adicionalmente, como se mencionó antes, algunos derivados o fragmentos funcionales de estas enzimas (secuencias), secuencias de péptidos de tránsito de destinación al cloroplasto, y secuencias inducibles de promotores pueden ser también seleccionadas para su uso total, en parte, o en combinaciones de estas, para crear organismos de diseño de acuerdo a varias representaciones de esta invención. El arte para la creación y uso de los organismos de diseño son descrito en detalle a continuación.

Destinando las enzimas de diseño a la región del estroma de cloroplastos

Algunas de las enzimas de diseño discutidas anteriormente, tales como, piruvato-ferredoxina oxidoreductasa, tiolasa, 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa, butiraldehídodeshidrogenasa, y butanol deshidrogenasa son conocidas por funcionar en algunas bacterias especiales tales como *Clostridium*; pero los cloroplastos de plantas tipo silvestre generalmente no poseen estas enzimas para funcionar en el ciclo de Calvin. Por lo tanto, en una de varias representaciones para crear un organismo eucariota de diseño productor butanol, se expresan ácidos nucleicos de diseño que codifican para estas enzimas en el (o los) cloroplasto de la células huésped. Esto se puede lograr con la entrega de uno o más genes para la vía de producción de butanol de diseño en el genoma del cloroplasto en la célula eucariota huésped, típicamente usando técnicas de biolística (cañón génico). Hasta cierto punto, la genética molecular del cloroplasto es similar a la de las cianobacterias. Después de ser enviado al cloroplasto, un constructo de ADN de diseño que contiene un par de sitios adecuados de recombinación como se ilustra en la Figura 2F puede ser incorporado en el genoma del cloroplasto a través de un proceso natural de recombinación homóloga doble de ADN.

En otra representación, los ácidos nucleicos que codifican para estas enzimas están genéticamente modificados de manera tal que las enzimas expresadas son insertadas en los cloroplastos para operar dentro del ciclo de Calvin en ellos. Dependiendo de los antecedentes genéticos de un organismo huésped particular, algunas de las enzimas de diseño discutidas anteriormente tales como la fosfoglicerato mutasa y enolasa pueden existir en algún nivel en su forma nativa en un cloroplasto tipo silvestre. Por varias razones, incluyendo a menudo la falta de control, sin embargo, algunas de las enzimas presentes en el cloroplasto pueden o no pueden ser suficientes para servir como parte significativa de la vía (o las vías) de producción de butanol de diseño. Aún

más, un número de promotores inducibles útiles funcionan en el genoma nuclear. Por ejemplo, tanto el promotor de la hidrogenasa (Hyd1) como el promotor de la nitrato reductasa (Nia1) pueden ser usados para controlar la expresión de vías de producción de butanol de diseño localizadas en el genoma nuclear de *Chlamydomonas reinhardtii*, de la cual su genoma ha sido recientemente secuenciado. Por lo tanto, en una de varias representaciones, es preferible usar genes de diseño de codificación en el genoma nuclear para conferir una vía de producción de butanol conmutable. Consecuentemente, los ácidos nucleicos que codifican para estas enzimas también necesitan ser modificados genéticamente con una modificación de secuencia adecuada de manera tal que las enzimas se expresen de manera controlada y sean insertadas en los cloroplastos para crear una vía de producción de butanol de diseño.

De acuerdo a una de varias representaciones, es mejor expresar las enzimas para la vía de producción de butanol de diseño sólo en los cloroplastos (en la región del estroma), exactamente donde la acción de las enzimas se necesita para permitir la producción fotosintética de butanol. Si se expresan sin un mecanismo de inserción para destinación a cloroplasto, las enzimas se mantendrán en el citosol y no serán capaces de interactuar directamente con el ciclo de Calvin para la producción de butanol. Por lo tanto, en adición a las características obviamente distintivas en el diseño de las vías y aproximaciones asociadas, otra distinción significativa es aquella de varias representaciones que innovativamente emplean mecanismos de destinación al cloroplasto para la inserción genética de varias enzimas de las vías de producción de butanol de diseño en los cloroplastos para interactuar directamente con el ciclo de Calvin para la producción fotobiológica de butanol.

Con un mecanismo de destinación al estroma del cloroplasto, las células no solo serán capaces de producir butanol pero también serán capaces de crecer y regenerarse a sí mismas cuando son retornadas a ciertas condiciones bajo las cuales la vía de diseño se apaga, tal como bajo condiciones aeróbicas cuando se usan los genes promotores de hidrogenasa en la vía de producción de butanol. Algas, plantas, o células vegetales de diseño que contienen mitocondrias normales deben ser capaces de usar el poder reductor (NADH) de las reservas orgánicas (y/o algunos sustratos orgánicos exógenos tales como acetato o azúcares) para brindarle energía a las células inmediatamente después de retornar a las condiciones aeróbicas. Consecuentemente, cuando las

algas, plantas, o células vegetales de diseño son retornadas a condiciones aeróbicas luego de ser usadas bajo condiciones anaeróbicas para la producción fotosintética de butanol, las células detendrán la producción de enzimas de las vías de producción de butanol y empezarán a reponer la capacidad fotoautotrófica normal sintetizando nuevos cloroplastos funcionales. Por lo tanto, es posible usar organismo vegetales o plantas genéticamente modificadas para tener ciclos repetidos de crecimiento fotoautotrófico bajo condiciones aeróbicas normales y una producción eficiente de butanol directamente de CO₂ y H₂O bajo determinadas condiciones específicas de producción de butanol de diseño tales como bajo condiciones anaeróbicas y/o en la presencia de nitrato cuando el promotor Nia1 que controla la producción de butanol es usado.

La inserción dirigida de enzimas para vías de producción de butanol de diseño puede ser lograda mediante el uso de una secuencia de ADN que codifica para un péptido señal para estroma. Un péptido señal (tránsito) para proteínas de estroma dirige el transporte y la inserción de una proteína sintetizada *de novo* en el estroma. De acuerdo a una de las varias representaciones, una secuencia específica de destinación de ADNes colocada preferentemente entre la secuencia del promotor y de la enzima de la vía de producción de butanol de diseño, como se muestra en el constructo de ADN de diseño (Figura 2A). Esta secuencia de destinación codifica para un péptido señal (tránsito) que es sintetizado como parte de la apoproteína de una enzima en el citosol. El péptido señal guía la inserción de una apoproteína de una enzima de vía de producción de diseño desde el citosol hacia el cloroplasto. Luego que la apoproteína es insertada en el cloroplasto, el péptido señal es escindido de la apoproteína, en donde se convierte en una enzima activa.

Un número de secuencias de péptido señal son adecuadas para su uso en la inserción destinada de las enzimas de la vía de producción de butanol de diseño en el cloroplasto, incluyendo pero no limitado a las secuencias de péptido señal de: las apoproteínas de hidrogenasas (tales como HydA1 (Hyd1) y HydA2, número de acceso GenBank AJ308413, AF289201, AY090770), apoproteína de la ferredoxina (Frax1, números de acceso L10349, P07839), apoproteína de la tioredoxina m (Trx2, X62335), apoproteína de la glutamina sintetasa (Gs2, Q42689), apoproteínas Lhcll (AB051210, AB051208, AB051205), apoproteína de PSII-T (PsbT), apoproteína de PSII-S (PsbS), apoproteína de PSII-W (PsbW), subunidad- α de apoproteína de CF₀CF₁ (AtpC),

subunidad- α de apoproteína de CF_0CF_1 (AtpD, U41442), subunidad-II de apoproteína de CF o CF_1 (AtpG), apoproteínas de fotosistema I (PSI) (tales como las de los genes PsaD, PsaE, PsaF, PsaG, PsaH, y PsaK), apoproteínas de Rubisco SSU (tales como RbcS2, X04472). A lo largo de esta especificación, cuando se hace referencia a una secuencia de un péptido señal, tal como, por ejemplo, cualquiera de los péptidos señal descritos anteriormente, esta incluye sus análogos funcionales, secuencias de diseño modificadas, y combinaciones de estas. Un "análogo funcional" o "secuencia de diseño modificada" en este contexto se refiere a un péptido derivado o modificado (mediante p.ej., sustitución conservativa, delección moderada, o adición de aminoácidos, o modificación de las cadenas laterales aminoacídicas) basado en la secuencia nativa del péptido señal, tales como las identificadas más arriba, que tienen la misma función que el péptido señal nativo o sea, destinar de manera efectiva la inserción de una enzima deseada.

En ciertas representaciones específicas, las siguientes secuencias de péptido señal son usadas para guiar la inserción de las enzimas de las vías de producción de butanol de diseño en la región del estroma del cloroplasto: péptido señal de Hyd1 (que tiene la secuencia aminoacídica: MSALVLKPCA AVSIRGSSCR ARQVAPRAPL AASTVRVALA TLEAPARRLG NVACAA (SEQ ID NO: 54)), péptido señal de RbcS2 (que tiene la secuencia aminoacídica: MAAVIAKSSV SAAVARPARS SVRPMAALKP AVKAAPVAAP AQANQ (SEQ ID NO: 55)), péptido señal de ferredoxina (que tiene la secuencia aminoacídica: MAMAMRS (SEQ ID NO: 56)), péptido señal de la subunidad- δ de CF_0CF_1 (que tiene la secuencia aminoacídica: MLaAKSIAGP RAFKASAVRA APKAGRRTVV VMA (SEQ ID NO: 57)), sus análogos, derivados funcionales, secuencias de diseño y combinaciones de estas.

Uso de un interruptor genético para controlar la expresión de una vía de producción de butanol de diseño

Otro aspecto clave de la invención es la aplicación de un interruptor genético para controlar la expresión de la vía (o las vías) de producción de butanol de diseño, como se ilustra en la Figura 1. Esta conmutabilidad se logra a través del uso de un promotor externamente inducible e manera tal que los transgenes de diseño son expresados de manera inducible bajo ciertas condiciones específicas de inducción. Preferentemente,

el promotor empleado para controlar la expresión de los genes de diseño en su huésped es originado a partir del mismo huésped o de un organismo estrechamente relacionado. La actividad y la capacidad de ser inducido de un promotor en una célula huésped puede ser probado colocando el promotor frente a un gen reportero, introduciendo este constructo reportero en el tejido o células huésped por cualquiera de las técnicas conocidas de entrega de ADN, y midiendo la expresión del gen reportero.

En una representación preferida, el promotor inducible usado para controlar la expresión de los genes de diseño es un promotor que es inducible por anaerobiosis, o sea, activo bajo condiciones anaeróbicas pero inactivo bajo condiciones aeróbicas. Una planta/alga de diseño puede realizar fotosíntesis autotrófica usando CO₂ como la fuente de carbono bajo condiciones aeróbicas, y cuando el cultivo del organismo de diseño crece y está listo para la producción fotosintética de butanol, se aplicarán condiciones anaeróbicas para activar el promotor y los genes de diseño que codifican para una vía (o vías) de producción de butanol de diseño.

Un número de promotores que se vuelven activos bajo condiciones anaeróbicas son adecuados para su uso en la presente invención. Por ejemplo, los promotores de genes de hidrogenasa (HydA1 (Hyd1) y HydA2, número de acceso GenBank: AJ308413, AF289201, AY090770) de *Chlamydomonas reinhardtii*, activos bajo condiciones anaeróbicas pero inactivos bajo condiciones aeróbicas, pueden ser usados como un interruptor genético efectivo para controlar la expresión de los genes de diseño en el alga huésped, tal como *Chlamydomonas reinhardtii*. De hecho, las células de *Chlamydomonas* contienen varios genes nucleares que son inducidos coordinadamente bajo condiciones anaeróbicas. Estos incluyen el mismo gen estructural de la hidrogenasa (Hyd1), el gen Cyc6 que codifica para la apoproteína del Citocromo C₆, y el gen Cpx1 que codifica para la coprógeno oxidase. Las regiones regulatorias de las últimas dos han sido bien caracterizadas, y una región de alrededor de 100 pb ha probado ser suficiente para conferir la regulación por anaerobiosis en constructos de genes sintéticos (Quinn, Barraco, Ericksson y Merchant (2000). "Coordinate copper- and oxygen-responsive Cyc6 and Cpx1 expression in *Chlamydomonas* is mediated by the same element." *J Biol Chem* 275: 6080-6089). Aunque los promotores inducibles de algas mencionados recién pueden ser adecuados para su uso en otras plantas huéspedes, especialmente en plantas estrechamente

relacionadas con algas, los promotores de los genes homólogos de estas otras plantas, pueden ser obtenidos y usados para controlar la expresión de los genes de diseño en estas plantas.

En otra representación, el promotor inducible usado en la presente invención es un promotor de la nitrato reductasa (Nia1) de algas, la que es inducible por crecimiento en un medio que contiene nitrato y está reprimida en un medio deficiente en nitrato pero que contiene amonio (Loppes y Radoux (2002) "Two short regions of the promoter are essential for activation and repression of the nitrate reductasa gene in *Chlamydomonas reinhardtii*," *Mol Genet Genomics* 268: 42–48). Por lo tanto, el promotor de Nia1 (número de acceso del gen: AF203033) puede ser seleccionado para usar en controlar la expresión de los genes de diseño en un alga de acuerdo a los niveles de concentración de nitrato y amonio en el medio de cultivo. Promotores inducibles adicionales pueden ser también seleccionados para su uso en la presente invención los que incluyen, por ejemplo, el promotor de la proteína de choque térmico HSP70A (número de acceso: DQ059999, AY456093, M98823; Schroda, Blocker, Beek (2000) The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *Plant Journal* 21:121–131), el promotor del gen de CabII-1 (número de acceso M24072), el promotor del gen de Ca1 (número de acceso P20507), y el promotor del gen de Ca2 (número de acceso P24258).

En el caso de las algas verde-azules (oxifotobacterias incluyendocianobacterias y oxiclوروبacterias), existe también un número de promotores inducibles que pueden ser seleccionados para su uso en la presente invención. Por ejemplo, los promotores de los genes *hox* de respuesta anaeróbica bidireccional de la hidrogenasa de *Nostoc* sp. PCC 7120 (GenBank: BA000019), *Prochlorothrix hollandica* (GenBank: U88400; promotor del operón *hoxUYH*), *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803 (CyanoBase: sll1220 y sll1223), *Synechococcus elongatus* PCC 6301 (CyanoBase: syc1235_c), *Arthrospira platensis* (GenBank: ABC26906), *Cyanothece* sp. CCY0110 (GenBank: ZP_01727419) y *Synechococcus* sp. PCC 7002 (GenBank: AAN03566), los que son activos bajo condiciones anaeróbicas pero inactivos bajo condiciones aeróbicas (Sjoholm, Oliveira, y Lindblad (2007) "Transcription and regulation of the bidirectional hidrogenasa in the Cyanobacterium *Nostoc* sp. cepa PCC 7120," *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17): 5435–5446), pueden ser usados como un interruptor genético efectivo para

controlar la expresión de los genes de diseño en una xifotobacteria huésped, tal como *Nostoc* sp. PCC 7120, *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803, *Synechococcus elongatus* PCC 6301, *Cyanothece* sp. CCY0110, *Arthrospira platensis*, o *Synechococcus* sp. PCC 7002.

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

Synechococcus sp. WH 7805 (GenBank: ZP_01124915), y *Cyanothece* sp. CCY0110 (GenBank:ZP_01727861).

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

Promotores inducible adicionales pueden ser también seleccionados para su uso en la presente invención e incluyen: por ejemplo el promotor inducible por metal (zinc) *smt* de *Synechococcus* PCC 7942 (Erbe, Adams, Taylor y Hall (1996) "Cyanobacteria carrying an *smt-lux* transcriptional fusion as biosensors for the detection of heavy metal cations," *Journal of Industrial Microbiology*, 17:80-83); el promotor inducible por hierro *idiA* de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Michel, Pistorius, y Golden (2001) "Unusual regulatory elements for iron deficiency induction of the *idiA* gene of

Synechococcus elongatus PCC 7942” *Journal of Bacteriology*, 183(17):5015–5024); el promotor sensible a cambios redox cianobacterial *crhR* promoter (Patterson-Fortin, Colvin y Owttrim (2006) “A LexA-related protein regulates redox-sensitive expression of the cyanobacterial RNA helicase, *crhR*”, *Nucleic Acids Research*, 34(12):3446–3454); el promotor del gen sensible a choque térmico *hsp16.6* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Fang and Barnum (2004) “Expression of the heat shock gene *hsp16.6* and promoter analysis in the Cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803,” *Current Microbiology* 49:192–198); el promotor de la proteína pequeña de choque térmico (Hsp) tal como el promotor del gen *hspA* de *Synechococcus vulcanus* (Nakamoto, Suzuki, y Roy (2000) “Constitutive expression of a small heat-shock protein confers cellular thermotolerance and thermal protection to the photosynthetic apparatus in cyanobacteria,” *FEBS Letters* 483:169-174); los promotores sensibles a CO₂ para los genes de la anhidrasa carbónica de oxifotobacterias (GenBank: EAZ90903, EAZ90685, ZP_01624337, EAW33650, ABB17341, AAT41924, CAO89711, ZP_00111671, YP_400464, AAC44830; y CyanoBase: all2929, PMT1568 slr0051, slr1347, y syc0167_c); los promotores del gen de la nitrato reductasa (*narB*)(tales como números de acceso de GenBank: BAC08907, NP_682145, AAO25121; ABI46326, YP_732075, BAB72570, NP_484656); los promotores sensibles a luz verde/roja tales como el promotor regulado por luz *cpcB2A2* de *Fremyella diplosiphon* (Casey y Grossman (1994) “In vivo and in vitro characterization of the light-regulated *cpcB2A2* promoter of *Fremyella diplosiphon*” *Journal of Bacteriology*, 176(20):6362-6374); y los promotores sensibles a luz UV de los genes cianobacteriales *lexA*, *recA* y *ruvB* (Domain, Houot, Chauvat, y Cassier-Chauvat (2004) “Function and regulation of the cyanobacterial genes *lexA*, *recA* and *ruvB*: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation” *Molecular Microbiology*, 53(1):65–80).

Aún más, en una de varias representaciones, algunos promotores "semi-inducibles" o constitutivos pueden ser también seleccionados para su uso en combinación con un (o más) promotor inducible para la construcción de vías de producción de butanol de diseño. Por ejemplo, los promotores del operón de la Rubisco oxifotobacterial tales como los genes *rbcL*(GenBank: X65960, ZP_01728542, Q3M674, BAF48766, NP_895035, 0907262A; CyanoBase: PMT1205, PMM0550, Pro0551, tll1506, SYNW1718, glr2156, alr1524, slr0009), que tienen cierta dependencia a la luz pero

pueden ser considerados casi como promotores constitutivos, pueden ser también seleccionados para su uso en combinación con un promotor (o más) inducible tales como los promotores *nirA*, *hox*, y/o *groE* para la construcción de vías de producción de butanol de diseño.

A lo largo de esta especificación, cuando se hace una referencia al promotor inducible, tal como, por ejemplo, cualquiera de los promotores inducibles descritos más arriba, esta incluye sus análogos, derivados funcionales, secuencias de diseño y combinaciones de estas. Un "análogo funcional" o una "secuencia de diseño modificada" en este contexto se refiere a una secuencia promotora derivada o modificada (mediante p.ej., sustitución, delección moderada o adición o modificación de nucleótidos) basado en una secuencia promotora nativa, tales como aquellas identificadas en este documento, que retienen la función de la secuencia promotora nativa.

Constructos de ADN y transformación en el organismo huésped

Los constructos de ADN son generados en orden de introducir genes para vías de producción de butanol de diseño en un huésped que puede ser un alga, tejido vegetal o células vegetales. Esto es, la secuencia nucleotídica que codifica para una enzima de las vías de producción de butanol de diseño es colocada en un vector, de manera que pueda estar unida operacionalmente por un promotor, preferentemente un promotor inducible, y unida operacionalmente a una secuencia nucleotídica que codifique para una secuencia apropiada de un péptido señal para destinación a cloroplasto. En una representación preferida, los constructos de ácidos nucleicos se hacen incluyendo los siguientes elementos colocados en la siguiente orientación 5' (río arriba) to 3' (río abajo): un promotor externamente inducible, una secuencia de péptido señal, un ácido nucleico que codifica para una enzima de las vías de producción de butanol de diseño, y preferentemente una secuencia apropiada de término de transcripción. Uno o más genes de diseño (constructos de ADN) pueden ser colocados en un vector genético. Un ejemplo de estos constructos se muestra en la Figura 2A. Como se muestra en la representación ilustrada en la Figura 2A, un transgen para una vía de producción de butanol de diseño es un constructo de ácidos nucleicos que incluye: a) un partidor hacia adelante para PCR; b) un promotor externamente

inducible; c) una secuencia de péptido señal; d) una secuencia que codifique para una enzima de las vías de producción de butanol de diseño con una secuencia de terminación de la transcripción adecuada; y e) un partidor reverso para PCR.

De acuerdo a varias representaciones, cualquiera de los componentes a) hasta e) de este constructo de ADN son ajustados para encajar para algunas condiciones específicas. En la práctica, cualquiera de los componentes a) hasta e) de este constructo de ADN son aplicados completamente o en parte, y/o en cualquier combinación ajustada para lograr los resultados esperados. Por ejemplo, cuando el promotor de una hidrogenasa de alga es usado como un promotor inducible en el constructo de ADN para la vía de producción de butanol de diseño, un alga transgénica de diseño que contenga este constructo de ADN será capaz de realizar fotosíntesis autotrófica usando el CO₂ del aire ambiental como la fuente de carbono y crecerá normalmente bajo condiciones aeróbicas, tales como en un charco abierto. Cuando el cultivo de algas crece y está listo para la producción de butanol, los transgenes de diseño pueden ser expresados por inducción bajo condiciones anaeróbicas gracias al uso del promotor de la hidrogenasa. La expresión de genes de diseño se traduce en un conjunto de enzimas de la vía de producción de butanol de diseño que trabajan con el ciclo de Calvin para la producción fotobiológica de butanol (Figura 1).

Los dos partidores para PCR son un partidor hacia de lante de PCR (en inglés, PCR FD primer) localizado al principio (el extremo 5') del constructo de ADN y un partidorreverso de PCR (en inglés, PCR RE primer) localizado al otro extremo (el extremo 3') como se muestra en la Fig. 2A. Este par de partidores para PCR está diseñado para proveer cierta conveniencia cuando se necesita una amplificación por PCR relativamente fácil del constructo de ADN de diseño, lo que es útil no solo durante y después de que el constructo de ADN de diseño es sintetizado durante la preparación para la transformación génica, pero también después de que el constructo de ADN de diseño es entregado al genoma de un alga huésped para la verificación del gen de diseño en los transformantes. Por ejemplo, después que la transformación con el gen de diseño se realiza en una célula huésped *Chlamydomonas reinhardtii*-arg7 usando técnicas de electroporación y selección por complementación con argininosuccinato liasa (*arg7*), los tranformantes resultantes pueden ser luego analizados por un ensayo de PCR para su ADN nuclear usando el par de partidores para PCR para verificar si el

gen de las vías de producción de butanol de diseño (el constructo de ADN) completo ha sido incorporado de manera exitosa al genoma de un transformante dado. Cuando el ensayo de PCR de ADN nuclear de un transformante puede generar un producto de PCR que calza con el tamaño predicho del ADN y su secuencia es acorde con el constructo de ADN de diseño, entonces se verifica la incorporación exitosa del gen (o genes) de diseño en el genoma del transformante.

Por lo tanto, las varias representaciones también enseñan el método asociado para crear efectivamente las algas, plantas, o células vegetales transgénicas de diseño para la producción fotobiológica de butanol. Este método, en una de las representaciones, incluye los siguientes pasos: a) Seleccionar un huésped alga, planta, tejido vegetal o célula vegetal apropiada con respecto a sus antecedentes genéticos y características especiales en relación a la producción de butanol; b) Introducir los constructos de ácidos nucleicos de los genes de diseño en el genoma de dicho huésped alga, planta, tejido vegetal o células vegetales; c) Verificar la incorporación de los genes de diseño en el alga, planta, tejido vegetal o células vegetales transformadas con ensayos de PCR de ADN usando dichos partidores del constructo de ADN de diseño; d) Midiendo y verificando las características del organismo de diseño como la expresión inducible de los genes de vías de producción de butanol de diseño para la producción fotosintética de butanol a partir de dióxido de carbono y agua por medio de ensayos de ARNm, proteína, y producción de butanol característicos de acuerdo a las características de diseño específicas del constructo (o los constructos) de ADN (Figura 2A).

La representación anterior para crear un organismo de diseño para la producción fotobiológica de butanol pueden ser además repetidamente aplicadas a una pluralidad ciclos operacionales para obtener resultados más deseados. En varias representaciones, cualquiera de los pasos a) hasta d) de este método descrito más arriba son ajustados para encajar con ciertas condiciones específicas. En varias representaciones cualquiera de los pasos a) hasta d) de este método son aplicadas completamente o en parte, y/o en cualquier combinación ajustada.

Ejemplos de genes para vías de producción de butanol de diseño (constructos de ADN) se muestran en las listas de secuencias. SEQ ID NO: 1 presenta un constructo de ADN detallado de un gen para Butanol Deshidrogenasa de diseño (1809 pb) que incluye un partidador PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 262-pb para nitrato reductasa Nia1

(21–282), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (283–417), una secuencia que codifica para una enzima (418–1566) seleccionada y modificada de una secuencia de Butanol Deshidrogenasa de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (AB257439), un partidor de 223-pb *RbcS2* de término (1567–1789), y un partidor PCR RE (1790–1809). El promotor de 262-pb *Nia1* (secuencia ADN 21–282) es usado como un ejemplo de un promotor inducible para controlar la expresión de un gen para la Butanol Deshidrogenasa de la vía de producción de butanol de diseño (secuencia ADN 418–1566). El péptido señal de 135-pb *RbcS2* (DNA secuencia 283–417) es usado como un ejemplo para guiar la inserción de la enzima de diseño (secuencia ADN 418–1566) en el cloroplasto del organismo huésped. El terminador *RbcS2* (secuencia ADN 1567–1789) es usado de manera tal que la transcripción y traducción del gen de diseño es propiamente terminada para producir la apoproteína de diseño (péptido señal *RbcS2*-Butanol Deshidrogenasa) deseada. Debido a que el promotor *Nia1* es un ADN nuclear que puede controlar la expresión solo de genes nucleares, el gen para vías de producción de butanol sintético de este ejemplo es diseñado de acuerdo al uso del codón por parte del genoma nuclear de *Chlamydomonas*. Por lo tanto, en este caso, el gen de la enzima de diseño es transcrito en el núcleo. Su ARNm es naturalmente translocado al citosol, el donde el ARNm se traduce a una apoproteína que consiste en el péptido señal *RbcS2* (correspondiente a la secuencia de ADN 283–417) con su extremo C-terminal unido junto al extremo N-terminal de la proteína Butanol Deshidrogenasa correspondiente a la secuencia de ADN 418–1566). El péptido señal de la apoproteína guía su transporte a través de las membranas del cloroplasto y hacia el área del estroma, en donde el péptido señal es cortado de la apoproteína. La Butanol Deshidrogenasa asume entonces su función como enzima para la vía de producción de diseño en el cloroplasto. Los dos partidores para PCR (secuencias 1–20 y 1790–1809) son seleccionados y modificados de la secuencia del gen de actina Humana y pueden ser emparejados uno con el otro. Al comparar las secuencias con *Chlamydomonas* en GenBank no se encontraron secuencias homólogas de estas. Por lo tanto, pueden ser usados como partidores de PCR apropiados en ensayos de PCR de ADN para la verificación del gen de diseño en el alga transformada.

SEQ ID NO: 2 presenta el ejemplo 2 para un constructo de ADN para la Butiraldehído Deshidrogenasa (2067 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–

20), un promotor de 262-pb para nitrato reductasa Nia1 (21–282), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (283–417), una secuencia que codifica para la Butiraldehído Deshidrogenasa (418–1824) seleccionada y modificada de la secuencia de la Butiraldehído Deshidrogenasa de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (AY251646), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1825–2047), y un partidor PCR RE (2048–2067). Este constructo de ADN es similar al del ejemplo 1, SEQ ID NO: 1, excepto que la secuencia que codifica para la Butiraldehído Deshidrogenasa (418–1824) seleccionada y modificada de la secuencia de la Butiraldehído Deshidrogenasa de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (AY251646) es usada.

SEQ ID NO: 3 presenta el ejemplo 3 para un constructo de Butiril-CoA Deshidrogenasa de diseño (1815 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 262-pb para nitrato reductasa (21–282), un sitio de 9-pb Xho I NdeI (283–291), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (292–426), una secuencia que codifica para la Butiril-CoA Deshidrogenasa (427–1563) seleccionada/modificada de la secuencia de la Butiril-CoA Deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii* (AF494018), un sitio de 9-pb XbaI (1564–1572), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1573–1795), y un partidor PCR RE (1796–1815) en el extremo 3'. Este constructo de ADN es similar al ejemplo 1, SEQ ID NO: 1, excepto que la secuencia que codifica para la Butiril-CoA Deshidrogenasa (427–1563) seleccionada/modificada de las secuencias de la Butiril-CoA Deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii* (AF494018) es usada y los sitios de restricción Xho I NdeI y XbaI son agregados para hacer los componentes claves tales como la secuencia de destinación (292–426) y la secuencia de la enzima de diseño (427–1563) como una unidad modular que puede ser reemplazada de manera flexible cuando sea necesario para ahorrar costos en la síntesis de genes y mejorar la productividad del trabajo. Por favor notar, que la enzima no tiene que ser la Butiril-CoA Deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii*; un número de enzimas Butiril-CoA Deshidrogenasa (tales como las listadas en la Tabla 1) incluyendo sus isoenzimas, enzimas modificadas de diseño, y análogos funcionales de otras fuentes tales como *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Butyrate-producing bacterium L2-50*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, pueden ser también seleccionadas para su uso.

La SEQ ID NO: 4 presenta el ejemplo 4 para un constructo de ADN para Crotonasa (1482 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 262-pb

para nitrato reductasa (21–282), un sitio de 9-pb Xho I NdeI (283–291) un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (292–426), una secuencia que codifica para Crotonasa (427–1209) seleccionada/modificada de las secuencias de la Crotonasa de *Clostridium beijerinckii* (GenBank: AF494018), una secuencia de 21-pb que codifica para un tag Lumio (1210–1230), un sitio de 9-pb XbaI (1231–1239) conteniendo un codón de detención, un terminador de 223-pb *RbcS2* (1240–1462), y un partidor PCR RE (1463–1482) en el extremo 3'. Este constructo de ADN es similar al ejemplo 3, SEQ ID NO: 3, excepto que una secuencia que codifica para Crotonasa (427–1209) seleccionada/modificada de las secuencias de Crotonasa de *Clostridium beijerinckii* (GenBank: AF494018) es usada y una secuencia de 21-pb que codifica para un tag Lumio (1210–1230) es agregado en el extremo C-terminal de la secuencia de enolasa. La secuencia de 21-pb para el tag Lumio (1210–1230) es empleada aquí para codificar un péptido Lumio de secuencia Gly-Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys, la que se puede volver fluorescente cuando es tratada con el reactivo Lumio el cual se encuentra ahora disponible comercialmente en Invitrogen [<https://catalog.invitrogen.com>]. La tecnología de marcaje molecular Lumio está basada en un EDT (1,2-etanoditiol) acoplado con un derivado biarsénico (el reactivo Lumio) de fluoresceína que se une a una secuencia modificada de tetracisteína (Keppetipola, Coffman, y et al (2003). Rapid detection of in vitro expressed proteins using Lumio™ technology, *Gene Expression*, 25.3: 7-11). La secuencia de tetracisteína consiste en Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys, en donde Xaa es un aminoácido distinto a cisteína tales como Pro o Gly en este ejemplo. El reactivo Lumio unido a EDT permite la rotación libre de los átomos de arsénico que atrapan la fluorescencia de la fluoresceína. La formación de enlaces covalentes entre los tioles de los grupos arsénicos de Lumio y las tetracisteínas previene la rotación libre de los átomos de arsénico los que liberan la fluorescencia de la fluoresceína (Griffin, Adams, y Tsien (1998), "Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells", *Science*, 281:269-272). Esto también permite la visualización de las proteínas marcadas con tetracisteína (con tag) por medio de visualización de fluorescencia molecular. Por lo tanto, el uso del tag Lumio de esta manera permite el monitoreo y/o el seguimiento de la Crotonasa de diseño cuando se expresa para verificar si la enzima de las vías de producción de butanol de diseño ha sido efectivamente entregada en el cloroplasto de un organismo huésped tal como fue diseñado. El tag Lumio (un péptido

corto de 7 aminoácidos) que está unido al extremo C-terminal de la proteína Crotonasa en este ejemplo debería tener un efecto mínimo en la función de la enzima de diseño, pero debería permitir a la molécula de la enzima de diseño ser visualizada cuando sea tratada con el reactivo Lumio. El uso del *tag* Lumio es enteramente opcional. Si el *tag* Lumio afectara de alguna manera la función de la enzima de diseño, este *tag* puede ser eliminado en el diseño de la secuencia de ADN.

La SEQ ID NO: 5 presenta el ejemplo 5 para un constructo de ADN de diseño de la 3-Hidroxi-butiril-CoA Deshidrogenasa (1367 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 84-pb de nitrato reductasa (21–104), un sitio de 9-pb Xho I NdeI (105–113) un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (114–248), una secuencia que codifica para la 3-Hidroxi-butiril-CoA Deshidrogenasa (249–1094) seleccionada/modificada de la secuencia de la 3-Hidroxi-butiril-CoA Deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii* (Genbank:AF494018), una secuencia de 21-pb para el *tag* Lumio (1095–1115), un sitio de 9-pb XbaI (1116–1124), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1125–1347), y un partidor PCR RE (1348–1367). Este constructo de ADN es similar al del ejemplo 4 SEQ ID NO: 4, excepto que un promotor de 84-pb de la nitrato reductasa (21–104) y una secuencia que codifica para la 3-Hidroxi-butiril-CoA Deshidrogenasa (249–1094) seleccionada/modificada de la secuencia de la 3-Hidroxi-butiril-CoA Deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii* (Genbank:AF494018) son usadas. El promotor de 84-pb de la nitrato reductasa es creado artificialmente uniendo dos regiones de secuencias parcialmente homólogas (-231 a -201 y -77 a -25 con respecto al sitio de inicio de la transcripción) del promotor nativo Nial de *Chlamydomonas reinhardtii*. Estudios experimentales han demostrado que la secuencia de 84-pb es más activa que el promotor Nial nativo (Loppes y Radoux (2002) "Two short regions of the promoter are essential for activation and repression of the nitrate reductase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*," *Mol Genet Genomics* 268: 42–48). Por lo tanto, este también es un ejemplo en donde las secuencias funcionales sintéticas, análogos, derivados funcionales, y/o secuencias de diseño modificadas tales como que la secuencia de 84-pb sintética, pueden ser seleccionadas para su uso de acuerdo a varias representaciones de esta invención.

La SEQ ID NO: 6 presenta el ejemplo 6 para un constructo de ADN para Tiolasa (1721 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 84-pb de nitrato

reductasa (21–104), un sitio de 9-pb Xho I NdeI (105–113), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (114–248), una secuencia que codifica para Tiolasa (248–1448) seleccionada/modificada de la secuencia de Tiolasa de *Butyrivibrio fibrisolvens* (AB190764), una secuencia de 21-pb para el tag Lumio (1449–1469), un sitio de 9-pb XbaI (1470–1478), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1479–1701), y un partidador PCR RE (1702–1721). Este constructo de ADN es similar al del ejemplo 4, SEQ ID NO: 4, excepto que la secuencia que codifica para la Tiolasa (249–1448) y un promotor sintético de 84-pb Nia1 (21–104) son usados. Este es otro ejemplo de que secuencias funcionales sintéticas también pueden ser seleccionadas para su uso en constructos de ADN de diseño.

La SEQ ID NO: 7 presenta el ejemplo 7 para un constructo de ADN para la Piruvato-Ferredoxina Oxidoreductasa (4211 pb) que incluye un partidador PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2x 84-pb de nitrato reductasa (21–188), un sitio de 9-pb Xho I NdeI (189–197), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (198–332), una secuencia que codifica para la Piruvato-Ferredoxina Oxidoreductasa (333–3938) seleccionada/modificada de la secuencia de Piruvato-Ferredoxina Oxidoreductasa de *Mastigamoeba balamuthi* (GenBank: AY101767), una secuencia de 21-pb para el tag Lumio (3939–3959), un sitio de 9-pb XbaI (3960–3968), un terminador de 223-pb *RbcS2* (3969–4191), y un partidador PCR RE (4192–4211). Este constructo de ADN es similar al del ejemplo 4, SEQ ID NO: 4, excepto por el promotor de diseño Nia1 de 2x84-pb Nia1 y la secuencia que codifica para la Piruvato-Ferredoxina Oxidoreductasa (333–3938) seleccionada/modificada de la secuencia de Piruvato-Ferredoxina Oxidoreductasa de *Mastigamoeba balamuthi* (GenBank: AY101767) son usadas. El promotor Nia1 de 2x84-pb es construido como un tándem de duplicación de la secuencia del promotor sintético de 84-pb Nia1 presentado en la SEQ ID NO: 6 de más arriba. Pruebas experimentales han mostrado que el promotor sintético Nia1 de 2x84-pb es incluso más poderoso que el promotor nativo Nia1 (Loppes y Radoux (2002) "Two short regions of the promoter are essential for activation and repression of the nitrate reductase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*," *Mol Genet Genomics* 268: 42–48). El uso de este tipo de promotor inducible con varias fuerzas de promotor puede también ayudar en ajustar los niveles de expresión de las enzimas de las vías de producción de butanol de diseño.

La SEQ ID NO: 8 presenta el ejemplo 8 para un constructo de ADN de diseño para la PiruvatoQuinasa (2021 pb) que incluye un partidador PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 84-pb de nitrato reductasa (21–104), un sitio de 9-pb Xho I NdeI (105–113), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (114–248), una secuencia que codifica para la Piruvato Quinasa (249–1748) seleccionada/modificada de la secuencia de la Piruvato Quinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank: AY949876), una secuencia de 21-pb para el tag Lumio(1749–1769), un sitio de 9-pb XbaI (1770–1778), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1779–2001), y un partidador PCR RE (2002–2021). Este constructo de ADN es similar al ejemplo 6, SEQ ID NO: 6, excepto que la secuencia que codifica para la piruvato quinasa (249–1748) es usada.

La SEQ ID NO: 9 presenta el ejemplo 9 para un gen de diseño de la Enolasa (1815 pb) que incluye un partidador PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 262-pb para nitrato reductasa (21–282), un sitio de 9-pb Xho I NdeI (283–291), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (292–426), una secuencia que codifica para la Enolasa (427–1542) seleccionada/modificada de la secuencia de la Enolasa citosólica de *Chlamydomonas reinhardtii* (Genbank: X66412, P31683), una secuencia de 21-pb para el tag Lumio (1507–1527), un sitio de 9-pb XbaI (1543–1551) que contiene un codón de detención, un terminador de 223-pb *RbcS2* (1552–1795), y un partidador PCR RE (1796–1815) en el extremo 3'. Este constructo de ADN es similar al ejemplo 3, SEQ ID NO: 3, excepto que una secuencia que codifica para la Enolasa (427–1542) seleccionada/modificada de la secuencia de la Enolasa citosólica de *Chlamydomonas reinhardtii* es usada.

La SEQ ID NO: 10 presenta el ejemplo 10 para un constructo de ADN de diseño para la Fosfoglicerato Mutasa (2349 bp) que incluye un partidador PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 262-pb para nitrato reductasa (21–282), un sitio de 9-pb Xho I NdeI (283–291), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (292–426), una secuencia que codifica para la Fosfoglicerato Mutasa (427–2097) seleccionada/modificada de la secuencia de la Fosfoglicerato Mutasacitosólica de *Chlamydomonas reinhardtii* (JGI Chlre2 protein ID 161689, Genbank: AF268078), un sitio de 9-pb XbaI (2098–2106), un terminador de 223-pb *RbcS2* (2107–2329), y un partidador PCR RE(2330–2349) en el extremo 3'. Este constructo de ADN es similar al ejemplo 3, SEQ ID NO: 3, excepto que una secuencia que codifica para la Fosfoglicerato Mutasa (427–2097) seleccionada/modificada de la

secuencia de la Fosfoglicerato Mutasacitosólica de *Chlamydomonas reinhardtii* es usada.

La SEQ ID NO: 11 presenta el ejemplo 11 para un constructo de ADN de diseño para la Fosfoglicerato Quinasa (1908 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 262-pb para nitrato reductasa Nia1 (21–282), una secuencia que codifica para la Fosfoglicerato Quinasa (283-1665) seleccionada de una secuencia de Fosfoglicerato Quinasade cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* incluyendo su péptido señal de cloroplasto y la secuencia de la enzima madura (GenBank: U14912), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1666–1888), y un partidor PCR RE(1889–1908). Este constructo de ADN es similar al ejemplo 1, SEQ ID NO: 1, excepto que una secuencia que codifica para la Fosfoglicerato Quinasa (283-1665) seleccionada de una secuencia de Fosfoglicerato Quinasade cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* incluyendo su péptido señal de cloroplasto y la secuencia de la enzima madura es usada. Por lo tanto, este también es un ejemplo en donde la secuencia de una enzima de cloroplasto codificada en el núcleo tal como la Fosfoglicerato Quinasade cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* puede ser también usada en el diseño y construcción de un gen para las vías de producción de butanol de diseño cuando sea apropiado con un promotor inducible tal como el promotor Nia1 (secuencia de ADN 21–282).

La SEQ ID NO: 12 presenta el ejemplo 12 para un gen de diseño de la Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa (1677 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 262-pb para nitrato reductasa Nia1 (21–282), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (283–417), una secuencia que codifica para la enzima (418–1434) seleccionada y modificada de la secuencia de la Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa citosólica (ARNm) de *Mesostigma viride* (GenBank número de acceso DQ873404), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1435–1657), y un partidor PCR RE(1658–1677). Este constructo de ADN es similar al ejemplo 1, SEQ ID NO: 1, excepto que una secuencia que codifica para la enzima (418–1434) seleccionada y modificada de la secuencia de la Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa citosólica (ARNm) de *Mesostigma viride* (GenBank número de acceso DQ873404) es usada.

La SEQ ID NO: 13 presenta el ejemplo 13 para un constructo de ADN de diseño para la Fosfoglicerato Mutasa unida con el promotor HydA1 (2351 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 282-pb para HydA1 (21–302), un péptido

señal de 135-pb *RbcS2* (303–437), una secuencia que codifica para la Fosfoglicerato Mutasa (438–2108) seleccionada/modificada de las secuencias de la Fosfoglicerato Mutasa citosólica de *Chlamydomonas reinhardtii* (JGI Chlre2 protein ID 161689, Genbank: AF268078), un terminador de 223-pb *RbcS2* (2109–2331), y un partidor PCR RE(2332–2351). Este constructo de ADN es similar al ejemplo 1, SEQ ID NO:1, excepto que un promotor de 282-pb de *HydA1* (21–302) y una secuencia que codifica para la Fosfoglicerato Mutasa (438–2108) seleccionada/modificada de las secuencias de la Fosfoglicerato Mutasa citosólica de *Chlamydomonas reinhardtii* son usadas. El promotor de 282-pb de *HydA1* (21–302) ha sido probado y demostrado activo por ensayos experimentales en el laboratorio del inventor. El uso del promotor de *HydA1* (21–302) permite la activación de la expresión de enzimas de diseño usando condiciones de medio de cultivo anaeróbicas.

Con el mismo principio de usar un promotor inducible anaeróbico y una secuencia de destinación a cloroplastos como se muestra en la SEQ ID NO: 13 (ejemplo 13), SEQ ID NOS: 14–23 muestran ejemplos de genes de diseño 14-23. Brevemente, SEQ ID NO: 14 presenta el ejemplo 14 para un constructo de ADN de diseño para Enolasa unido al promotor de *HydA1* (1796 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 282-pb para *HydA1* (21–302), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (303–437), una secuencia que codifica para la Enolasa (438–1553) seleccionada/modificada de las secuencias de la enolasa citosólica *Chlamydomonas reinhardtii* (Genbank: X66412, P31683), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1554–1776), y un partidor PCR RE(1777–1796).

La SEQ ID NO: 15 presenta el ejemplo 15 para un constructo de ADN de diseño para la Piruvato Quinasa controlado por el promotor *HydA1* que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 282-pb para *HydA1* (21–302), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (303–437), una secuencia que codifica para la Piruvato Quinasa (438–1589) seleccionada/modificada de las secuencias de la Piruvato Quinasa citosólica de *Chlamydomonas reinhardtii* (JGI Chlre3 protein ID 138105), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1590–1812), y un partidor PCR RE(1813–1832).

La SEQ ID NO:16 presenta el ejemplo 16 para un constructo de ADN de diseño para la Piruvato-ferredoxina oxidoreductasa unido con el promotor *HydA1* (4376 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 282-pb para *HydA1* (21–

302), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (303–437), una secuencia que codifica para la Piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (438–4133) seleccionada/modificada de las secuencias de la Piruvato-ferredoxina oxidoreductasa de *Desulfovibrio africanus* (GenBank Número de acceso Y09702), c (4134–4356), y un partidor PCR RE (4357–4376).

La SEQ ID NO:17 presenta el ejemplo 17 para un constructo de ADN de diseño para la Piruvato-NADP⁺ oxidoreductasa unida con el promotor HydA1 (6092 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 282-pb para HydA1 (21–302), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (303–437), una secuencia que codifica para la Piruvato-NADP⁺ oxidoreductasa (438–5849) seleccionada/modificada de la secuencia de la Piruvato -NADP⁺ oxidoreductasa de *Euglena gracilis* (GenBank Número de acceso AB021127), un terminador de 223-pb *RbcS2* (5850–6072), y un partidor PCR RE (6073–6092).

La SEQ ID NO:18 presenta el ejemplo 18 para un constructo de ADN de diseño para la Tiolasa unida con el promotor HydA1 (1856 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 282-pb para HydA1 (21–302), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (303–437), una secuencia que codifica para la Tiolasa (438–1613) seleccionada/modificada de la secuencia de la Tiolasa de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (GenBank Z92974), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1614–1836), y un partidor PCR RE (1837–1856).

La SEQ ID NO:19 presenta el ejemplo 19 para un constructo de ADN de diseño para la 3-Hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa unida con el promotor HydA1 (1550 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 282-pb para HydA1 (21–302), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (303–437), una secuencia que codifica para la Hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa (438–1307)) seleccionada/modificada de la secuencia de la Hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* 3 (GenBank Z92974), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1308–1530), y un partidor PCR RE (1531–1550).

La SEQ ID NO:20 presenta el ejemplo 20 para un constructo de ADN de diseño para la Crotonasa unida con el promotor HydA1 (1457 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 282-pb para HydA1 (21–302), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (303–437), una secuencia que codifica para la Crotonasa (438–1214)

seleccionada/modificada de la secuencia de la Crotonasa de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (GenBank Z92974), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1215–1437), y un partidor PCR RE(1438–1457).

La SEQ ID NO:21 presenta el ejemplo 21 para un constructo de ADN de diseño para la Butiril-CoA deshidrogenasa unida con el promotor HydA1 (1817 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 282-pb para HydA1 (21–302), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (303–437), una secuencia que codifica para la Butiril-CoA deshidrogenasa (438–1574) seleccionada/modificada de la secuencia de la Butiril-CoA deshidrogenasa de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (GenBank Z92974), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1575–1797), y un partidor PCR RE(1798–1817).

La SEQ ID NO: 22 presenta el ejemplo 22 para un constructo de ADN de diseño para la Butiraldehído deshidrogenasa unida con el promotor HydA1 (2084 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 282-pb para HydA1 (21–302), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (303–437), una secuencia que codifica para la Butiraldehído deshidrogenasa (438–1841) seleccionada/modificada de la secuencia de la Butiraldehído deshidrogenasa de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (GenBank AY251646), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1842–2064), y un partidor PCR RE(2065–2084).

La SEQ ID NO: 23 presenta el ejemplo 23 para un constructo de ADN de diseño para la Butanol deshidrogenasa unida con el promotor HydA1 (2084 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 282-pb para HydA1 (21–302), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (303–437), una secuencia que codifica para la Butanol deshidrogenasa (438–1490) seleccionada/modificada de la secuencia de la Butanol deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii* (GenBank AF157307), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1491–1713), y un partidor PCR RE (1714–1733).

La Con el mismo principio de usar un promotor sintético Nia1 2x84 y un mecanismo de destinación a cloroplasto como el mencionado anteriormente, las SEQ ID NOS: 24–26 muestran más ejemplos de los constructos de ADN de diseño. Brevemente, SEQ ID NO: 24 presenta el ejemplo 24 de un constructo de ADN de diseño para la Fructosa-Difosfato-Aldolasa que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor 2 x 84-pb NR (21–188), una secuencia que codifica para la Fructosa-Difosfato-Aldolasa

(189–1313) seleccionada/modificada de la secuencia de la Fructosa-1,6-Difosfato-Aldolasa de cloroplasto de *C. reinhardtii* (GenBank: X69969), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1314–1536), y un partidor PCR RE(1537–1556).

La SEQ ID NO: 25 presenta el ejemplo 24 de un constructo de ADN de diseño para la Triosa-Fosfato-Isomerasa que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor 2 x 84-pb NR (21–188), una secuencia que codifica para la Triosa-Fosfato-Isomerasa (189–1136) seleccionada y modificada de la Triosa-Fosfato-Isomerasa de cloroplasto de *Arabidopsis thaliana* (GenBank: AF247559), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1137–1359), y un partidor PCR RE (1360–1379).

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

Los constructos de ácidos nucleicos, tales como los presentados en los ejemplos anteriores, pueden incluir secuencias adicionales apropiadas, por ejemplo, un gen marcador para selección, y una secuencia adicional de marcaje molecular (*tag*) (tal como el *tag* de Lumio, descrito en el ejemplo 4, SEQ ID NO: 4). Los marcadores de selección que pueden ser seleccionados para su uso en los constructos incluyen marcadores que confieren resistencia a kanamicina, higromicina, spectinomicina, estreptomicina, sulfonil urea, gentamicina, cloramfenicol, entre otros, todos los que han sido clonados y se encuentran disponibles para aquellos con habilidad en el arte. Alternativamente, el marcador selectivo es un gen de marcaje nutricional que puede complementar una deficiencia en el organismo huésped. Por ejemplo, el gen que codifica para la argininosuccinato liasa (*arg7*) puede ser usado como un gen de selección en el constructo de diseño, el que permite la identificación de los transformantes cuando células de *Chlamydomonas reinhardtii arg7-* (menos) son usadas como huésped.

Los constructos de ácidos nucleicos que llevan genes de diseño pueden ser entregados a un huésped alga, alga verde-azul, planta, o tejido o células vegetales usando

cualquiera de las técnicas de transformación de genes disponibles, tales como electroporación, absorción inducida por PEG, y entrega balística de ADN (cañón génico), y transformación mediada por *Agrobacterium*. Para el propósito de entrega de un constructo de diseño en células de alga, las técnicas de electroporación, gránulos de vidrio, y cañón génico biolístico pueden ser seleccionadas para su uso como métodos preferidos; y un alga con células únicas o una simple estructura de tallo es preferida para uso en la transformación. Los transformantes pueden ser identificados y probados usando en técnicas rutinarias.

Los variados genes de diseño pueden ser introducidos en la célula huésped secuencialmente de una manera paso a paso, o simultáneamente usando un constructo o en una transformación. Por ejemplo, los constructos de ADN que se muestran en la SEQ ID NO: 13–16 (o 17) y 18–23 para las diez enzimas derivadas de 3-fosfoglicerato de las vías de producción de butanol pueden ser colocadas en un vector genético tal como p389-Arg7 con un único marcador de selección (Arg7). Por lo tanto, con el uso del plásmido en esta manera, es posible entregar todos los diez constructos de ADN (genes de diseño) a un huésped *Chlamydomonas reinhardtii*-arg7 (CC-48) que requiere arginina en una sola transformación para la expresión de la vía de producción de butanol derivada de 3-fosfoglicerato (**03-12** en la Figura 1). Cuando es necesario, un transformante que contiene los diez constructos de ADN puede ser nuevamente transformado para obtener más genes deseados en su ADN genómico con un marcador de selección adicional tal como la estreptomicina. Con el uso de combinaciones de varios constructos de ADN para enzimas de diseño tales como los presentados en SEQ ID NO: 1–26 en la transformación genética con un organismo huésped apropiado, varias vías de producción de butanol tales como las ilustradas en la Figura 1 pueden ser construidas. Por ejemplo, los constructos de ADN de diseño de SEQ ID NO: 1–12 pueden ser seleccionados para la construcción de vías de producción de butanol derivadas de gliceraldehídos-3-fosfatos (**01-12** en La Figura 1); Los constructos de ADN de diseño de SEQ ID NO: 1–12, 24, y 25 pueden ser seleccionados para la construcción de vías de producción de butanol derivadas de fructosa-1,6-difosfato (**20-33**); y los constructos de ADN de diseño de SEQ ID NO: 1–12 y 24–26 pueden ser seleccionados para la construcción de vías de producción de butanol derivadas de fructosa-6-fosfato (**19-33**).

Modificaciones Adicionales al Huésped para mejorar la Producción de Butanol Fotosintética

Un mecanismo de conversión NADPH/NADH

De acuerdo a las vías de producción de butanol fotosintéticas, para producir una molécula de butanol a partir de 4CO_2 y $5\text{H}_2\text{O}$ probablemente se requerirán 14 ATP y 12 NADPH, los cuales son generados por la división fotosintética del agua y la fotofosforilación a través de la membrana tilacoidal. De manera que las vías de producción de butanol derivadas de 3-fosfoglicerato (**03-12** en La Figura 1) operen, es una práctica preferida usar enzimas de las vías de producción de butanol que puedan usar el NADPH que es generado por el proceso de transporte de electrones foto-dependiente. La butanol deshidrogenasa (GenBank número de acceso: AB257439) y la butialdehído deshidrogenasa (GenBank: AY251646) de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* son ejemplos de enzimas de las vías de producción de butanol que son capaces de aceptar tanto NADP(H) como NAD(H). Dichas enzimas de las vías de producción de butanol que pueden usar tanto NADPH como NADH (i.e., NADP(H)) pueden ser también seleccionadas para uso en esta vía derivada de 3-fosfoglicerato o en cualquiera de las otras vías de producción de butanol de diseño (Figura 1) también. La Butiril-CoA deshidrogenasa (GenBank: AF494018) y la 3-Hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa (GenBank: AF494018) de *Clostridium beijerinckii* son ejemplos de enzimas de las vías de producción de butanol que solo aceptan NAD(H). Cuando se emplea una enzima de las vías de producción de butanol que solo puede usar NADH, podría requerir un mecanismo de conversión NADPH/NADH en orden que la que vía de producción de butanol derivada de derivada de 3-fosfoglicerato pueda operar de manera adecuada. Sin embargo, dependiendo de los antecedentes genéticos del organismo huésped, un mecanismo de conversión entre NADPH y NADH puede existir en el huésped de manera que NADPH y NADH pueden ser usados de manera intercambiable por el organismo. En adición, es conocido que el NADPH puede ser convertido en NADH por una actividad NADPH-fosfatasa (Pattanayak y Chatterjee (1998) "Nicotinamide adenine dinucleotide fosfato phosphatase facilitates dark reduction of nitrate: regulation by nitrate and ammonia," *Biologia Plantarum* 41(1):75-84) y que el NAD puede ser convertido a NADP por la actividad NAD quinasa (Muto,

Miyachi, Usuda, Edwards y Bassham (1981) "Light-induced conversion of nicotinamide adenine dinucleotide to nicotinamide adenine dinucleotide fosfato in higher plant leaves," *Plant Physiology* 68(2):324-328; Matsumura-Kadota, Muto, Miyachi (1982) "Light-induced conversion of NAD^+ to NADP^+ in Chlorella cells," *Biochimica Biophysica Acta* 679(2):300-300). Por lo tanto, cuando se desea una conversión aumentada NADPH/NADH, el huésped puede ser genéticamente modificado para mejorar las actividades NADPHfosfatasay NAD quinasa. Entonces, en una de varias representaciones, la planta fotosintética, alga de diseño, o célula vegetal productoras de butanol de diseño contienen transgenes de diseño adicionales (Figura 2B) para expresar de manera inducible una o más enzimas para facilitar la inter-conversión NADPH/NADH, tales como la NADPH fosfatasa y la NAD quinasa (GenBank: XM_001609395, XM_001324239), en el estroma del cloroplasto del alga.

Otra representación que puede proveer un mecanismo de conversión NADPH/NADH es seleccionando adecuadamente un punto de ramificación en el ciclo de Calvin para que se derive una vía de producción de butanol de diseño. Para conferir este mecanismo de conversión NADPH/NADH mediante el diseño de una vía de acuerdo a esta representación, es una práctica preferida derivar una vía de producción de butanol de diseño en o después del punto de gliceraldehído-3-fosfato en el ciclo de Calvin como se muestra en la Figura 1. En estos diseños de vías, la conversión NADPH/NADH se logra esencialmente por un mecanismo de dos pasos: 1) Uso del paso del ciclo de Calvin de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la que usa NADPH para reducir 1,3-difosfoglicerato a gliceraldehídos-3-fosfato; y 2) uso del paso de la vía de diseño de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ **01**, la que produce NADH para oxidar gliceraldehído-3-fosfato a 1,3- difosfoglicerato. El resultado neto de los dos pasos descritos más arriba es la conversión de NADPH a NADH, el que puede suplir el poder reductor requerido en la forma de NADH para las vías de producción de butanol de diseño. Para el paso 1), el uso de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH del ciclo de Calvin que se expresa naturalmente es generalmente suficiente. Consecuentemente, la introducción de una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ **01** para que opere con la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH del ciclo de Calvin puede conferir la función de un mecanismo de conversión NADPH/NADH, el que es

necesario para la vía de producción de butanol derivada de 3-fosfoglicerato (**03-12** en La Figura 1) opere de manera adecuada. Por esta razón, el constructo para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (ejemplo 12, SEQ ID NO:12) es usado también como un gen de diseño de conversión NADPH/NADH (Figura 2B) para respaldar la vía de producción de butanol derivada de 3-fosfoglicerato (**03-12** en La Figura 1) en una de varias representaciones. Esto también explica por qué es importante usar una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ **01** para conferir este mecanismo de dos pasos de conversión de NADPH/NADH para las vías de producción de butanol de diseño. Por lo tanto, en una de varias representaciones, es también una práctica preferida usar una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , sus isoenzimas, derivados funcionales, análogos, enzimas de diseño modificadas, y/o combinaciones de estas en las vías de producción de butanol de diseño como se ilustra en la Figura 1.

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

En otra representación de la presente invención, la planta o célula huésped es modificada aún más para controlar el ciclo de Calvin de manera tal que el huésped pueda producir directamente butanol combustible líquido en vez de sintetizar almidón (glucógeno en el caso de las oxifotobacterias), celulosas y lignocelulosas que son a menudo ineficientes y de difícil uso por parte de la industria de la biorefinería. De acuerdo a una de varias representaciones, la inactivación de la actividad de síntesis de almidón se logra suprimiendo la expresión de cualquiera de las enzimas clave, tales como, la almidón sintasa (glucógenosintasa en el caso de las oxifotobacterias) **13**, glucosa-1-fosfato (G-1-P) adenililtransferasa **14**, fosfoglucomutasa **15**, y hexosa-fosfato-isomerasa **16** de la vía de síntesis del almidón que se conecta con el ciclo de Calvin (Figura 1).

La introducción de un factor genéticamente transmisible que puede inhibir la actividad de síntesis de almidón que compite con las vías de producción de butanol de diseño por los productos del ciclo de Calvin puede mejorar aún más la producción fotosintética de butanol. En una representación específica, un inhibidor genéticamente codificable (Figura 2C) de la vía de síntesis de almidón es una molécula de ARN de interferencia

(ARNi) la que inhibe específicamente las enzimas de la vía de síntesis de almidón, por ejemplo, la almidón sintasa **16**, glucosa-1-fosfato (G-1-P) adenililtransferasa **15**, fosfoglucomutasa **14**, y/o hexosa-fosfato-isomerasa **13** como se muestra con las etiquetas numéricas **13-16** en la Figura 1. Las secuencias de ADN que codifican para el ARNi de almidón sintasa, ARNi de glucosa-1-fosfato (G-1-P) adenililtransferasa, ARNi de fosfoglucomutasa y/o ARNi de G-P-isomerasa, respectivamente, pueden ser diseñados y sintetizados basados en las técnicas de ARNi que son conocidas por aquellos con habilidades en el arte (Liszewski (June 1, 2003) Progress in RNA interference, *Genetic Engineering News*, Vol. 23, number 11, pp. 1-59). De manera general, una molécula de ARN de interferencia (ARNi) es anti-sentido pero complementaria a un ARNm normal de una proteína en particular (gen) de manera tal que la molécula de ARNi se puede unir específicamente con el ARNm normal de un gen en particular, inhibiendo (bloqueando) entonces la traducción del ARNm de un gen específico a proteína (Fire, Xu, Montgomery, Kostas, Driver, Mello (1998) "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*". *Nature* 391(6669):806-11; Dykxhoorn, Novina, Sharp (2003) "Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression", *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(6):457-67).

Ejemplos de un constructo de ADN para un ARNi de diseño para la síntesis de almidón (Figura 2C) se muestran en la SEQ ID NO: 27 y 28 de la lista. Brevemente, SEQ ID NO: 27 presenta el ejemplo 27 para un constructo de ADN de diseño para un ARNi para la Almidón sintasa controlado por el promotor Nia1 (860 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 262-pb de Nia1 (21–282), una secuencia para el ARNi de la almidón sintasa (283 – 617) consistente en un codón de inicio ATG y una secuencia reversa complementaria de dos secuencias únicas de fragmentos del ARNm de la almidón sintasa de *Chlamydomonas reinhardtii* (GenBank: AF026422), un terminador de 223-pb *RbcS2* (618–850), y un partidor PCR RE (851–860). Debido al uso del promotor Nia1 (21–282), este gen para un ARNi de la síntesis de almidón de diseño está hecho para que se exprese solo cuando se necesita aumentar la producción fotobiológica de butanol en la presencia de su inductor específico, el nitrato (NO_3^-), que puede agregado en el medio de cultivo como un fertilizante para la inducción de los organismos de diseño. La secuencia del ARNi de la síntesis de almidón (283 – 617) está diseñada para unirse con el ARNm normal del gen de la

almidón sintasa, bloqueando entonces su traducción a una almidón sintasa funcional. La inhibición de la actividad de la almidón/glicógeno sintasa en el punto **16** de esta manera canaliza más los productos fotosintéticos del ciclo de Calvin hacia las vías de producción de butanol derivadas del ciclo de Calvin, tal como la vía de producción de butanol derivada de gliceraldehídos-3-fosfato **01-12** como se ilustra en la Figura 1.

La SEQ ID NO: 28 presenta el ejemplo 28 para un constructo de ADN de diseño para un ARNi de la almidón sintasa controlado por el promotor de HydA1 (1328pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 282-pb de HydA1 (21–302), una secuencia para el ARNi de la almidón sintasa (303 – 1085), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1086–1308), y un partidor PCR RE(1309–1328). La secuencia para el ARNi de la almidón sintasa (303–1085) incluye: un fragmento de 300-pb sentido (303–602) seleccionado de la secuencia de las primeras 300-pb codificantes para el ARNm de la almidón sintasa de *Chlamydomonas reinhardtii* (GenBank: AF026422), un loop tipo intron de 183-pb de diseño (603–785), y una secuencia de 300-pb antisentido (786–1085) complementaria a las primeras 300-pb codificantes para el ARNm de la almidón sintasa de *Chlamydomonas reinhardtii* (GenBank: AF026422). Esta secuencia de ARNi para la almidón sintasa de diseño (303–1085) está diseñada para inhibir la síntesis de la almidón sintasa por los siguientes dos mecanismos. Primero, la secuencia de ARNi de 300-pb antisentido complementaria (que corresponde a la secuencia de ADN 786–1085) se une al ARNm normal del gen de la almidón sintasa, bloqueando entonces su traducción a una almidón sintasa funcional. Segundo, la secuencia de ARNi de 300-pb antisentido complementaria complementaria (que corresponde a la secuencia de ADN 786–1085) se puede también unir con su contraparte de 300-pb sentido (que corresponde a la secuencia de ADN 303–602) en la misma molécula de ARNi de diseño, formando una estructura de ARN de doble hebra tipo hebilla con la secuencia de 183-pb tipo intrón (603–785) de manera similar a un *loop*. Estudios experimentales han mostrado que esta estructura tipo hebilla de doble hebra de ARN puede gatillar el silenciamiento post-transcripcional de genes (Fuhrmann, Stahlberg, Govorunova, Rank y Hegemann (2001) *Journal of Cell Science* 114:3857-3863). Debido al uso del promotor de HydA1 (21–302), este gen de diseño para un ARNi de la almidón sintasa está diseñado para ser expresado solo bajo condiciones anaeróbicas cuando se necesita aumentar la producción fotobiológica de

butanol canalizando más productos fotosintéticos del ciclo de Calvin hacia las vías de producción de butanol tales como **01-12**, **03-12**, y/o **20-33** como se ilustra en la Figura 1.

Genes de degradación del almidón y glicólisis de diseño

En otra representación de la presente invención, la producción fotobiológica de butanol es aumentada al incorporar un conjunto adicional de genes de diseño (Figura 2D) los que facilitan la degradación del almidón/glicógeno y la glicólisis en combinación con los genes de producción de butanol de diseño (Figura 2A). Dichos genes adicionales de diseño para la degradación del butanol incluyen, por ejemplo, genes que codifican para **17**: amilasa, almidónfosforilasa, hexoquinasa, fosfoglucomutasa, y para **18**: glucosa-fosfato-isomerasa (G-P-isomerasa) como se ilustra en la Figura 1. Los genes de glicólisis de diseño codifican para enzimas de la glicólisis con destinación al cloroplasto: glucofosfato isomerasa **18**, fosfofructosaquinasa **19**, aldolasa **20**, triosafofato isomerasa **21**, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa **22**, fosfogliceratoquinasa **23**, fosfogliceratomutasa **24**, enolasa **25**, y piruvatoquinasa **26**. Los genes de diseño para la degradación de almidón y glicólisis en combinación con cualquiera de las vías de producción de butanol mostradas en la Figura 1 pueden formar vías adicionales a partir de almidón/glicógeno a butanol (**17-33**). Consecuentemente, la co-expresión de los genes de diseño para la degradación de almidón y glicólisis con los genes de las vías de producción de butanol pueden también aumentar la producción fotobiológica de butanol. Por lo tanto, esta representación puede significar otra aproximación para controlar el ciclo de Calvin para aumentar la producción fotobiológica de butanol. En este caso, algunos de los productos del ciclo de Calvin fluirán hacia la vía de síntesis de almidón (**13-16**) y luego hacia la vía de almidón/glicógeno a butanol (**17-33**) como se muestra en La Figura 1. En este caso, el almidón/glicógeno actúa como una reserva temporal de los productos del ciclo de Calvin antes de ser convertidos a butanol. Este mecanismo puede ser muy útil para maximizar la producción de butanol en algunos casos. Por ejemplo, con una alta intensidad de luz solar tal como la que ocurre cerca del mediodía, la tasa de fijación de CO₂ fotosintética puede ser tan alta que puede exceder la tasa máxima de capacidad de una vía de producción de butanol; el uso del

mecanismo de síntesis de almidón permitirá el almacenamiento temporal del exceso de productos fotosintéticos para ser usados después para la producción de butanol.

La Figura 1 también ilustra el uso de una vía de diseño de almidón/glicógeno a butanol con enzimas de diseño (etiquetadas de **17** a **33**) en combinación con vías de producción de butanol de diseño derivadas del ciclo de Calvin tales como la vía de producción de butanol derivada de gliceraldehídos-3-fosfato **01-12** para la producción fotobiológica aumentada de butanol. Similar a los beneficios de usar vías de producción de butanol derivadas del ciclo de Calvin, el uso de vías de almidón/glicógeno a butanol de diseño (**17-33**) puede también ayudar a convertir los productos fotosintéticos a butanol antes que los azúcares puedan ser convertidos en otras biomoléculas complicadas tales como biomasas lignocelulósicas las que no pueden ser fácilmente usadas en las industrias de biorefinería. Por lo tanto, el uso apropiado de las vías de producción de butanol de diseño derivadas del ciclo de Calvin (tales como **01-12**, **03-12**, y/o **20-33**) y/o las vías de almidón/glicógeno a butanol (**17-33**) pueden representar revolucionarias *inter alia* tecnologías que pueden efectivamente saltarse los problemas de cuello de botella de la actual tecnología de biomasas incluyendo el problema de la “recalcitrancia lignocelulósica”.

Otra característica es que la actividad de la vía de producción de butanol de diseño derivada del ciclo de Calvin (tal como **01-12**, **03-12**, y/o **20-33**) puede ocurrir predominantemente durante los días soleados debido a que usa un producto intermediario del ciclo de Calvin que requiere suministros de poder reductor (NADPH) y energía (ATP) generados por la división fotosintética del agua y la translocación de protones dependiente de luz acoplada con el proceso de transporte de electrones a través del sistema de la membrana tilacoidal. La vía de almidón/glicógeno a butanol de diseño (**17-33**) que puede usar el azúcar de reserva que ha sido almacenada como almidón/glicógeno durante la fotosíntesis puede operar no solo durante el día, sino que también durante la noche. Consecuentemente, el uso de vías de producción de butanol de diseño derivadas del ciclo de Calvin (tales como **01-12**, **03-12**, y/o **20-33**) junto con vías de almidón/glicógeno a butanol de diseño (**17-33**) como se ilustra en la Figura 1 permite la producción de butanol tanto en el día como en la noche.

Debido a que la expresión de tanto las vías de almidón/glicógeno a butanol de diseño como las de producción de butanol derivadas del ciclo de Calvin de diseño son

controladas por el uso de un promotor inducible tal como el promotor de la hidrogenasa anaeróbica, este tipo de organismos también es capaz de crecer fotoautotróficamente bajo condiciones aeróbicas (normales). Cuando los organismos fotosintéticos de diseño crecen y están listos para la producción fotobiológica de butanol, las células son colocadas bajo condiciones específicas de inducción tales como bajo condiciones anaeróbicas [o cambio de fertilizante de amonio a nitrato, si es que se usa un promotor *Nia1/nirA* que controle las vías de producción de butanol] para aumentar la producción de butanol, como se muestra en las Figuras 1y3.

Ejemplos de genes de degradación de almidón (o glicógeno) se muestran en SEQ ID NO: 29–33 de la lista. Brevemente, SEQ ID NO:29 presenta el ejemplo 29 para un constructo de ADN de diseño para Amilasa (1889 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor 2 x 84-pb de NR (21–188), un sitio de 9-pb *Xho I NdeI* (189–197), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (198–332), una secuencia que codifica para Amilasa (333–1616) seleccionada y modificada de la amilasa de *Barley alpha* (GenBank: J04202A my46 expresión probada en células de aleurona), una secuencia de 21-pb de *tag Lumio* (1617–1637), un sitio 9-pb *XbaI* (1638–1646), un terminador de 223-pb *RbcS2* (1647–1869), y un partidor PCR RE (1870–1889).

La SEQ ID NO: 30 presenta el ejemplo 30 para un constructo de ADN de diseño para Almidón fosforilasa (3089 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor 2 x 84-pb de NR (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (189–323), una secuencia que codifica para la Almidón fosforilasa (324–2846) seleccionada y modificada de la secuencia de la Almidón fosforilasa de raíz de *Citrus* (GenBank: AY098895, expresión probada en raíz de *citrus*), un terminador de 223-pb *RbcS2* (2847–3069), y un partidor PCR RE (3070–3089).

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

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

La SEQ ID NO: 33 presenta el ejemplo 33 para un constructo de ADN de diseño para Glucosafosfato-Isomerasa (2231 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor 2 x 84-pb de NR (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* (189–323), una secuencia que codifica para la Glucosafosfato-Isomerasa (324–1988) seleccionada y modificada de la secuencia de Glucosafosfato-Isomerasa de *S. cerevisiae* (GenBank: M21696), un terminador de 223-pb (1989–2211), y un partidor PCR RE (2212–2231).

Los genes de degradación de almidón de diseño tales como aquellos mostrados en las SEQ ID NO: 29–33 pueden ser seleccionados para su uso en combinación con varios genes de las vías de producción de butanol de diseño para la construcción de varias vías de degradación de almidón y producción de butanol de diseño tales como las vías mostradas en la Figura 1. Por ejemplo, los genes de diseño mostrados en las SEQ ID NOS: 1–12, 24–26, y 29–33 pueden ser seleccionados para la construcción de vías de almidón-butanol controladas por el promotor *Nia1* que incluyen las siguientes enzimas de diseño: amilasa, almidón fosforilasa, hexoquinasa, fosfoglucomutasa, glucosafosfato isomerasa, fosfofructosaquinasa, fructosa difosfato aldolasa, triosa fosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfogliceratoquinasa, fosfogliceratomutasa, enolasa, piruvatoquinasa, piruvato-NADP⁺ oxidoreductasa (o piruvato-ferredoxina oxidoreductasa), tiolasa, 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa, butiraldehído deshidrogenasa, y butanol deshidrogenasa. Esta vía almidón/glicógeno- butanol **17-33** puede ser usada sola y/o en combinación con otras vías de producción de butanol tal como la vía de producción de butanol derivada de 3-fosfoglicerato **03-12** como se ilustra en la Figura 1.

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

En otra representación de la presente invención la productividad de la producción fotobiológica de butanol se aumenta mediante una distribución selectiva de las vías de producción de butanol de diseño entre el cloroplasto y el citoplasma en una célula vegetal eucariota. Esto es, no toda la vía (o vías) de producción de butanol de diseño (Figura 1) tiene que operar en el cloroplasto; cuando se requiere, parte de la vía de producción de butanol de diseño puede operar en el citoplasma también. Por ejemplo, en una de varias representaciones, una parte significativa de la actividad de dihidroxiacetona fosfato a butanol, que es parte de la vía almidón-butanol de diseño **(21-33)** está diseñada que ocurra en el citoplasma mientras que los pasos que van desde almidón hasta dihidroxiacetona fosfato **(17-20)** ocurren en el cloroplasto. En este ejemplo, la unión de los pasos que ocurren en el cloroplasto y en el citoplasma de la vía de diseño se logra por el uso de un intercambiador de triosa fosfato-fosfato, el que facilita la translocación de la dihidroxiacetona a través de la membrana del cloroplasto. El uso del intercambiador de triosa fosfato-fosfato, permite además que la vía de producción de butanol de diseño derivada de gliceraldehído-3-fosfato opere no solo en los cloroplastos, sino que también en el citoplasma. La parte de producción citoplasmática de las vías de producción de butanol de diseño puede ser construida mediante el uso genes de producción de butanol de diseño (constructos de ADN de la Figura 2), y omitiendo las secuencias de destinación a cloroplasto como se muestra en la Figura 2E.

Oxifotobacterias de diseño con vías de producción de butanol de diseño citoplasmáticas

En organismos fotosintéticos procariotas tales como algas verde-azules (oxifotobacterias incluyendo cianobacterias y oxiclوروبacterias), las que típicamente contienen la membrana tilacoidal fotosintética pero no la estructura del cloroplasto, el ciclo de –calvin se localiza en el citoplasma. En este caso especial, la vía (o vías) entera de producción de butanol de diseño (Figura 1) incluyendo (pero no limitada a) la vía de producción de butanol derivada de 3-gliceraldehído-fosfato **(01-12)**, la vía de producción de butanol derivada de 3-fosfoglicerato

(03-12), la vía de producción de butanol derivada de fructosa-1,6-difosfato (20-33), la vía derivada de fructosa-6-fosfato (19-33), y las vías de almidón(r glicógeno)-a-butanol (17-33) son ajustadas en su diseño para operar con el ciclo de Calvin en el citoplasma de un alga verde-azul. La construcción de las vías de producción de butanol de diseño citoplasmáticas se puede lograr mediante el uso de genes de diseño de las vías de producción de butanol (construido de ADN de la Figura 2A), y omitiendo completamente la secuencia de destinación a cloroplasto. Cuando se omite la secuencia de destinación a cloroplasto en el constructo (o constructos) de ADN como se ilustra en la Figura 2E, el gen (o genes) de diseño es transcrito y traducido a enzimas de diseño en el citoplasma que por lo tanto permiten las vías de producción de butanol de diseño. Los genes de diseño pueden ser incorporados en el ADN cromosomal y/o plasmídico en un alga verde-azul (oxifotobacterias incluyendo cianobacterias y oxiclolorobacterias) huésped usando técnicas de transformación génica que son conocidas por aquellos con habilidades en el arte. Es una práctica preferida el integrar los genes de diseño a través de una transformación integrativa en el ADN cromosomal lo que usualmente provee mejor estabilidad génica para los genes de diseño. En oxifotobacterias, tales como cianobacterias, la transformación integrativa se puede lograr a través de un proceso de doble recombinación homóloga de ADN en el ADN cromosomal del huésped, usando un constructo de ADN de diseño como el que se ilustra en la Fig. 2F, el que típicamente desde el extremo 5' río-arriba hasta el extremo 3' río-abajo consiste en: sitio de recombinación 1, un gen (o genes) para una vía de producción de butanol de diseño, y un sitio de recombinación 2. Este tipo de constructos de ADN (Fig. 2F) pueden ser enviados dentro de las oxifotobacterias (algas verde-azules) con un número de técnicas de transformación incluyendo electroporación, transformación natural, y/o conjugación. Los organismos transgénicos de diseño creados a partir de algas verde-azules son también denominados algas verde-azules de diseño (oxifotobacterias de diseño incluyendo cianobacterias de diseño y oxiclolorobacterias de diseño).

Ejemplos de genes de diseño para vías de producción de butanol de oxifotobacterias se muestran en las SEQ ID NO: 34–45 listadas. Brevemente, SEQ ID NO:34 presenta el ejemplo 34 para un constructo de ADN oxifotobacterial de diseño para la Butanol Deshidrogenasa (1709 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un

promotor de 400-pb de nitrato reductasa (*nirA*) de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21–420), una secuencia que codifica para la enzima (421–1569) seleccionada y modificada de la secuencia de la Butanol Deshidrogenasa de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (AB257439), un terminador de 120-pb *rbcS* de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (1570–1689), y un partidor PCR RE (1690–1709) en el extremo 3’.

La SEQ ID NO:35 presenta el ejemplo 35 para un constructo de ADN oxifotobacterial de diseño para la Butiraldehído Deshidrogenasa (1967 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 400-pb de nitrato reductasa (*nirA*) de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21–420), una secuencia que codifica para la enzima (421–1827) seleccionada y modificada de la secuencia de la Butiraldehído Deshidrogenasa de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (AY251646), un terminador de 120-pb *rbcS* de *Thermosynechococcus* (1828–1947), y un partidor PCR RE (1948–1967).

La SEQ ID NO:36 presenta el ejemplo 36 para un constructo de ADN oxifotobacterial de diseño para la Butiril-CoA Deshidrogenasa (1602 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 305-pb para la nitrato reductasa de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21–325), una secuencia que codifica para la Butiril-CoA Deshidrogenasa (326–1422) seleccionada/modificada de la secuencia de la Butiril-CoA Deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii* (AF494018), un terminador de 120-pb *rbcS* de *Thermosynechococcus* (1423–1582), y un partidor PCR RE (1583–1602).

La SEQ ID NO:37 presenta el ejemplo 37 para un constructo de ADN oxifotobacterial de diseño para la Crotonasa (1248 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 305-pb para la nitrato reductasa de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21–325), una secuencia que codifica para la Crotonasa (326–1108) seleccionada/modificada de la secuencia de la Crotonasa de *Clostridium beijerinckii* (AF494018), un terminador de 120-pb *rbcS* de *Thermosynechococcus* (1109–1228), y un partidor PCR RE (1229–1248).

La SEQ ID NO: 38 presenta el ejemplo 38 para un constructo de ADN oxifotobacterial de diseño para la 3-Hidroxibutiril-CoA Deshidrogenasa (1311 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 305-pb para la nitrato reductasa

de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21–325), una secuencia que codifica para la 3-Hidroxibutiril-CoA Deshidrogenasa (326–1171) seleccionada/modificada de la secuencia de la 3-Hidroxibutiril-CoA Deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii* (AF494018), un terminador de 120-pb *rbcS* de *Thermosynechococcus* (1172–1291), y un partidor PCR RE (1292–1311).

La SEQ ID NO:39 presenta el ejemplo 39 para un constructo de ADN oxifotobacterial de diseño para la Tiolasa (1665 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 305-pb para *nirA* de *Thermosynechococcus* (21–325), una secuencia que codifica para la Tiolasa (326–1525) seleccionada de la secuencia de Tiolasa de *Butyrivibrio fibrisolvens* (AB190764), un terminador de 120-pb *rbcS* de *Thermosynechococcus* (1526–1645), y un partidor PCR RE (1646–1665).

La SEQ ID NO:40 presenta el ejemplo 40 para un constructo de ADN oxifotobacterial de diseño para la Piruvato-Ferredoxina Oxidoreductasa (4071 pb), que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 305-pb para *nirA* de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21–325), una secuencia que codifica para la Piruvato-Ferredoxina Oxidoreductasa (326–3931) seleccionada/modificada de la secuencia de la Piruvato-Ferredoxina Oxidoreductasa de *Mastigamoeba balamuthi* (GenBank: AY101767), un terminador de 120-pb *rbcS* de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (3932–4051), y un partidor PCR RE (4052–4071).

La SEQ ID NO:41 presenta el ejemplo 41 para un constructo de ADN oxifotobacterial de diseño para la Piruvato Quinasa (1806 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 305-pb para *nirA* de *Thermosynechococcus* (21–325), una secuencia que codifica para la Piruvato Quinasa (326–1666) seleccionada/modificada de la secuencia de la Piruvatoquinasa de *Thermoproteus tenax* (GenBank: AF065890), un terminador de 120-pb *rbcS* de *Thermosynechococcus* (1667–1786), y un partidor PCR RE (1787–1806).

La SEQ ID NO:42 presenta el ejemplo 42 para un constructo de ADN oxifotobacterial de diseño para la Enolasa (1696 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb para *nirA* de *Thermosynechococcus* (21–251), una secuencia que codifica para la enolasa (252–1556) seleccionada/modificada de la secuencia de la enolasa citosólica de *Chlamydomonas* (GenBank: X66412, P31683), un terminador de

120-pb *rbcS* de *Thermosynechococcus* (1557–1676), y un partidor PCR RE (1677–1696).

La SEQ ID NO:43 presenta el ejemplo 43 para un constructo de ADN oxifotobacterial de diseño para la Fosfoglicerato Mutasa (2029 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb para *nirA* de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21–251), una secuencia que codifica para la Fosfoglicerato Mutasa (252–1889) seleccionada/modificada de la secuencia de la Fosfoglicerato Mutasa de *Pelotomaculum thermopropionicum* SI (GenBank: YP_001213270), un terminador de 120-pb *rbcS* de *Thermosynechococcus* (1890–2009), y un partidor PCR RE (2010–2029).

La SEQ ID NO:44 presenta el ejemplo 44 para un constructo de ADN oxifotobacterial de diseño para la Fosfoglicerato Quinasa (1687 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb para *nirA* de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21–251), una secuencia que codifica para la Fosfoglicerato Quinasa (252–1433) seleccionada de la Fosfoglicerato Quinasa de *Pelotomaculum thermopropionicum* SI (BAF60903), un terminador de 234-pb *rbcS* de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (1434–1667), y un partidor PCR RE (1668–1687).

La SEQ ID NO:45 presenta el ejemplo 45 para un constructo de ADN oxifotobacterial de diseño para la Gliceraldehído-3-FosfatoDeshidrogenasa (1514 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 305-pb para *nirA* de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (21–325), una secuencia que codifica para la enzima (326–1260) seleccionada y modificada de la Gliceraldehído-3-FosfatoDeshidrogenasa dependiente de NAD de *Blastochloris viridis* (CAC80993), un terminador de 234-pb *rbcS* de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (1261–1494), y un partidor PCR RE (1495–1514).

Los genes oxifotobacteriales de diseño tales como los mostrados en las SEQ ID NO: 34–45 pueden ser seleccionados para su uso completo o en parte, y/o en combinación con varios otros genes de vías de producción de butanol de diseño para la construcción de varias vías oxifotobacteriales de producción de butanol de diseño tales como las vías que se muestran en la Figura 1. Por ejemplo, los genes de diseño mostrados en las SEQ ID NOS: 34–45 pueden ser seleccionados para la construcción de una vía oxifotobacterial de producción de butanol derivada de gliceraldehído-3-fosfato y

controlada por el promotor nirA (**01-12**) que incluye las siguientes enzimas de diseño: gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa dependiente de NAD **01**, fosfoglicerato quinasa **02**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvatoquinasa**05**,piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (opiruvato-NADP⁺ oxidoreductasa) **06**, tiolasa **07**, 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa **08**, crotonasa **09**, butiril-CoA deshidrogenasa **10**, butiraldehíddeshidrogenasa **11**, y butanol deshidrogenasa **12**.El uso de estos genes oxifobacteriales de diseño de vías de producción de butanol (SEQ ID NOS: 34–45) en cianobacterias termofílicas y/o termotolerantes puede traducirse en oxifotobacterias termofílicas y/o termotolerantes productoras de butanol. Por ejemplo, el uso de estos genes de diseño (SEQ ID NOS: 34–45) en una cianobacteria termofílica/termotolerante tal como *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 puede representar una cianobacteria termofílica/termotolerante de diseño productora de butanol tal como un *Thermosynechococcus* de diseño productor de butanol.

Modificaciones adicionales al huésped para asegurar la Bioseguridad

La presente invención también provee de métodos de producción de un biocombustible fotosintético con resguardo de la bioseguridad (p.ej., butanol y/o alcoholes superiores relacionados) los que están basados en plantas transgénicas (tales como algas y oxifotobacterias) o células vegetales transgénicas con división celular controlable. Por ejemplo, los organismos fotosintéticos de diseño con división celular controlable (Fig. 3) son creados con genes de diseño de bioseguridad (Fig. 2G) en conjunto con las vías de producción de butanol de diseño (Figs. 2A-2F) de manera tal que sus funciones de división celular y apareamiento pueden ser detenidas de manera controlada para proveer mejores características de bioseguridad.

En una de varias representaciones, una característica fundamental es que el organismo fotosintético de diseño con división celular controlada (tal como un alga, célula vegetal, o oxifotobacteria) contiene dos funciones clave (Fig. 3A): un mecanismo (o más) de bioseguridad y una (o más) vía de producción de biocombustible de diseño. Como se muestra en La Fig. 3B, la característica de bioseguridad de diseño es conferida por un número de mecanismos incluyendo: (1) la inserción inducible de canales de protones de diseño en la membrana del organismo para inhabilitar permanentemente cualquier capacidad de divisióny/o apareamiento, (2) la aplicación selectiva de una proteína regulatoria del ciclo de división celular de diseño o de un ARN de interferencia (ARNi)

para inhibir permanentemente el ciclo de división celular y preferentemente mantener la célula en la fase G_{10} en el estado G_0 , y (3) el uso innovativo de un organismo fotosintético huésped con altos requerimientos de CO_2 para la expresión de las vías de producción de biocombustible de diseño. Ejemplos de vías de producción de biocombustible de diseño incluyen las vías de producción de butanol de diseño, las que operan en el ciclo de Calvin para sintetizar biocombustibles tales como el butanol directamente a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O). La tecnología de control de la división celular de diseño puede ayudar a asegurar la bioseguridad en el uso de los organismos de diseño para la producción fotosintética de biocombustibles. Concordantemente, esta representación provee, *inter alia*, métodos para el resguardo de la bioseguridad en la producción de biocombustibles (p.ej., butanol y/o alcoholes superiores relacionados) basados en un alga, cianobacteria, oxiclóbacteria, planta o célula vegetal productora de biocombustibles y con división celular controlable.

En una de varias representaciones, un alga o célula vegetal eucariota de diseño, productora de butanol y con división celular controlable es creada introduciendo un gen para un canal de protones de diseño (Fig. 2H) en un alga o célula vegetal huésped (Fig. 3B). SEQ ID NO: 46 presenta el ejemplo 46 para un constructo de ADN de diseño con el gen para un canal de protones controlado por el promotor *Nia1* (609 bp) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 262-bp de nitrato reductasa *Nia1* (21–282), una secuencia que codifica para el canal de protones de Melitina (283–366), un terminador de 223-bp *RbcS2* (367–589), y un partidor PCR RE (590–609).

La expresión del gen del canal de protones de diseño (Fig. 2H) es controlada por un promotor inducible tal como el promotor de la nitrato reductasa (*Nia1*), el que también puede ser usado para controlar la expresión de un gen de las vías de producción de biocombustibles. Por lo tanto, antes que la expresión del gen o los genes de diseño sea inducida, el organismo de diseño puede crecer de manera fotoautotrófica usando CO_2 as como la fuente de carbono y H_2O como la fuente de electrones tal como en el organismo tipo silvestre. Cuando el cultivo del organismo de diseño es crecido y está listo para la producción fotobiológica de biocombustibles, el cultivo celular es entonces colocado bajo una condición específica de inducción (tal como añadiendo nitrato al medio de cultivo si es que se emplea el promotor de la nitrato reductasa (*Nia1*) como inductor inducible) para inducir la expresión de tanto el gen del canal de protones y los

genes de las vías de producción de biocombustibles. La expresión del gen del canal de protones es diseñado para ocurrir durante su transcripción en el núcleo y su traducción en el citosol. Debido al diseño molecular específico, los canales de protones expresados son automáticamente insertados en la membrana plasmática celular, pero dejan la membrana tilacoidal fotosintética intacta. La inserción de los canales de protones en la membrana plasmática celular colapsa el gradiente de protones a través de la membrana y hacia el citoplasma de manera que las funciones de división celular y apareamiento quedan permanentemente inhabilitadas. Sin embargo, la membrana tilacoidal fotosintética dentro del cloroplasto se mantiene intacta (funcional) de manera que las enzimas de producción de biocombustible de diseño expresadas en la región del estroma pueden operar con el ciclo de Calvin para la producción fotobiológica de biocombustibles a partir de CO_2 y H_2O . Esto es, cuando el gen del canal de protones de diseño y los genes de las vías de producción de biocombustibles de diseño son ambos activados, el organismo de diseño se transforma en una célula no-replicable con dedicación a la producción fotosintética de biocombustibles. Debido a que la división celular y el apareamiento se encuentran permanentemente inhabilitados (muertos) en esta etapa, el cultivo del organismo de diseño no es más materia viva excepto por la función catalítica para la conversión fotoquímica de CO_2 y H_2O en un biocombustible. No será capaz de aparearse ni intercambiar cualquier material genético con cualquier otra célula, incluso se de alguna manera entrara en contacto con una célula tipo silvestre como podría ser en el caso de una liberación accidental en el ambiente.

De acuerdo a una de varias representaciones, el promotor de la nitrato reductasa (Nia1) o el promotor de la nitrito reductasa (nirA) son promotores inducibles preferidos para su uso en el control de la expresión de los genes de diseño. En la presencia de amonio (pero no nitrato) en el medio de cultivo, por ejemplo, un organismo de diseño con el gen para el canal de protones controlado con el promotor Nia1 y el gen o genes de las vías de diseño de producción de biocombustibles puede crecer de manera fotoautotrófica usando CO_2 como la fuente de carbono y H_2O como la fuente de electrones tal como en un organismo tipo silvestre. Cuando el cultivo del organismo de diseño crece y está listo para la producción fotobiológica de biocombustibles, la expresión del gen para el canal de protones de diseño y los el gen o genes de las vías de producción de biocombustibles de diseño pueden ser inducidas agregando

fertilizante de nitrato al medio de cultivo. El nitrato está abundantemente presente en los suelos y en casi en toda la superficie del agua en el planeta Tierra. Por lo tanto, incluso si un organismo de diseño controlado por el promotor Nia1 es accidentalmente liberado en el medio ambiente natural, morirá muy pronto debido que el nitrato ambiental gatillará la expresión del canal de protones controlado por el promotor Nia1 lo que insertará los canales de protones en la membrana plasmática y por lo tanto matando la célula. Esto es, un organismo fotosintético de diseño que contiene el gen del canal de protones controlado por el promotor Nia1 está programado para morir tan pronto como esté en contacto con el nitrato ambiental. Esta característica de organismos de diseño con división celular controlable con un gen para el canal de protones controlado por el promotor Nia1 provee una característica adicional de bioseguridad.

El arte de construir un gen para un canal de protones (Fig. 2H) con una secuencia de destinación a membrana tilacoidal ha sido recientemente revelada [James W. Lee (2007). “Designer proton-channel transgenic algae for photobiological hydrogen production”, PCT Número de Publicación Internacional: WO 2007/134340 A2]. En la presente invención que crea un organismo de diseño con división celular controlable, la secuencia de destinación a membrana tilacoidal debe ser omitida en el diseño del gen del canal de protones. Por ejemplo, los componentes esenciales del gen del canal de protones controlado por el promotor Nia1 puede ser simplemente un promotor Nia1 unido con una secuencia que codifica para un canal de protones (sin ninguna secuencia de destinación a membrana tilacoidal) por lo que el canal de protones se insertará en la membrana plasmática celular pero no en la membrana fotosintética tilacoidal.

De acuerdo a una de varias representaciones, es una práctica preferida usar el mismo promotor inducible tal como el promotor Nia1 para controlar la expresión de tanto el gen del canal de protones como el gen de las vías de producción de biocombustibles. De esta manera, las vías de producción de biocombustibles pueden ser expresadas induciblemente y de manera simultánea con la expresión del gen del canal de protones de diseño el que finaliza ciertas funciones celulares incluyendo la división celular y el apareamiento.

En una de varias representaciones, un promotor inducible que puede ser usado en esta representación de bioseguridad de diseño es seleccionado del grupo consistente en los promotores de hidrogenasa [HydA1 (Hyd1) y HydA2, número de acceso: AJ308413, AF289201, AY090770], el promotor del gen *Cyc6*, el promotor del gen *CpxI*, el promotor de la proteína de choque térmico HSP70A, el promotor del gen *CabII-1* (número de acceso M24072), el promotor del gen *Ca1* (número de acceso P20507), el promotor del gen *Ca2* (número de acceso P24258), el promotor del gen de la nitrato reductasa (*Nia1*), el promotor del gen de la nitrito reductasa (*nirA*), el promotor del gen de la hidrogenasa bidireccional *hox*, los promotores de respuesta a luz y calor *groE*, el promotor del operón de Rubisco *rbcL*, el promotor inducible por metal (zinc) *smt*, el promotor de respuesta a hierro *idiA*, el promotor de respuesta a redox *crhR*, el promotor del gen de choque térmico *hsp16.6*, el promotor del gen de la proteína pequeña de choque térmico (Hsp), los promotores del gen de la anhidrasa carbónica de respuesta a CO₂, el promotor de respuesta a luz verde/roja *cpcB2A2*, los promotores de respuesta a luz UV *lexA*, *recA* *yruvB*, el promotor del gen de la nitrato reductasa (*narB*), y combinaciones de estas.

En otra representación, un organismo fotosintético de diseño con división celular controlable es creado mediante el uso de un mutante deficiente anhidrasa carbónica o un mutante con altos requerimientos de CO₂ como organismo huésped para crear el organismo productor de biocombustible de diseño. Mutantes con altos requerimientos de CO₂ pueden ser seleccionados para su uso en esta invención incluyen (pero no se limitan a): *Chlamydomonas reinhardtii* deficiente en anhidrasa carbónica, mutante 12-1C (CC-1219 cal mt-), *Chlamydomonas reinhardtii* mutante *cia3* (*Plant Physiology* 2003, 132:2267-2275), el mutante con altos requerimientos de CO₂ M3 de *Synechococcus* sp. Cepa PCC 7942, o las células deficientes en carboxisomas de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Plant biol* (Stuttg) 2005, 7:342-347) el que no tiene el mecanismo concentrador de CO₂ y pueden crecer de manera fotoautotrófica solo bajo elevadas concentraciones de CO₂ tales como 0,2-3% CO₂.

Bajo la concentración atmosférica de CO₂ (380 ppm), los mutantes deficientes en anhidrasa carbónica o que requieren altos niveles de CO₂ usualmente no sobreviven. Por lo tanto, el concepto clave aquí es que un organismo de diseño productor de biocombustible de diseño con altos requerimientos de CO₂ que carece de un

mecanismo concentrador de CO₂ crecerá y será usado para la producción fotobiológica de biocombustibles siempre a elevados niveles de concentración de CO₂ (0,2-5%) es un biorreactor sellado con suministro de CO₂. Dicho organismo de diseño no podrá sobrevivir cuando sea expuesto a una concentración atmosférica de CO₂ (380ppm = 0,038% CO₂) debido a que su mecanismo de concentración de CO₂ (en inglés, CCM) para la fijación fotosintética efectiva de CO₂ ha sido dañado por la mutación. Incluso si dicho organismo de diseño es liberado accidentalmente al medio ambiente natural, su célula prontamente se volverá incapaz de dividirse o aparearse, y morirá rápidamente por falta de carbono ya que no puede realizar de manera efectiva la fijación fotosintética de CO₂ a la concentración atmosférica de CO₂ (380 ppm). Por lo tanto, el uso de dichos mutantes con altos requerimientos de CO₂ como organismo huésped para la transformación genética de los genes de las vías de producción de biocombustibles de diseño representa otra manera de crear innovativos organismos de diseño con división celular controlable para la producción fotobiológica de biocombustibles a partir de CO₂ y H₂O y con resguardo de la bioseguridad. Aquí no se requiere un gen para un canal de protones de diseño.

En adición al uso innovativo de un mutantes con altos requerimientos de CO₂, un *Thermosynechococcus elongatus* (such as *T. elongatus* BP-1) altamente termofílico y que puede crecer dentro de un fotobiorreactor a una temperatura tan alta como 55°C pero que no puede crecer ni sobrevivir fuera del biorreactor a menos de 30°C es usado como organismo huésped como una aproximación adicional para crear organismos fotosintéticos transgénicos con resguardo de bioseguridad. Debido a que este organismo termofílico puede crecer solo dentro del biorreactor a una temperatura tan alta como 55°C pero no puede crecer ni sobrevivir fuera del biorreactor a menos de 30°C, el uso de este tipo de organismo altamente termofílico como organismo huésped para la transformación genética con genes para las vías de producción de biocombustibles para crear organismos fotosintéticos transgénicos provee de una característica de bioseguridad asegurada en concordancia con la presente invención.

En otra representación, un organismo de diseño con división celular controlable (Fig.3B) es creado mediante el uso de un gen regulador del ciclo de división celular como gen de control de la bioseguridad (Fig. 2G) el que puede controlar la expresión de los genes del ciclo de división (cdc) en el organismo huésped de manera tal que

pueda apagar de manera inducible sus funciones reproductivas tal como apagar permanentemente la capacidad de división celular y apareamiento cuando se usa el inductor específico del gen de diseño.

Biológicamente, es la expresión de los genes *cdc* naturales lo que controla el crecimiento celular y el ciclo de división en cianobacterias, algas y células vegetales superiores. La función básica del ciclo celular es duplicar adecuadamente la vasta cantidad de ADN en los cromosomas durante la fase S (S de síntesis) y luego segregar las copias de manera precisa en dos células hijas genéticamente idénticas durante la fase M (M de mitosis). La mitosis comienza típicamente con la condensación del cromosoma: las hebras de ADN duplicadas, empaquetadas a cromosomas alargados, se condensan en los mucho más compactos cromosomas requeridos para la segregación. Luego se rompe el envoltorio nuclear, y los cromosomas replicados, cada uno consistente en un par de cromátidas hermanas, se unen a los microtúbulos del huso mitótico. Mientras procede la mitosis, la célula se detiene brevemente en un estado llamado metafase, cuando los cromosomas están alineados en el ecuador del huso mitótico, en posición para la segregación. La repentina segregación de las cromátidas hermanas marca el inicio de la anafase durante la cual los cromosomas se mueven a los polos opuestos del huso, en donde se de-condensan y reforman un núcleo intacto. La célula es luego apretada hasta dividirse en dos por la división citoplasmática (citoquinesis) y la división celular es entonces completada. Nótese, la mayoría de las células requieren de mucho tiempo para crecer y doblar su masa de proteínas y organelos que luego requieren replicar su ADN (la fase S) y dividirse (la fase M). Por lo tanto, hay dos fases de intervalo: una fase G_1 entre la fase M y la fase S, y una fase G_2 entre la fase S y la mitosis. Como resultado, el ciclo celular eucariota está tradicionalmente dividido en cuatro fases secuenciales: G_1 , S, G_2 , y M. Fisiológicamente, las dos fases de intervalo también proveen tiempo para que la célula monitoree el ambiente interno y externo para asegurar que las condiciones son adecuadas y la preparación está completa antes de que la célula se comprometa para afrontar el golpe que significa la fase S y la mitosis. La fase G_1 es especialmente importante en este aspecto. Su longitud puede variar grandemente dependiendo en las condiciones externas y en las señales extracelulares de otras células. Si las condiciones extracelulares son desfavorables, por ejemplo, las células retrasarán el

progreso en G₁ y eventualmente pueden entrar a un estado especializado de reposo que se conoce como G₀ (G cero), en el cual puede permanecer por días, semanas, o incluso años antes de reasumir la proliferación. De hecho, muchas células se mantienen permanentemente en G₀ hasta que mueren.

En una de varias representaciones, un gen (o genes) de diseño que codifica para una proteína regulatoria cdc o un ARNi específico para cdc es usado para inhibir de manera inducible la expresión de ciertos genes cdc para detener la división celular e inhabilitar la capacidad de apareamiento cuando el gen (o genes) de diseño es gatillado por una condición específica de inducción. Cuando el cultivo de división celular controlable de diseño es crecido y está listo para la producción fotosintética de biocombustibles, por ejemplo, es una práctica preferida inducir la expresión de un gen (o genes) de diseño específico para un ARNi de cdc junto con la inducción de los genes de las vías producción de biocombustibles de diseño, de manera tal que las células se detendrán permanentemente en la fase G₁o en el estado G₀. De esta manera, las células ya crecidas del organismo de diseño serán catalizadores perfectos para la producción fotosintética de biocombustibles a partir de CO₂ y H₂O mientras que sus funciones de división celular y apareamiento estarán permanentemente apagadas manteniéndose en la fase G₁o el estado G₀ para ayudar a asegurar la bioseguridad.

El uso de representaciones bioseguras con varios genes de vías de producción de biocombustibles de diseño que se encuentran listados en las SEQ ID NOS: 1–45 (and 58–165) pueden crear varios productores de biocombustible con resguardo de bioseguridad (Figs. 3A, 3B, y 3C). Nótese, SEQ ID NOS: 46 y 1–12 (ejemplos 1–12) representan un ejemplo de un organismo eucariota de diseño con división celular controlable tal como un alga de diseño con división celular controlable (p.ej., *Chlamydomonas*) que contiene un gen para un canal de protones controlado por el promotor Nia1 (SEQ ID NO: 46) y un conjunto de genes de diseño vías de producción de butanol controlado por el promotor Nia1 (SEQ ID NOS: 1–12). Debido a que el gen del canal de protones y el gen (o genes) de las vías de producción de biocombustibles de diseño son todos controlados por el mismo promotor Nia1, pueden ser simultáneamente expresados luego de la inducción agregando fertilizante de nitrato al medio de cultivo para proveer la capacidad productora fotosintética de biocombustible con resguardo de bioseguridad como se ilustra en la Fig. 3B. El uso de los genes de

diseño de las vías de producción de butanol controlados por el promotor Nia1 (SEQ ID NOS: 1–12) en un organismo fotosintético huésped con altos requerimientos de CO₂, tal como el mutante 12-1C (CC-1219 cal mt-) de *Chlamydomonas reinhardtii* deficiente en anhidrasa carbónica o el mutante *cia3* de *Chlamydomonas reinhardtii*, representan otro ejemplo en crear un organismo fotosintético de división celular controlable de diseño que ayuda a asegurar la bioseguridad.

Esta característica de resguardo de la bioseguridad puede ser útil para la producción de otros biocombustibles tales como biodiesel, biohidrógeno, etanol, y también sus productos intermediarios. Por ejemplo, esta representación biosegura en combinación con un conjunto de genes para vías de producción de etanol de diseño tales como las mostradas en las SEQ ID NOS: 47-53 pueden representar un productor de etanol con división celular controlable. (Fig. 3C). Brevemente, SEQ ID NO: 47 presenta el ejemplo 47 para un constructo de ADN detallado (1360 pares de bases (pb)) de un gen para la Gliceraldehído-3-Fosfato-Deshidrogenasa dependiente de NAD controlado por el promotor *nirA* que incluye: un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 88-pb *nirA* (21–108) seleccionado de la secuencia que codifica para el promotor del gen de la nitrito reductasa de *Synechococcus* sp. (cianobacteria de agua dulce), (109–1032) seleccionado y modificado de una secuencia para la Gliceraldehído-3-Fosfato-Deshidrogenasa dependiente de NAD citosólica de *Cyanidium caldarium* (GenBank número de acceso: CAC85917), un terminador de 308-pb *rbcS* de *Synechococcus* (1033–1340), y un partidor PCR RE (1341–1360) en el extremo 3'.

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

La SEQ ID NO: 49 presenta el ejemplo 49 para un constructo de ADN de diseño para la Fosfoglicerato Mutasa controlada por el promotor *nirA* (1990 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 88-pb para la nitrito reductasa *nirA* de

Synechococcus sp. cepa PCC 7942 (21–108), un sitio de 9-pb Xho I NdeI (109–117), una secuencia que codifica para la fosfoglicerato mutasa (118–1653) seleccionada y modificada de una secuencia para la fosfoglicerato mutasa de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903 (GenBank: ABP67536), un sitio de 9-bp XbaI (1654–1662), un terminador de 308-pb *rbcS* de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (1663–1970), y un partidor PCR RE (1971–1990).

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

La SEQ ID NO: 51 presenta el ejemplo 51 para un constructo de ADN de diseño para la Piruvato Quinasa controlada por el promotor *nirA* (1888 bp) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 88-pb para la nitrito reductasa *nirA* de *Synechococcus* (21–108), un sitio de 9-pb Xho I NdeI (109–117), una secuencia que codifica para la Piruvato Quinasa (118–1530) seleccionada de una secuencia para la Piruvato Quinasa de *Selenomonas ruminantium* (GenBank: AB037182), una secuencia de 21-bp para el tag Lumio (1531–1551), un sitio 9-bp XbaI (1552–1560), un terminador de 308-pb *rbcS* de *Synechococcus* (1561–1868), y un partidor PCR RE (1869–1888).

La SEQ ID NO: 52 presenta el ejemplo 52 para un constructo de ADN de diseño para la Piruvato Decarboxilasa controlada por el promotor *nirA* (2188 bp) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 88-pb para la nitrito reductasa *nirA* de *Synechococcus* (21–108), un sitio de 9-pb Xho I NdeI (109–117), una secuencia que codifica para la Piruvato Decarboxilasa (118–1830) seleccionada de una secuencia para la Piruvato Decarboxilasa de *Pichia stipitis* (GenBank: XM_001387668), una secuencia de 21-bp para el tag Lumio (1831–1851), un sitio 9-bp XbaI (1852–1860), un terminador de 308-pb *rbcS* de *Synechococcus* (1861–2168), y un partidor PCR RE (2169–2188) en el extremo 3'.

La SEQ ID NO: 53 presenta el ejemplo 53 para un constructo de ADN de diseño para la Alcohol Deshidrogenasa dependiente de NAD(P)H controlada por el promotor *nirA* (1510 bp) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 88-pb para la nitrito reductasa *nirA* de *Synechococcus* (21–108), una secuencia que codifica para la Alcohol Deshidrogenasa dependiente de NAD(P)H(109–1161) seleccionada/modificada (se remueve la secuencia del péptido señal de destinación mitocondrial) de la secuencia de la alcohol deshidrogenasa (ADH3) de *Kluyveromyces lactis* (GenBank: X62766), una secuencia de 21-bp para el tag Lumio (1162–1182), un terminador de 308-pb *rbcS* de *Synechococcus*(1183–1490), y un partidor PCR RE(1491–1510) en el extremo 3'.

Nótese, las SEQ ID NOS: 47-53 (ejemplos de constructos de ADN 47-53) representan un conjunto de genes para vías de producción de etanol controladas por el promotor *nirA* que pueden ser usados en oxifotobacterias tal como *Synechococcus sp.* cepa PCC 7942. El uso de este conjunto de genes de vías de producción de etanol de diseño en una cianobacteria con altos requerimientos de CO₂ tal como *Synechococcus sp.* cepa PCC 7942, mutante M3, representa otro ejemplo de una cianobacteria de diseño con división celular controlable para la producción fotosintética de biocombustibles a partir de CO₂ y H₂O y con resguardo de la bioseguridad.

Más sobre la Producción de Diseño de Butanol y Alcoholes Superiores Relacionados Canalizada del Ciclo de Calvin

La presente invención divulga además vías fotosintéticas dependientes de NADPH (dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato) mejoradas y canalizadas a partir del ciclo de Calvin, sus constructos de ADN asociados (genes de diseño), y organismos fotosintéticos transgénicos de diseño para la producción fotobiológica de butanol y alcoholes superiores relacionados a partir de dióxido de carbono y agua. En este contexto y a través de la presente especificación y como se ha mencionado anteriormente, un "alcohol superior" o un "alcohol superior relacionado" se refiere a un alcohol que incluye al menos cuatro átomos de carbono, incluyendo tanto alcoholes superiores ordenados en cadena lineal o ramificada tales como 1-butanol y 2-metil-1-butanol. Las vías mejoradas canalizadas del ciclo de Calvin y dependientes de NADPH son construidas con enzimas de diseño en organismos fotosintéticos huéspedes tales

como algas y oxifotobacterias (incluyendo cianobacterias y oxiclorobacterias), organismos que son adecuados para la producción fotobiológica de butanol y alcoholes superiores relacionados.

El mencionado butanol y alcoholes superiores relacionados son seleccionados del grupo consistente en: 1-butanol, 2-metil-1-butanol, isobutanol, 3-metil-1-butanol, 1-hexanol, 1-octanol, 1-pentanol, 1-heptanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, 5-metil-1-heptanol, 4-metil-1-pentanol, 5-metil-1-hexanol, y 6-metil-1-heptanol. Los organismos fotosintéticos de diseño. Los organismos fotosíntesis de diseño como las algas y oxifotobacterias (incluyendo cianobacterias y oxiclorobacterias) transgénicas de diseño incluyen genes para las vías fotosintéticas mejoradas dependientes de NADPH y canalizadas con el ciclo de Calvin y que incluyen tecnología de resguardo de la bioseguridad para aumentar la producción fotobiológica de butanol y alcoholes superiores relacionados a partir de dióxido de carbono y agua.

La división fotosintética del agua y el proceso asociado de transporte de electrones acoplado con la gradiente de protones genera la energía química que se almacena en la forma de adenosina trifosfato (ATP) y un poder reductor en la forma de dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato (NADPH). Sin embargo, algunas vías metabólicas relacionadas con el butanol tal como la butanol deshidrogenasa dependiente de NADH (GenBank número de accesos: YP_148778, NP_561774, AAG23613, ZP_05082669, ADO12118, ADC48983) pueden usar solo dinucleótido de nicotinamida adenina (NADH) pero no NADPH. Por lo tanto, para lograr un verdadero acoplamiento de la vía de diseño con el ciclo de Calvin para la producción fotosintética de butanol y alcoholes superiores relacionados, es una práctica preferida el usar un mecanismo de conversión NADPH/NADH efectivo y/o enzimas que usen NADPH (tales como las enzimas dependientes de NADPH) en la construcción de una (o más) vía de diseño que se acople con el proceso de fotosíntesis/ciclo de Calvin de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo a una de las varias representaciones, un número de varias vías canalizadas con el ciclo de Calvin pueden ser creadas con el uso de un mecanismo de conversión NADPH/NADH en combinación con ciertas vías metabólicas de aminoácidos para la producción de butanol y alcoholes superiores relacionados a partir de dióxido de carbono y agua. Las vías fotosintéticas dependientes de NADPH,

mejoradas y canalizadas con el ciclo de Calvin son típicamente construidas con enzimas de diseño que son selectivamente expresadas a través del uso de genes de diseño en un organismo fotosintético huésped de diseño tal como un alga o cianobacteria huésped para la producción de butanol y alcoholes superiores. Una lista con ejemplos de enzimas que pueden ser seleccionadas para su uso en la construcción de vías fotosintéticas dependientes de NADPH, mejoradas y canalizadas con el ciclo de Calvin son presentadas en la Tabla 1. Como se muestra en las figuras 4-10, los resultados netos de vías fotosintéticas dependientes de NADPH, mejoradas y canalizadas con el ciclo de Calvin de diseño son la producción de butanol y alcoholes superiores relacionados a partir de dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O) usando el ATP (Adenosina trifosfato) NADPH (dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato) generado fotosintéticamente. Una característica significativa es la utilización innovativa de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34** y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) **35** para servir como un mecanismo de conversión NADPH/NADH el que puede convertir cierta cantidad del NADPH generado fotosintéticamente a NADH el que luego puede ser usado por las enzimas de las vías que requieren NADH tales como la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADH **43** (ejemplo de su gen codificante con los números de accesos GenBank: BAB59540, CAA89136, NP_148480) para la producción de butanol y alcoholes superiores.

Más específicamente, una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34** (p.ej., números de accesos GenBank: ADC37857, ADC87332, YP_003471459, ZP_04395517, YP_003287699, ZP_07004478, ZP_04399616) cataliza la siguiente reacción que usa NADPH para reducir 1,3-Difosfoglicerato (1,3-DiPGA) a 3-Fosfoglicialdehído (3-PGAlD) y fosfato inorgánico (Pi):



A su vez, una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente NAD **35** (p.ej., GenBank: ADM41489, YP_003095198, ADC36961, ZP_07003925, ACQ61431, YP_002285269, ADN80469, ACI60574) cataliza la oxidación de 3-PGAlD por dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado (NAD⁺) de vuelta a 1,3-DiPGA:



El resultado neto de las reacciones enzimáticas [3] y [4] es la conversión del NADPH generado fotosintéticamente a NADH, el que puede ser usado por varias enzimas de vías que requieren NADH tal como la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADH **43** para producir butanol y alcoholes superiores relacionados. Cuando hay mucho NADH, este sistema de conversión NADPH/NADH puede operar de manera reversa para balancear el suministro de NADH y NADPH. Por lo tanto, es una práctica preferida el utilizar innovativamente este sistema de conversión NADPH/NADH bajo el control de un promotor de diseño conmutable tal como el promotor *nirA* (oNial para un sistema eucariota) cuando/si se necesita lograr una producción robusta de butanol y alcoholes superiores relacionados. Varias vías canalizadas con el ciclo de Calvin de diseño en combinación con un mecanismo de conversión NADPH/NADH con algunas vías metabólicas de aminoácidos para la producción fotobiológica de butanol y alcoholes superiores relacionados son descrito con mayor detalle en las siguientes secciones.

Tabla1 listas de ejemplos de enzimas para la construcción de vías relacionadas con el ciclo de Calvin de diseño para la producción de butanol y alcoholes superiores relacionados.

Enzima /número de denominación	Fuente (Organismo)	Número de acceso GenBank, JGI Protein ID o Citation
03: Fosfoglicerato mutasa (fosfogliceromutasa)	<i>Oceanithermus profundus</i> DSM 14977; ' <i>Nostoc azollae</i> ' 0708; <i>Thermotoga lettingae</i> TMO; <i>Syntrophothermus lipocalidus</i> DSM 12680; <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Fervidobacterium nodosum</i> Rt17-B1; <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725; <i>Fervidobacterium nodosum</i> Rt17-B1; <i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1; <i>Deferribacter desulfuricans</i> SSM1; <i>Cyanobium</i> sp. PCC 7001; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 8802; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cytoplasm; <i>Aspergillus fumigatus</i> ; <i>Coccidioides immitis</i> ; <i>Leishmania braziliensis</i> ; <i>Ajellomyces capsulatus</i> ; <i>Monocercomonoides</i> sp.; <i>Aspergillus clavatus</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Zea mays</i>	ADR35708; ADI65627, YP_003722750; YP_001470593, ABV33529; ADI02216, YP_003702781; YP_001212148; YP_001409891; YP_002573254, YP_002573195; ABS60234; ABQ47079, YP_001244998; YP_003496402, BAI80646; ZP_05046421; YP_003138980, YP_003138979; JGI Chlre2 protein ID 161689, GenBank: AF268078; XM_747847; XM_749597; XM_001248115; XM_001569263; XM_001539892; DQ665859; XM_001270940; NM_117020; M80912
04: Enolasa	<i>Syntrophothermus lipocalidus</i> DSM 12680; ' <i>Nostoc azollae</i> ' 0708; <i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1;	ADI02602, YP_003703167; ADI63801; ABQ46079;

	<i>Spirochaeta thermophila</i> DSM 6192; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1, <i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9301; <i>Synechococcus</i> sp. WH 5701; <i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS101; <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413; <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> citoplasma; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Leishmania Mexicana</i> ; <i>Lodderomyces elongisporus</i> ; <i>Babesia bovis</i> ; <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ; <i>Pichia guilliermondii</i> ; <i>Spirotrichonympha leidy</i> ; <i>Oryza sativa</i> ; <i>Trimastix pyriformis</i> ; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ; <i>Davidiella tassiana</i> ; <i>Aspergillus oryzae</i> ; <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ; <i>Brassica napus</i> ; <i>Zea mays</i>	YP_003875216, ADN02943 ; YP_003886899, ADN13624; YP_003432637, BAI69436 ; BAC08209; ABO16851; ZP_01083626; ABG51970; ABA23124; BAB75237; GenBank: X66412, P31683; AK222035; DQ221745; XM_001528071; XM_001611873; XM_001594215; XM_001483612; AB221057; EF122486, U09450; DQ845796; AB088633; U82438; D64113; U13799; AY307449; U17973;
05: Piruvatoquinasa	<i>Syntrophothermus lipocalidus</i> DSM 12680; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 8802; <i>Thermotoga lettingae</i> TMO; <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725; <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1; <i>Thermosiphon melanesiensis</i> BI429; <i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1; <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425; <i>Acaryochloris marina</i> MBIC11017; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 8801; <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822; <i>cyanobacterium UCYN-A</i> ; <i>Arthrospira maxima</i> CS-328; <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cytoplasm; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Babesia bovis</i> ; <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ; <i>Trichomonas vaginalis</i> ; <i>Pichia guilliermondii</i> ; <i>Pichia stipitis</i> ; <i>Lodderomyces elongisporus</i> ; <i>Coccidioides immitis</i> ; <i>Trimastix pyriformis</i> ; <i>Glycine max</i> (soybean)	ADI02459, YP_003703024; YP_002372431; YP_001471580, ABV34516; YP_002573139; YP_148872; NP_681306, BAC08068; YP_001306168, ABR30783; YP_001244312, ABQ46736; ABP67416, YP_001180607; ACL43749, YP_002482578; YP_001514814; YP_003138017; YP_001655408; YP_003890281; YP_003422225; ZP_03273505; ZP_05035056; JGI Chlre3 protein ID 138105; GenBank: AK229638; AY949876, AY949890, AY949888; XM_001612087; XM_001594710; XM_001329865; XM_001487289; XM_001384591; XM_001528210; XM_001240868; DQ845797; L08632
06a: Piruvato -NADP ⁺ oxidoreductasa	<i>Peranema trichophorum</i> ; <i>Euglena gracilis</i>	GenBank: EF114757; AB021127, AJ278425;
06b: Piruvato -ferredoxina oxidoreductasa	<i>Mastigamoeba balamuthi</i> ; <i>Desulfovibrio africanus</i> ; <i>Entamoeba histolytica</i> ; <i>Trichomonas vaginalis</i> ; <i>Cryptosporidium parvum</i> ; <i>Cryptosporidium baileyi</i> ; <i>Giardia lamblia</i> ; <i>Entamoeba histolytica</i> ; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> ; <i>Clostridium pasteurianum</i> ;	GenBank: AY101767; Y09702; U30149; XM_001582310, XM_001313670, XM_001321286, XM_001307087, XM_001311860, XM_001314776, XM_001307250; EF030517; EF030516; XM_764947; XM_651927; AB042412; Y17727
07: Tiolaso o acetil-CoA acetiltransferasa (EC 2.3.1.9)	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ; <i>Aeropyrum pernix</i> K1 <i>Bacillus subtilis</i> ;	GenBank: AB190764; NP_148577, NP_147604; KFC31530, KFC30638;

	<i>butyrate-producing bacterium L2-50</i> ; <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824; <i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052; <i>Clostridium</i> sp. DL-VIII; <i>Clostridium pasteurianum</i> DSM 525; <i>Clostridium cellulovorans</i> 743B; <i>Clostridium carboxidivorans</i> P7; <i>Clostridium haemolyticum</i> NCTC 9693; <i>Clostridium novyi</i> B str. ATCC 27606; <i>Clostridium acetium</i> ; <i>Clostridium pasteurianum</i> NRRL B-598; <i>Syntrophothermus lipocalidus</i> DSM12680; <i>Sulfobacillus acidophilus</i> DSM 10332; <i>Kyrpidia tusciae</i> DSM 2912; <i>Geobacillus thermoleovorans</i> ; <i>Exiguobacterium</i> sp. AT1b; <i>Anoxybacillus</i> sp. BCO1; <i>Thermotoga lettingae</i> TMO; <i>Kosmotoga olearia</i> TBF 19.5.1; <i>Fervidobacterium nodosum</i> Rt17-B1; <i>Archaeoglobus sulfaticallidus</i> PM70-1; <i>Methanothermobacter</i> sp. CaT2; <i>Methanocella conradii</i> HZ254; <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3; <i>Bacillus metanolicus</i> MGA3; <i>Geobacillus</i> sp. JF8; <i>Thermus</i> sp. CCB_US3_UF1; <i>Schleiferia thermophila</i> str. Yellowstone;	DQ987697; Z92974; EDV69072, EDV66074,YP_490465,EDX40880 ; NP_149242; ABR32599, ABR35750; EHI99795, EHI97451; KER14812, KER12654; ADL52748,ADL49976; ADO12109, EET85014; KEI18159; KEI13236; KJF28669; ETD70327, ETD69108; ADI01070, ADI02832,ADI02736, ADI01249; AEW06715, AEW06150; ADG07885,ADG05293; AEV21117, AEV18833; ACQ69746; KHF30322; ABV34112; ACR79316; ABS60179; AGK61581,AGK61418; BAM69958; YP_005381694, YP_005380728; NP_142626; AIE61589; AGT33759,AGT33346; AEV16506; KFD38991;
08: 3-Hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa	<i>Clostridium beijerinckii</i> ; <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ; <i>Ajellomyces capsulatus</i> ; <i>Aspergillus fumigatus</i> ; <i>Aspergillus clavatus</i> ; <i>Neosartorya fischeri</i> ; <i>Butyrate-producing bacterium L2-50</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> ; <i>Zobellia galactanivorans</i> ; <i>Clostridium pasteurianum</i> NRRL B-598; <i>Clostridium carboxidivorans</i> P7; <i>Pseudomonas batumici</i> ;	GenBank: AF494018; AB190764; XM_001537366; XM_741533; XM_001274776; XM_001262361; DQ987697; BT001208; Z92974, WP_013298133; YP_004739166, CAZ98887; ETD65676, ETD67822; ADO12108; KIH82523
09: Crotonasa	<i>Clostridium beijerinckii</i> ; <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ; <i>Butyrate-producing bacterium L2-50</i> ; <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> ; <i>Clostridium pasteurianum</i> NRRL B-598; <i>Clostridium perfringens</i> str. 13; <i>Geobacillus</i> sp. JF8; <i>Thermoanaerobacter</i> sp. YS13;	GenBank: AF494018; AB190764; DQ987697; Z92974, CAB07495, WP_013298137; ETD68658,ETD68657,ETD66584; BAB79801; AGT32321, AGT32312; KHO61061;
10: Butiril-CoA deshidrogenasa o Trans-enoil-CoA reductasa (Ter)(EC1.1.1.36)	<i>Clostridium beijerinckii</i> ; <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ; <i>Bacteria productora de butirato L2-50</i> ; <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> ; <i>Treponema denticola</i> ATCC 35405; <i>Treponema denticola</i> ATCC 35405;	GenBank: AF494018; AB190764; DQ987697; Z92974; 4GGO_A, 4GGP_D, 4FBG_P,4FBG_O;NP_971211;

	<i>Treponema denticola</i> ; <i>Bacteria</i> no cultivada; <i>Flavobacterium johnsoniae</i> ; <i>Clostridium pasteurianum</i> NRRL B-598; <i>Fibrobacter succinogenes</i> ;	WP_002669849,WP_002681770; AFH02847; WP_011921530,ABQ03048; ETD66981; WP_014545506, ACX74348;
11: Butiraldehído deshidrogenasa o aldehído/alcohol deshidrogenasa (AdhE2)	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicu</i> ; <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	GenBank: AY251646, AAP42563; YP_009076789, AAK09379;
12a: Butanol deshidrogenasa dependiente de NADH	<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Clostridium perfringens</i> str. 13; <i>Carboxydotherrmus hydrogenofomans</i> ; <i>Pseudovibrio</i> sp. JE062; <i>Clostridium carboxidivorans</i> P7; <i>Bacillus pseudofirmus</i> OF4; <i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831; <i>Slackia exigua</i> ATCC 700122; <i>Fusobacterium ulcerans</i> ATCC 49185; <i>Listeria monocytogenes</i> FSL J1-175; <i>Chlorobium chlorochromatii</i> CaD3; <i>Clostridium perfringens</i> D str. JGS1721; <i>Clostridium perfringens</i> NCTC 8239; <i>Clostridium perfringens</i> CPE str. F4969; <i>Clostridium perfringens</i> B str. ATCC 3626; <i>Clostridium botulinum</i> NCTC 2916; <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120; <i>Clostridium botulinum</i> CFSAN001628; <i>Wolinella succinogenes</i> ;	YP_148778,BAD77210 ; NP_561774, BAB80564; AAG23613; ZP_05082669,EEA96294 ; ADO12118; ADC48983, YP_003425875; NP_693981, BAC15015; ZP_06159969, EEZ61452; ZP_05633940; ZP_05388801; ABB28961; ZP_02952811; ZP_02641897; ZP_02638128; ZP_02634798; EDT24774; ZP_02614964, ZP_02614746; NP_488606,BAB76265; EKX78737; CAE10066;
12b: Butanol deshidrogenasa dependiente de NADPH	<i>Clostridium perfringens</i> str. 13; <i>Clostridium saccharobutylicum</i> ; <i>Subdoligranulum variabile</i> DSM 15176; <i>Butyrivibrio crossotus</i> DSM 2876; <i>Oribacterium</i> sp. oral taxon 078 str. F0262; <i>Clostridium</i> sp. M62/1; <i>Clostridium hathewayi</i> DSM 13479; <i>Subdoligranulum variabile</i> DSM 15176; <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> A2-165; <i>Blautia hansenii</i> DSM 20583; <i>Roseburia intestinalis</i> L1-82, <i>Bacillus cereus</i> Rock3-28; <i>Eubacterium rectale</i> ATCC 33656; <i>Clostridium</i> sp. HGF2; <i>Atopobium rimae</i> ATCC 49626; <i>Clostridium perfringens</i> D str. JGS1721; <i>Clostridium perfringens</i> NCTC 8239; <i>Clostridium butyricum</i> 5521; <i>Clostridium carboxidivorans</i> P7; <i>Clostridium botulinum</i> E3 str. Alaska E43; <i>Clostridium novyi</i> NT; <i>Clostridium botulinum</i> B str. Eklund; <i>Thermococcus</i> sp. AM4; <i>Fusobacterium</i> sp. D11; <i>Anaerococcus vaginalis</i> ATCC 51170; <i>Clostridium perfringens</i> ; <i>Anaerostipes caccae</i> DSM 14662; <i>Amphritea japonica</i> ; <i>Aquabacterium</i> sp. NJ1;	NP_562172, BAB80962; AAA83520; EFB77036; EFF67629, ZP_05792927; ZP_06597730,EFE92592; EFE12215,ZP_06346636; EFC98086,ZP_06115415; ZP_05979561; ZP_05615704, EEU95840; ZP_05853889, EEX22072; ZP_04745071, EEU99657; ZP_04236939, EEL31374; YP_002938098, ACR75964; EFR36834; ZP_03568088; ZP_02952006; ZP_02642725; ZP_02950013,ZP_02950012; ZP_06856327; YP_001922606,YP_001922335, ACD52989;YP_878939; YP_001887401; EEB74113; EFD81183; ZP_05473100, EEU12061; EDT27639, EDT24389; EDR98218; WP_026340117; KGM39209;
13: Almidón sintasa	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Phaseolus vulgaris</i> ; <i>Oryza sativa</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ;	GenBank:AF026422, AF026421, DQ019314, AF433156; AB293998; D16202, AB115917, AY299404; AF121673, AK226881;

	<i>Colocasia esculenta</i> ; <i>Amaranthus cruentus</i> ; <i>Parachlorella kessleri</i> ; <i>Triticum aestivum</i> ; <i>Sorghum bicolor</i> ; <i>Astragalus membranaceus</i> ; <i>Perilla frutescens</i> ; <i>Zea mays</i> ; <i>Ipomoea batatas</i>	NM_101044; AY225862, AY142712;DQ178026; AB232549; Y16340; AF168786; AF097922; AF210699; AF019297; AF068834;
14: Glucosa-1-fosfato adenililtransferasa	<i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Zea mays</i> ; <i>Chlamydia trachomatis</i> ; <i>Solanum tuberosum</i> (potato) ; <i>Shigella flexneri</i> ; <i>Lycopersicon esculentum</i>	GenBank: NM_127730, NM_124205, NM_121927, AY059862; EF694839, EF694838; AF087165; P55242; NP_709206; T07674
15: Fosfoglucomutasa	<i>Oryza sativa</i> plastid; <i>Ajellomyces capsulatus</i> ; <i>Pichia stipitis</i> ; <i>Lodderomyces elongisporus</i> ; <i>Aspergillus fumigatus</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Populus tomentosa</i> ; <i>Oryza sativa</i> ; <i>Zea mays</i>	GenBank: AC105932, AF455812; XM_001536436; XM_001383281; XM_001527445; XM_749345; NM_124561, NM_180508, AY128901; AY479974; AF455812; U89342, U89341
16: Hexosa- fosfato-isomerasa	<i>Staphylococcus carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i> TM300;	YP_002633806, CAL27621;
17: Alfa-amilasa; Beta-amilasa; Almidón fosforilasa;	<i>Hordeum vulgare</i> aleurone cells; <i>Trichomonas vaginalis</i> ; <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Dictyoglomus thermophilum</i> heat-gen estable de la amilasa; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Hordeum vulgare</i> ; <i>Musa acuminata</i> ; <i>Citrus hybrid</i> cultivar root; <i>Solanum tuberosum</i> chloroplast; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Triticum aestivum</i> ; <i>Ipomoea batatas</i> ;	GenBank: J04202; XM_001319100; EF143986; AY324649; NM_129551; X07896; GenBank: NM_113297; D21349; DQ166026; GenBank: AY098895; P53535; NM_113857, NM_114564; AF275551; M64362
18: Glucosa-fosfato (glucosa-6- fosfato) isomerasa	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Pichia stipitis</i> ; <i>Ajellomyces capsulatus</i> ; <i>Spinacia oleracea</i> cytosol; <i>Oryza sativa</i> citoplasma; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Zea mays</i>	JGI Chlre3 protein ID 135202; GenBank: M21696; XM_001385873 ; XM_001537043; T09154; P42862; NM_123638, NM_118595; U17225
19: Fosfofructosaquinasa	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Ajellomyces capsulatus</i> ; <i>Yarrowia lipolytica</i> ; <i>Pichia stipitis</i> ; <i>Dictyostelium discoideum</i> ; <i>Tetrahymena thermophila</i> ; <i>Trypanosoma brucei</i> ; <i>Plasmodium falciparum</i> ; <i>Spinacia oleracea</i> ;	JGI Chlre2 protein ID 159495; GenBank: NM_001037043, NM_179694, NM_119066, NM_125551; XM_001537193; AY142710; XM_001382359, XM_001383014; XM_639070; XM_001017610; XM_838827; XM_001347929; DQ437575;
20: Fructosa-difosfato aldolasa	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> chloroplast; <i>Fragaria x ananassa</i> cytoplasm; <i>Homo sapiens</i> ; <i>Babesia bovis</i> ; <i>Trichomonas vaginalis</i> ; <i>Pichia stipitis</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i>	GenBank: X69969; AF308587; NM_005165; XM_00160 9195; XM_001312327; XM_001312 338; XM_001387466; NM_120057, NM_001036644
21: Triose fosfato isomerasa	<i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ; <i>Chlorella pyrenoidosa</i> ; <i>Pichia guilliermondii</i> ; <i>Euglena</i>	GenBank: NM_127687, AF247559; AY742323; XM_001587391; AB240149; XM_001485684; DQ459379; AY742325; L36387; AY438596; U83414; EF575877;

		<i>intermedia</i> ; <i>Euglena longa</i> ; <i>Spinacia oleracea</i> ; <i>Solanum chacoense</i> ; <i>Hordeum vulgare</i> ; <i>Oryza sativa</i>	
34: Glicer aldehído-3- deshidrogenasa de NADPH	fosfato dependiente	<i>Staphylococcus aureus</i> 04-02981; <i>Staphylococcus lugdunensis</i> ; <i>Staphylococcus lugdunensis</i> HKU09; <i>Vibrio cholerae</i> BX 330286; <i>Vibrio</i> sp. Ex25; <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv.; <i>Vibrio cholerae</i> B33; <i>Grimontia hollisae</i> CIP 101886; <i>Vibrio mimicus</i> MB-451, <i>Vibrio coralliilyticus</i> ATCC BAA-450; <i>Vibrio cholerae</i> MJ-1236; <i>Zea mays</i> cytosolic NADP dependent; <i>Apium graveolens</i> ; <i>Vibrio cholerae</i> B33; <i>Vibrio cholerae</i> TMA 21; <i>Vibrio cholerae</i> bv. <i>albensis</i> VL426; <i>Vibrio orientalis</i> CIP 102891; <i>Vibrio cholerae</i> MJ-1236; <i>Vibrio cholerae</i> CT 5369-93; <i>Vibrio</i> sp. RC586; <i>Vibrio furnissii</i> CIP 102972; <i>Vibrio metschnikovii</i> CIP 69.14;	ADC37857; ADC87332; YP_003471459; ZP_04395517; YP_003287699; ZP_07004478, EFI00105; ZP_04399616 ZP_06052988, EEY71738; ZP_06041160; ZP_05886203; YP_002876243; NP_001105589; AAF08296; EEO17521; EEO13209; EEO01829; ZP_05943395; ACQ62447; ZP_06049761; ZP_06079970; ZP_05878983; ZP_05883187;
35: Glicer aldehído-3- deshidrogenasa de NAD	fosfato dependiente	<i>Edwardsiella tarda</i> FL6-60; <i>Flavobacteriaceae bacterium</i> 3519-10; <i>Staphylococcus aureus</i> 04-02981; <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> NCPPB 3335; <i>Vibrio cholerae</i> MJ-1236; <i>Streptococcus pyogenes</i> NZ131; <i>Helicobacter pylori</i> 908; <i>Streptococcus pyogenes</i> NZ131; <i>Staphylococcus lugdunensis</i> HKU09; <i>Vibrio</i> sp. Ex25; <i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i> ; <i>Pseudoxanthomonas dokdonensis</i> ; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ; <i>Vibrio cholerae</i> B33; <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> CIP 102761; <i>Vibrio</i> sp. RC586; <i>Grimontia hollisae</i> CIP 101886; <i>Vibrio furnissii</i> CIP 102972; <i>Acidithiobacillus caldus</i> ATCC 51756; <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120; <i>Vibrio cholerae</i> BX 330286; <i>Vibrio cholerae</i> TMA 21; <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120; <i>Pinus sylvestris</i> ; <i>Cheilanthes yavapensis</i> ; <i>Cheilanthes wootonii</i> ; <i>Astrolepis laevis</i> ;	ADM41489; YP_003095198; ADC36961; ZP_07003925; ACQ61431, YP_002878104; YP_002285269; ADN80469; ACI60574; ADC88142; ACY51070; ADK67090; ADK67075; ADK67085, ACH90636; ZP_04401333; ZP_06155532; ZP_06080908; ZP_06052393; EEX42220; ZP_05292346; CAC41000; EEO22474; EEO13042; CAC41000; CAA04942; ACO58643, ACO58642; ACO58624, ACO58623; CBH41484, CBH41483;
36: (R)-Citromalato sintasa (EC 2.3.1.182)		<i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Geobacter bemidjiensis</i> Bem; <i>Geobacter sulfurreducens</i> KN400; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Leptospira biflexa</i> serovar <i>Patoc</i> cepa 'Patoc 1 (Paris)'; <i>Leptospira biflexa</i> serovar <i>Monteralerio</i> ; <i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>Australis</i> ; <i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>Pomona</i> ; <i>Leptospira interrogans</i> serovar	YP_003433013, ADO45737, BAI69812; ACH38284; ADI84633; CP001719; ABK13757; ABK13756; ABK13755; ABK13753; ABK13754;

	<i>Autumnalis</i> ; <i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>Pyrogenes</i> ; <i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>Canicola</i> ; <i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>Lai</i> ; <i>Acetohalobium arabaticum</i> DSM 5501; <i>Leadbetterella byssophila</i> DSM 17132; <i>Bacteroides xylanisolvens</i> XB1A; <i>Mucilaginibacter paludis</i> DSM 18603; <i>Prevotella ruminicola</i> 23; <i>Flavobacterium johnsoniae</i> UW101; <i>Victivallis vadensis</i> ATCC BAA-548; <i>Prevotella copri</i> DSM 18205; <i>Alistipes shahii</i> WAL 8301; <i>Metilobacter tundripaludum</i> SV96; <i>Methanosarcina mazei</i> Go1;	ABK13752; ABK13751; ABK13750; ABK13749; ADL11763, YP_003998693; CBK66631; EFQ72644; ADE82919; ABQ04337; ZP_06244204, EFA99692; EFB36404, ZP_06251228 ; CBK64953; ZP_07654184; NP_632695;
37: (R)-2-Metilmalato deshidratasa (subunidades grande y pequeña) (EC 4.2.1.35)	<i>Eubacterium eligens</i> ATCC 27750 <i>Methanocaldococcus jannaschii</i> ; <i>Sebadella termitidis</i> ATCC 33386; <i>Eubacterium eligens</i> ATCC 27750;	YP_002930810, YP_002930809; P81291; ACZ06998; ACR72362, ACR72361, ACR72363, YP_002930808;
38: 3-Isopropilmalato deshidratasa (subunidades grande y pequeña) (EC 4.2.1.33)	<i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822; <i>Syntrophothermus lipocalidus</i> DSM 12680; <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903; <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI, <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725; <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903; <i>E. coli</i> ; <i>Spirochaeta thermophila</i> DSM 6192; <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Deferribacter desulfuricans</i> SSM1; <i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1; <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1; <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ;	ABQ46641, ABQ46640; YP_003886427, YP_003889452; ADI02900, ADI02899, YP_003703465, ADI01294; ABP66933, ABP66934; YP_001211082, YP_001211083; YP_002573950, YP_002573949; YP_001180124, YP_001180125; leuC, ECK0074, JW0071; leuD, ECK0073, JW0070; YP_003875294, YP_003873373; YP_001213069, YP_001213068; YP_003433547, YP_003432351; YP_003495505, YP_003495504; ACJ32977, ACJ32978; BAC08461, BAC08786; BAD76941, BAD76940; BAA18738, BAA18298; XP_001702135, XP_001696402;
39: 3-Isopropilmalato deshidrogenasa (EC 1.1.1.85)	<i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822; <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1; <i>Syntrophothermus lipocalidus</i> DSM; <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725; <i>Paludibacter propionigenes</i> WB4; <i>Leadbetterella byssophila</i> DSM 17132; <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903; <i>Thermus thermophilus</i> ; <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Spirochaeta thermophila</i> DSM 6192; <i>Deferribacter desulfuricans</i> SSM1; <i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1; <i>Volvox carteri</i> f. <i>nagariensis</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Ostreococcus tauri</i> ;	ABQ46392, YP_001243968; YP_003888480, ADN15205; BAC09152, NP_682390; ADI02898, YP_003703463; ADQ78220; YP_002573948; YP_003998692; ABP66935; AAA16706, YP_001180126; YP_001211084; YP_148510, BAD76942; YP_003433176; YP_003873639; YP_003495917; YP_002314961; XP_002955062, EFJ43816; XP_001701074, XP_001701073; XP_003083133;
40: 2- Isopropilmalato Sintasa (EC 2.3.3.13)	<i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 8802;	ABQ46395, YP_001243971; YP_003890122, ADN16847; ACU99797;

	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102; <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>E.coli</i> ; <i>Caldicellulosiruptor</i> <i>saccharolyticus</i> DSM 8903; <i>Syntrophothermus lipocalidus</i> DSM 12680; <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725; <i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1; <i>Deferribacter desulfuricans</i> SSM1; <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1; <i>Spirochaeta thermophila</i> DSM 6192; <i>Thermotoga lettingae</i> TMO; <i>Volvox</i> <i>carteri</i> f. <i>nagariensis</i>; <i>Micromonas</i> sp. RCC299; <i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>;	ACC82459; YP_001211081; YP_003432474, BAI69273; NP_414616, AAC73185; ABP66753, YP_001179944; YP_003703466, ADI02901; YP_148511, BAD76943; YP_002572404; YP_002314960, ACJ32975; YP_003496874, BAI81118; NP_682187, BAC08949; ADN03009, YP_003875282; YP_001469896, ABV32832; XP_002945733, EFJ52728; ACO69978, XP_002508720; XP_003063010, EEH52949; XP_001696603, EDP08580 ;
41: isopropilmalato isomerasasubunidades grande/pequeña (EC 4.2.1.33)	<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803; <i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1; <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1; <i>Spirochaeta thermophila</i> DSM 6192; <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> str. D23580; <i>Staphylococcus aureus</i> A5937; <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>philomiragia</i> ATCC 25015; <i>Neisseria lactamica</i>; <i>Francisella novicida</i> U112; <i>Staphylococcus aureus</i> A5937; <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 68-397; <i>Fusobacterium</i> sp. 2_1_31; <i>Francisella novicida</i> GA99- 3549; <i>marine bacterium</i> HP15; <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580; <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1; <i>Bordetella petrii</i> DSM 12804; <i>Agrobacterium vitis</i> S4;	YP_148509, YP_148508; YP_324467, YP_324466; NP_442926, NP_441618; YP_002314962, YP_002314963; NP_682024, NP_681699 ; YP_003873372; CBG23133, CBG23132 ; ZP_05702396; EET20545; AAA53236; ABK88972; EEV86047; ZP_05607839; EEO38992; EDN35429; ADP98363, ADP98362; YP_092517, YP_092516; YP_353947, YP_353945; YP_001631647, YP_001631646; YP_002551071, YP_002551071;
42: 2-cetoácido decarboxilasa (EC 4.1.1.72, etc)	<i>Lactococcus lactis</i>; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KF147; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>; <i>Kluyveromyces marxianus</i>; <i>Kluyveromyces lactis</i>; <i>Mycobacterium avium</i> 104; <i>Mycobacterium ulcerans</i> Agy99; <i>Mycobacterium bovis</i>; <i>Mycobacterium leprae</i>; <i>Proteus mirabilis</i> HI4320; <i>Staphylococcus aureus</i> 04-02981; <i>Acetobacter pasteurianus</i>; <i>Saccharomyces cerevisiae</i>; <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> CP4; <i>Mycobacterium tuberculosis</i>; <i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2 155; <i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Pasteur 1173P2;	AAS49166; ADA65057, YP_003353820; CAG34226; AAA35267; CAA59953; A0QBE6; A0PL16; Q7U140; Q9CBD6; YP_002150004; ADC36400; AAM21208; CAA39398; AAA27696; O53865; A0R480; A1KGY5;
43: Alcohol deshidrogenasa (dependiente de NAD) (EC 1.1.1.1);	<i>Thermoplasma volcanium</i> GSS1; <i>Gluconacetobacter</i> <i>hansenii</i>; <i>Saccharomyces cerevisiae</i>; <i>Aeropyrum pernix</i> K1; <i>Rhodobacterales bacterium</i> HTCC2083; <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110; <i>Syntrophothermus</i>	BAB59540 ZP_06834544; CAA89136; NP_148480; ZP_05073895; NP_769420; ADI01021;

	<i>lipocalidus</i> ; <i>Fervidobacterium nodosum</i> Rt17-B1; <i>Desulfotalea psychrophila</i> LSv54; <i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3283-03; <i>Gluconobacter oxydans</i> 621H; <i>Aeromonas hydrophila</i> ; <i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3283-01; <i>Streptomyces hygroscopicus</i> ; <i>Zymomonas mobilis</i> ; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A; <i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP1335; <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ; <i>Alcanivorax borkumensis</i> ; <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Geobacillus</i> sp. JF8; <i>Pseudomonas alcaligenes</i> OT 69; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Pseudomonas</i> sp. HMP271; <i>Erythrobacter</i> sp. JL475; <i>Komagataeibacter rhaeticus</i> AF1; <i>Hyphomonas atlantica</i> ; <i>Mastigocoleus testarum</i> ; <i>Blastomonas</i> sp. CACIA14H2;	YP_001411173; YP_065604; BAI03878; YP_192500; ABK38651; BAI00830; EFL29096; AFN57379; Q0KDL6; Q5HI63,Q2YSX0; Q5HRD6; EED91217,XP_002291110 ; WP_011337799; WP_011587359; P42328; NP_013800, EDN64471; AGT31264; EQM66009; KHE33423; KGK82208; KEO86527; KDU94382; KCZ64352; WP_027839825; ESZ87639;
44: Alcohol deshidrogenasa (dependiente de NADPH) (EC 1.1.1.2);	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Fusobacterium</i> sp. 7_1; <i>Pichia pastoris</i> GS115; <i>Pichia pastoris</i> GS115; <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655; <i>Clostridium hathewayi</i> DSM 13479; <i>Clostridium butyricum</i> 5521; <i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052; <i>Fusobacterium ulcerans</i> ATCC 49185; <i>Fusobacterium</i> sp. D11; <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> subsp. <i>desulfuricans</i> str. G20; <i>Clostridium novyi</i> NT; <i>Clostridium tetani</i> E88; <i>Aureobasidium pullulans</i> ; <i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054, <i>Thermotoga lettingae</i> TMO; <i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1; <i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EC1118; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> JAY291; <i>Klebsiella oxytoca</i> E718; <i>Clostridium intestinale</i> URNW; <i>Bacteria productora de butirato</i> SS3/4; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714; <i>Calothrix</i> sp. PCC 7507; <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> ; <i>Planktothrix mougeotii</i> ; <i>Synechococcus</i> sp. NKBG042902; <i>Synechococcus</i> sp. NKBG15041c; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 7509; <i>Dolichospermum circinale</i> ; <i>Neosynechococcus sphagnicola</i> sy1; <i>filamentous cyanobacterium</i> ESFC-1; <i>Fischerella</i> sp. PCC 9605; <i>Arthrospira platensis</i> ; <i>Spirulina subsalsa</i> ;	YP_001211038,BAF58669; ZP_04573952, EEO43462; XP_002494014,XP_002490014; CAY71835 XP_002492217,CAY67733; yqhD, NP_417484, AAC76047; EFC99049; ZP_02948287; AAT38119; ZP_05632371; ZP_05440863; YP_389756; YP_878957; NP_782735; ADG56699; ABN66271, XP_001384300; YP_001471424; YP_001244106; XP_001834460; CAY82157; EEU07174; YP_006496277,AFN30383; ERK32339; YP_007825178; WP_010874320, NP_443028; AIE73666; YP_007063887;; KHG39231; WP_026796109; WP_030008223; WP_028954057; WP_024545825; WP_028091627; KGF72916; WP_026222390; WP_026731746; KDR57756; WP_026079920;

	<i>Thermosynechococcus</i> sp. NK55a; <i>Thermus</i> sp. CCB_US3_UF1; <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Gracilibacillus halophilus</i> YIM-C55.5; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Geobacillus</i> sp. JF8; <i>Hyphomicrobium nitrivorans</i> NL23; <i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421; <i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS101; <i>Scytonema hofmanni</i> UTEX B 1581; <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120; <i>Fischerella</i> sp.; <i>Chlorogloeopsis fritschii</i> ;	AHB89154; AEV16814,AEV17127 ; BAF58669; KFC30246; ENH96132; YP_003433496, BAI70295; AGT31348; AHB47697; NP_923681; YP_722487; WP_029632527 NP_489374; WP_026735116, WP_026723997; WP_026087612
45: Fosfoenolpiruvato carboxilasa (EC 4.1.1.31)	<i>Thermaerobacter subterraneus</i> DSM 13965; <i>Cyanotheca</i> sp. PCC 7822; <i>Thermus</i> sp.; <i>Rhodothermus marinus</i> ; <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1; <i>Leadbetterella byssophila</i> DSM 17132; <i>Riemerella anatipestifer</i> DSM 15868; <i>Mucilaginibacter paludis</i> DSM 18603; <i>Truepera radiovictrix</i> DSM 17093; <i>Ferrimonas balearica</i> DSM 9799; <i>Meiothermus silvanus</i> DSM 9946; <i>Nocardiosis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111; <i>E. coli</i> , <i>Meiothermus ruber</i> DSM 1279; <i>Olsenella uli</i> DSM 7084; <i>Ktedonobacter racemifer</i> DSM 44963; <i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1; <i>Oceanithermus profundus</i> DSM 14977; <i>Bacteria marina</i> HP15; <i>Marivirga tractuosa</i> DSM 4126; <i>Mucilaginibacter paludis</i> DSM 18603; <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2); <i>Delftia acidovorans</i> SPH-1; <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serovar 13 str. N273; <i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9301; <i>Prochlorococcus marinus</i> str. NATL1A <i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9515; <i>Clostridium cellulovorans</i> 743B; <i>Neisseria meningitidis</i> Z2491; <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300; <i>Micromonospora</i> sp. L5; <i>Chlorobium phaeobacteroides</i> DSM 266; <i>Arthrobacter</i> sp. FB24; <i>Rhodomicrobium vanniellii</i> ATCC 17100; <i>Gordonia bronchialis</i> DSM 43247; <i>Thermus aquaticus</i> Y51MC23; <i>Burkholderia ambifaria</i> IOP40-10;	EFR61439; YP_003887888; BAA07723; CAA67760; NP_682702, BAC09464; YP_003998059, ADQ17706 ; ADQ81501, YP_004045007 ; EFQ77722; YP_003706036; YP_003911597, ADN74523; YP_003685046; YP_003681843; ZP_07594313, ZP_07565817; ADD27759; YP_003801346, ADK68466; ZP_06967036, EFH90147; NP_866412, CAD78193; ADR36285; ADP96559; ADR23252; ZP_07746438; NP_627344; ABX34873; ZP_07544559; ABO18389; ABM76577; ABM72969; YP_003842669, ADL50905; CAM07667; ABF44963; ZP_06399624; ABL64615; YP_830113; YP_004010507; YP_003273502; ZP_03496338; ZP_02894226;
46: Aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1)	<i>Thermotoga lettingae</i> TMO; <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301; <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942; <i>Thermosiphon melanesiensis</i> BI429; <i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1; <i>Thermus thermophilus</i> ; <i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1; <i>Bacillus</i> sp.; <i>E. coli</i> , <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Phormidium lapideum</i> ; <i>Fervidobacterium nodosum</i> Rt17-B1; <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426;	YP_001470126; YP_172275; YP_401562; YP_001306480; YP_001244588; BAA07487; YP_002315494; AAA22250; aspC: BAB34434; YP_001211971; BAB86290; YP_001410686, YP_001409589; YP_148025, YP_147632,

	<i>Thermosynechococcus elongatus BP-1</i> ; <i>Anoxybacillus flavithermus WK1</i> ; <i>Geobacillus kaustophilus HTA426</i> ; <i>Spirochaeta thermophila DSM 6192</i> ; <i>Caldicellulosiruptor bescii DSM 6725</i> ; <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus DSM 8903</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Glycine max</i> ; <i>Lupinus angustifolius</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Micromonas pusilla CCMP1545</i> ;	YP_146225;NP_683147; ACJ34747; BAD77213, BAD76064; YP_003874653; YP_002572445; YP_001179582; AAA79371; AAA33942; CAA42430; XP_001696609; XP_003060871;
47: Aspartoquinasa (EC=2.7.2.4)	<i>Thermotoga lettingae TMO</i> ; <i>Cyanothece sp. PCC 8802</i> ; <i>Thermotoga petrophila RKU-1</i> <i>Hydrogenobacter thermophilus TK-6</i> ; <i>Anoxybacillus flavithermus WK1</i> ; <i>Bacillus sp.</i> ; <i>Spirochaeta thermophila DSM 6192</i> ; <i>Anoxybacillus flavithermus WK1</i> ; <i>Geobacillus kaustophilus HTA426</i> ; <i>Syntrophothermus lipocalidus DSM 12680</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>Thermosynechococcus elongatus BP-1</i> ; <i>Fervidobacterium nodosum Rt17-B1</i> ; <i>Spirochaeta thermophila DSM 6192</i> ; <i>Pelotomaculum thermopropionicum SI</i> ; <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> ; <i>Caldicellulosiruptor bescii DSM 6725</i> ; <i>Thermosiphon melanesiensis BI429</i> ; <i>Thermotoga lettingae TMO</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ;	YP_001470361, ABV33297; YP_003136939; YP_001244864, YP_001243977; YP_003432105, BAI68904; ACJ35001; AAA22251; YP_003873788,ADN01515; ACJ34043, YP_002316986; BAD77480,YP_149048 ; ADI02230, YP_003702795; ZP_07594328,ZP_07565832; NP_682623,BAC09385; ABS59942, YP_001410786; YP_003873302, ADN01029; YP_001212149, YP_001211837; ABP66605; YP_002573821; YP_001307097, ABR31712; YP_001470985, ABV33921; CAA67376; XP_001698576, EDP08069, XP_001695256;
48: Aspartato-semialdehído deshidrogenasa	<i>Thermotoga lettingae TMO</i> ; <i>Trichodesmium erythraeum IMS101</i> ; <i>Prochlorococcus marinus str. MIT</i> ; <i>Thermotoga petrophila RKU-1</i> ; <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus DSM 8903</i> ; <i>Syntrophothermus lipocalidus DSM 12680</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>Fervidobacterium nodosum Rt17-B1</i> <i>Caldicellulosiruptor bescii DSM 6725</i> ; <i>Thermosiphon melanesiensis BI429</i> ; <i>Spirochaeta thermophila DSM 6192</i> ; <i>Pelotomaculum thermopropionicum SI</i> ; <i>Hydrogenobacter thermophilus TK-6</i> ; <i>Anoxybacillus flavithermus WK1</i> ; <i>Geobacillus kaustophilus HTA426</i> ; <i>Deferribacter desulfuricans SSM1</i> ; <i>Thermosynechococcus elongatus BP-1</i> ; <i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Polytomella parva</i> ; <i>Glycine max</i> ; <i>Zea mays</i> ; <i>Oryza sativa Indica Group</i> ;	YP_001470981, ABV33917; ABG50031; ABM76828; ABQ47283, YP_001244859; ABP67176, YP_001180367; ADI01804, YP_003702369; YP_001460230,YP_001464895; YP_001409594,ABS59937; YP_002573009; YP_001307092,ABR31707; YP_003875128, ADN02855; YP_001211836, BAF59467; YP_003432252,BAI69051; YP_002316029, ACJ34044; YP_147128, BAD75560; YP_003496635, BAI80879; NP_680860, BAC07622; AAG23574, AAG23573; XP_001695059, EDP02211; ABH11018; ACU30050; ACG41594; ABR26065;
49: Homoserinadeshidrogenasa	<i>Syntrophothermus lipocalidus DSM 12680</i> ; <i>Cyanothece sp. PCC 7822</i> ; <i>Caldicellulosiruptor bescii DSM 6725</i> ; <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus DSM 8903</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>Spirochaeta thermophila DSM 6192</i> ;	ADI02231, YP_003702796; YP_003887242; YP_002573819; ABP66607, YP_001179798; EFJ98002; YP_003873441,ADN01168;

	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1; <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Deferribacter desulfuricans</i> SSM1; <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1; <i>Glycine max</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Micromonas</i> sp. RCC299;	YP_001212151, BAF59782; YP_003431981, BAI68780; YP_002316756, ACJ34771; YP_148817, BAD77249; YP_003496401, BAI80645 ; NP_681068, BAC07830; ABG78600, AAZ98830; XP_001699712, EDP07408; ACO69662, XP_002508404;
50: Homoserinaquinasa (EC 2.7.1.39)	<i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822; <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725; <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903; <i>E. coli</i> ; <i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1; <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1; <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Prototheca wickerhamii</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Glycine max</i> ; <i>Zea mays</i> ;	YP_001243979, ABQ46403; YP_003886645; YP_002573820; ABP66606, YP_001179797; AP_000667, BAB96580; YP_002316754, ACJ34769; YP_148815, BAD77247; NP_682555, BAC09317; YP_001212150, BAF59781; YP_003433124, BAI69923 ; XP_001701899, EDP06874; ABC24954; NP_179318, AAD33097; ACU26535; ACG46592;
51: Treonina sintasa (EC 4.2.99.2)	<i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425; <i>Thermosiphon melanesiensis</i> BI429; <i>Syntrophothermus lipocalidus</i> DSM 12680; <i>E. coli</i> ; <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1; <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725; <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1; <i>Spirochaeta thermophila</i> DSM 6192; <i>Deferribacter desulfuricans</i> SSM1; <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426;	YP_001243978, ABQ46402; YP_002485009; YP_001306558, ABR31173; ADI02519, YP_003703084; AP_000668, NP_414545; YP_001213220; YP_002316755, ACJ34770; YP_002572552; YP_001180015, ABP66824; YP_003433070, YP_003433019, BAI69869, BAI69818; YP_148816, YP_147614; NP_682017, NP_681772, BAC08534, BAC08779; YP_003873303, ADN01030; YP_003495358, BAI79602;
52: Treoninaamonio-liase (EC 4.3.1.19)	<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9202; <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335; <i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1; <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1; <i>Deferribacter desulfuricans</i> SSM1; <i>E. coli</i> ; <i>Neisseria lactamica</i> ATCC 23970; <i>Citrobacter youngae</i> ATCC 29220; <i>Neisseria polysaccharea</i> ATCC 43768; <i>Providencia rettgeri</i> DSM 1131; <i>Neisseria subflava</i> NJ9703; <i>Mannheimia haemolytica</i> PHL213; <i>Achromobacter piechaudii</i> ATCC 43553; <i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13091; <i>Synechococcus</i> sp. CC9902; <i>Synechococcus</i> sp. WH 8109; <i>Cyanobium</i> sp. PCC 7001; <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413; <i>Microcoleus chthonoplastes</i> PCC 7420; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ;	BAD76058, BAD75876, YP_147626, YP_147444; ZP_05137562; ZP_05035047; ABQ46585, YP_001244161; YP_001210652, BAF58283; YP_002315804, YP_002315746; YP_003497384, BAI81628; YP_001746093, ZP_07690697; EEZ76650, ZP_05986317; EFE07783, ZP_06571237; EFH23894, ZP_06863451; EFE52186, ZP_06127162; EFC51529, ZP_05985502; ZP_04978734; ZP_06687730, ZP_06684811; ZP_07369980, EFM04207; ABB26032; ACA99606; ZP_05790446, EEX07646; EDY39077, ZP_05045768; ABA20300; ZP_05029756; XP_001701816, EDP06791;

53: Acetolactato sintasa (EC 2.2.1.6)	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903; <i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1; <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1; <i>Syntrophothermus lipocalidus</i> DSM 12680; <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Spirochaeta thermophila</i> DSM 6192; <i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1; <i>Deferribacter desulfuricans</i> SSM1; <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. W3110; <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, <i>Thermus aquaticus</i>; <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7424; <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413; <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120; <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803; <i>Synechococcus</i> sp. JA-2-3B'a (2-13); <i>Synechococcus</i> sp. JA-3-3Ab; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>; <i>Volvox carteri</i>; <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168; <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580;	ABP66750, ABP66751, YP_001179942, ABP66455, YP_001179941, YP_001179646; YP_001243976, YP_003345845, ADA66432, ADA66431, ABQ46399, YP_001243975, ABQ46400, YP_003345846; NP_682614, BAC09376, NP_681670, BAC08432, NP_682086 ; ADI02904, YP_003703469, ADI02903, YP_003703468; BAF58709, BAF58917, YP_001211286, YP_001211078; BAD76946, YP_148514, BAD76945, YP_148513; ACM59790, ACM59628, ACM59629, YP_002572563, YP_002572401, YP_002572402; YP_003432299, YP_003432300, BAI69099, BAI69098; YP_003874926, YP_003874927, ADN02654, ADN02653, ACJ33615, YP_002314957, ACJ32972, ACJ32973, YP_002314958; YP_003496879, BAI81123, YP_003496878, BAI81122; AP_004121, BAE77622, AP_00412 2, BAE77623, BAE77528, AP_004027, BAB96646, AP_000741; BAA12700; EDN64495, CAA89744, EDV09697; YP_001735999, ACB00744; YP_002376012; YP_324035; NP_487595, BAB75254; YP_001655615; NP_441297, BAA17984, CAA66718, NP_441304, NP_442206, BAA10276 ; YP_478353; YP_475372, ABD00213, ABD00270 , YP_475476, YP_475533; AAC03784, AAB88292, XP_001700185, EDO98300, XP_001695168, EDP01876; AAC04854, AAB88296; CAB07802 (AIsS); AAU42663 (AIsS);
54: Cetoácido reductoisomerasa (EC 1.1.1.86; ilvC)	<i>Syntrophothermus lipocalidus</i> DSM 12680; <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903; <i>E. coli</i>; <i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1; <i>Calditerrivibrio nitroreducens</i> DSM; <i>Spirochaeta thermophila</i> DSM 6192; <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1; <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725;	ADI02902, YP_003703467; ABP66752, YP_001179943; AAA67577, YP_001460567; ABQ46398, YP_001243974; YP_004050904; YP_003874858, ADN02585; YP_001211079, BAF58710; YP_003885458; YP_003433279, BAI70078; YP_002314959, ACJ32974; YP_002572403;

	<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Deferribacter desulfuricans</i> SSM1; <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425; <i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102; <i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS101; <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335; <i>Microcoleus chthonoplastes</i> PCC 7420; <i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9301; <i>Cyanobium</i> sp. PCC 7001; <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Pisum sativum</i> (pea); <i>Zea mays</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Polytomella parva</i> ; <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 (<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120);	YP_148512, BAD76944; YP_003496877, BAI81121; NP_683044, BAC09806; YP_002482078; ACC82013; ABG53327; ZP_05036558; ZP_05026584; ABO18124; EDY39000; ZP_07166132; CAA48253, NP_001078309; CAA76854; ACG35752; XP_001702649, EDP06428; ABH11013; BAB74014, NP_486355, WP_010996471;
55: Dihidroxi ácido deshidratasa (EC 4.2.1.9; ilvD)	<i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822; <i>Marivirga tractuosa</i> DSM 4126; <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Syntrophothermus lipocalidus</i> DSM 12680; <i>Spirochaeta thermophila</i> DSM 6192; <i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1; <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725; <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903; <i>E. coli</i> ; <i>Deferribacter desulfuricans</i> SSM1; <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102; <i>'Nostoc azollae'</i> 0708; <i>Arthrospira maxima</i> CS-328; <i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9301; <i>Cyanobium</i> sp. PCC 7001; <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335; <i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca; <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Oryza sativa</i> Indica Group; <i>Glycine max</i> ; <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 (<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120);	YP_001243973, ABQ46397; YP_003887466; YP_004053736; YP_147899, BAD76331, YP_147822, BAD76254; ADI02905, YP_003703470; YP_003874669, ADN02396; YP_002315593; YP_002572562; YP_001179645, ABP66454; ADR29155, YP_001460564; YP_003496880, BAI81124; NP_681848, BAC08610; YP_003431766, BAI68565; ACC82168, ADN14191; ADI62939; EDZ97146; ABO17457; ZP_05044537, EDY37846; ZP_05037932; ZP_06383646; BAG02689; XP_001693179, EDP03205; BAB03011; ABR25557; ACU26534; NP_486811, WP_010996924;
56: 2- Metilbutiraldehído reductasa (EC 1.1.1.265)	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i> yFS275; <i>Pichia pastoris</i> GS115; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c; <i>Aspergillus fumigatus</i> Af293; <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767; <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Kluyveromyces lactis</i> ; <i>Lachancea thermotolerans</i> CBS 6340; <i>Lachancea thermotolerans</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EC1118; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> JAY291;	XP_002173231, EEB06938; XP_002490018, CAY67737, XM_002489973; DAA12209, NP_010656 ,NM_001180676 ; XP_752003; XP_002770138; CAR65507; CAH02579; XP_002554884; CAR24447, CAR23718; CAY78868; EEU08013;
57: 3-Metilbutanal reductasa (EC 1.1.1.265)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EC1118;	DAA10635, NM_001183405, NP_014490; CAY86141;

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JAY291;	EEU07090;
07': 3-Cetotiolasa (reversible)	<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Azohydromonas lata</i> ; <i>Rhodoferrax ferrireducens</i> T118; <i>Allochrocatium vinosum</i> ; <i>Dechloromonas aromatica</i> RCB; <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17029; <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025; <i>Bacillus</i> sp. 256; <i>Silicibacter lacuscaerulensis</i> ITI-1157; <i>Aspergillus fumigatus</i> Af293; <i>Rhizobium etli</i> ; <i>Citricella</i> sp. SE45; <i>Silicibacter</i> sp. TrichCH4B; <i>Azohydromonas lata</i> ; <i>Chromobacterium violaceum</i> ; <i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL 12; <i>Alcaligenes</i> sp. SH-69; <i>Candida dubliniensis</i> CD36; <i>Pseudomonas</i> sp. 14-3; <i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357; <i>Aedes aegypti</i> ; <i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7424; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822; <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843;	YP_147173, BAD75605; YP_523526; CAA01849, CAA01846; YP_286222; YP_001041914; YP_001166229; ABX11181; ZP_05785678; XP_752635; AAK21958; ZP_05784120, ZP_05781517; ZP_05742998; AAC83659, AAD10275; AAC69616; ABV95064; AAP41838; CAX43351, XP_002418052; CAK18903; XP_002375989; EAT37298, EAT37297, XP_001654752, XP_001654751; ABN68380, XP_001386409; YP_002375827, ACK68959; YP_003886602, ADN13327; BAG04828;
08': 3-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	<i>Syntrophothermus lipocalidus</i> DSM 12680; <i>Oceanithermus profundus</i> DSM 14977; <i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1; <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Deferribacter desulfuricans</i> SSM1; <i>Glomerella graminicola</i> M1.001; <i>Legionella pneumophila</i> str. Corby; <i>Aspergillus fumigatus</i> Af293; <i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130; <i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10; <i>Coccidioides posadasii</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>Chelativorans</i> sp. BNC1; <i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102; <i>Oscillatoria</i> sp. PCC 6506;	YP_003702743, ADI02178, ADI01287, ADI01071; ADR36325; YP_002317076, YP_002315864; YP_001210823, BAF58454; YP_149248, YP_147889; YP_003497047, BAI81291; EFQ32520, EFQ35765; YP_001250712, ABQ55366; XP_748706, XP_748351; EAU80763; XP_001559519; ABH10642; YP_001462756; YP_675197; ACC81853, YP_001866796; ZP_07114022, CBN59220;
09': Enoil-CoA deshidratasa	<i>Bordetella petrii</i> ; <i>Bordetella petrii</i> DSM 12804; <i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1; <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Geobacillus kaustophilus</i> ; <i>Syntrophothermus lipocalidus</i> DSM 12680; <i>Acinetobacter</i> sp. SE19; <i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054; <i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82; <i>Alternaria alternata</i> ; <i>Ajellomyces dermatitidis</i> ER-3; <i>Aspergillus fumigatus</i> Af293; <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21; <i>E. coli</i> ; <i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357; <i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82; <i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181; <i>Nostoc</i> sp. 'Peltigera membranacea cyanobiont';	CAP41574; YP_001629844; YP_002315700, YP_002314932; YP_148541, YP_147845, BAD76199; BAD18341; ADI02939, ADI02740, ADI02007, ADI01364; AAG10018; ABN64617, XP_001382646; EDR09131, XP_001888157; BAH83503, EEQ91989; EAL93360, XP_755398; XP_572730; ADN73405, YP_001458194; XP_002377859; EDR01115; EAW18645; ADA69246;

10': 2-Enoil-CoA reductasa	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i> ; <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. B100; <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>musacearum</i> NCPPB4381; <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vasculorum</i> NCPPB702; <i>Aeromicrobium marinum</i> DSM 15272; <i>Rhodobacterales bacterium</i> HTCC2083; <i>Lysinibacillus fusiformis</i> ZC1; <i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2; <i>Lysinibacillus sphaericus</i> C3-41; <i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130; <i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893; <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb01; <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18; <i>Ajellomyces capsulatus</i> G186AR; <i>Ostreococcus tauri</i> ; <i>Jatropha curcas</i> ;	CAP53709; YP_001905744; ZP_06489037; ZP_06487845; ZP_07718056, EFQ82338; ZP_05074461, EDZ42121; ZP_07049092, EFI69525; YP_886510, ABK76225; YP_001699417, ACA41287; XP_002910885, EFI27391; EFR05506; XP_002796528, EEH39074; EEH43955; EEH03439; XP_003083795, CAL57762; ACS32302;
11': Acil-CoA reductasa (EC 1.2.1.50)	<i>Clostridium cellulovorans</i> 743B; <i>Thermosphaera aggregans</i> DSM 11486; <i>Delftia acidovorans</i> SPH-1; <i>Comamonas testosteroni</i> KF-1; <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697; <i>Clostridium papyrosolvens</i> DSM 2782; <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ATCC 19860; <i>Comamonas testosteroni</i> KF-1; <i>Aminomonas paucivorans</i> DSM 12260; <i>Herpetosiphon aurantiacus</i> ATCC 23779; <i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052; <i>Geobacillus</i> sp. G11MC16; <i>Clostridium lentocellum</i> DSM 5427; <i>Leadbetterella byssophila</i> DSM 17132; <i>Actinosynnema mirum</i> DSM 43827; <i>Haliangium ochraceum</i> DSM 14365; <i>Photobacterium phosphoreum</i> ; <i>Simmondsia chinensis</i> ; <i>Hevea brasiliensis</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> ;	YP_003845606, ADL53842; YP_003649571, ADG90619; YP_001565543, ABX37158; ZP_03543536; YP_002321654, ACJ51276; ZP_05497968, EEU57047; ZP_06211782, EFA39209; EED67822; ZP_07740542, EFQ24431 ; ABX07240, YP_001547368; ABR34265, YP_001309221; ZP_03148237, EDY05596; ZP_06885967, EFG96716; YP_003997212, ADQ16859; YP_003101455, ACU37609 ; ACY16972, YP_003268865; AAT00788; AAD38039; AAR88762; ABE65991;
12': Hexanol deshidrogenasa	<i>Mycobacterium chubuense</i> NBB4;	ACZ56328;
12'': Octanol deshidrogenasa EC 1.1.1.73	<i>Drosophila subobscura</i> ;	ABO61862, ABO65263, CAD43362, CAD43361, CAD54410, CAD43360, CAD43359, CAD43358 CAD43357, CAD43356;
43': Deshidrogenasa de alcoholes de cadena corta	<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638; <i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4; <i>Geobacillus thermoleovorans</i> ; <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1; <i>Helicobacter pylori</i> PeCan4; <i>Mycobacterium chubuense</i> NBB4; <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i> ATCC 25291; <i>Aspergillus oryzae</i> ; <i>cyanobacterium</i> UCYN-A; <i>Anabaena circinalis</i> AWQC131C; <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> T3; <i>Helicobacter pylori</i> Sat464; <i>Helicobacter pylori</i> Cuz20; <i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC	AAC25556; ABO56626; BAA94092; YP_146837, BAD75269; YP_002314715, ACJ32730; YP_003927327, ADO07277; ACZ56328; ZP_05215778; BAE71320; YP_003421738, ADB95357; ABI75134; ABI75108; ADO05766; ADO04259; ZP_05228059, ZP_05228058;

	13950; <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i> ATCC 25291; <i>Gluconacetobacter hansenii</i> ATCC 23769; <i>Helicobacter pylori</i> Shi470; <i>Mycobacterium avium</i> 104; <i>Citrus sinensis</i> ; <i>Gossypium hirsutum</i> ; <i>Arabidopsis halleri</i> ; <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb01; <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP; <i>Ajellomyces capsulatus</i> H143; <i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054;	ZP_05215779; ZP_06834730,EFG83978; YP_001910563,ACD48533; YP_880627,ABK67217; ADH82118; ABD65462; ABZ02361,ABZ02360; XP_002792148,EEH34889; XP_001940779, EDU43498; EER38733; XP_001382930,ABN64901;
70: Hidrogenasa unida a membrana (en inglés, MBH)	<i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34; <i>Thiocapsa roseopersicina</i> , <i>Thermococcus onnurineus</i> NA1; <i>Thermococcus</i> sp. 4557; <i>Thermococcus</i> sp. 4557; <i>Thermococcus</i> sp. 4557; <i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638; <i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638; <i>Pyrococcus yayanosii</i> CH1; <i>Pyrococcus yayanosii</i> CH1; <i>Pyrococcus yayanosii</i> CH1; <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3; <i>Hydrogenovibrio marinus</i> ; <i>Alcaligenes</i> sp.; <i>Rubrivivax</i> sp.; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Thermococcus gammatolerans</i> EJ3; <i>Methanoplanus petrolearius</i> DSM 11571; <i>Thermococcus gammatolerans</i> EJ3; <i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5; <i>Aquifex aeolicus</i> VF5; <i>Centipeda periodontii</i> DSM 2778; <i>Selenomonas noxia</i> ATCC 43541; <i>Allochrochromatium vinosum</i> DSM 180; <i>Thiomonas intermedia</i> K12; <i>Aquifex aeolicus</i> VF5;	NP_942643 (hoxK), NP_942644 (hoxG), YP_015633 (hoxZ); AAP85757(hoxK), AAP85758 (hoxG), AAA16463 (hoxZ); ABF08183 (hoxK), YP_583451 (hoxG), ABF08182 (hoxG); ADK12981, ADK12980; ACJ15972; YP_004763067, YP_004763083; YP_004763081; AEK73406, AEK73404; NP_579163; NP_579162; YP_004624085; YP_004624086; YP_004624087; NP_142896; BAK19334; CAA63615; CAA63616; BAF73677; ACS32538; ADN36337; YP_002958402; YP_004638463 (hoxZ); AEI08136 (hoxZ); NP_213456 (hoxZ); ZP_08500995 (hoxZ); ZP_06602778 (hoxZ); ADC63224 (hoxZ); ADG32404 (hoxZ); AAC06857 (hoxZ);
71: Hidrogenasa Soluble(SH) (reductora de NAD(P))	<i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Rhodobacter capsulatus</i> ; <i>Azotobacter vinelandii</i> DJ; <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843; <i>Acaryochloris marina</i> MBIC11017; <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002; <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301; <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301; <i>Allochrochromatium vinosum</i> ; <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806; <i>Azotobacter vinelandii</i> DJ;	AAP85843(hoxY), AAP85844 (HoxH); NP_942730 (hoxH), NP_942729 (hoxY); NP_942727 (hoxF), NP_942728(hoxU); AAP85841 (hoxF), AAP85842 (hoxU); AAC06140 (hoxF), AAC06141 (hoxU), AAC06142 (hoxY), AAC06143(hoxH); AAD38065 (hoxH); YP_002797671 (hoxH); BAG01243 (hoxH); ABW32682 (hoxH); AAN03569 (hoxH); CAA66383 (hoxH); CAA66382 (hoxY); AAX89151 (hoxY); CAO88137 (hoxY);

		<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301; <i>Allochromatium vinosum</i> ; <i>Arthrospira platensis</i> FACHB341; <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806; <i>Lyngbya majuscula</i> CCAP 1446/4; <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301; <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142; <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301; <i>Allochromatium vinosum</i> ; <i>Arthrospira platensis</i> FACHB341; <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002; <i>Anaerolinea thermophila</i> UNI-1; <i>Caloramator australicus</i> RC3;	YP_002797670 (hoxY); CAA66381 (hoxU); AAX89150 (hoxU); ABC26909 (hoxU); CAO88140 (hoxU); AAY57574 (hoxU); YP_172263 (hoxU); YP_001803733 (hoxU); CAA73873 (hoxF); AAX89149 (hoxF); ABC26907 (hoxF); YP_001733465 (hoxF); BAJ63286 (hoxH); CCC57856 (hoxF);
72:	Proteínas accesorias de hidrogenasa	<i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34; <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34; <i>Azotobacter vinelandii</i> ; <i>Salmonella enterica</i> subsp.; <i>Escherichia coli</i> B354; <i>Metiloversatilis universalis</i> FAM5; <i>Shigella flexneri</i> CDC 796-83; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Azotobacter vinelandii</i> ; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34; <i>Azotobacter vinelandii</i> DJ; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Azotobacter vinelandii</i> ; <i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5; <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34; <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Weltevreden</i> str. 2007-60-3289-1; <i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5; <i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM4; <i>Azotobacter vinelandii</i> DJ; <i>Metiloversatilis universalis</i> FAM5; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Azotobacter vinelandii</i> ; <i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5; <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34; <i>Azotobacter vinelandii</i> DJ; <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34; <i>Metiloversatilis universalis</i> FAM5; <i>Metiloversatilis universalis</i> FAM5; <i>Ralstonia eutropha</i> H16 <i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5, <i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM4; <i>Azotobacter vinelandii</i> ; <i>Azotobacter vinelandii</i> DJ;	NP_942649 (hoxO), AAP85763 (hoxO), AAA16467 (hoxO); ABF08176 (hoxO); YP_583445 (hoxO); NP_942650 (hoxQ), AAP85764 (hoxQ), AAA16468 (hoxQ); ABF08175 (hoxQ), YP_583444 (hoxQ); AAA19504 (hoxQ); EHC91928 (hoxQ/hoxR), EFX49216 (hoxQ/hoxR), ZP_06652932 (hoxQ); ZP_08506135 (hoxQ); EFW61888 (hoxQ); AAA16469 (hoxR), NP_942651 (hoxR); AAA19505 (hoxR); NP_942652 (hoxT), AAP85766 (hoxT), AAA16470 (hoxT); ABF08173 (hoxT); YP_002802114 (hoxT), ACO81139 (hoxT); NP_942648 (hoxL), AAP85762 (hoxL), AAA16466 (hoxL); AAA19502 (hoxL); YP_015634 (hoxL); ABF08177 (hoxL), YP_583446 (hoxL); CBY95754 (hoxL); YP_004638464 (hoxL); AEI04509 (hoxL); YP_002802118 (hoxL), ACO81143 (hoxL); ZP_08506137 (hoxL), EGK70316 (hoxL); NP_942653 (hoxV), AAP85767 (hoxV), AAA16471 (hoxV); AAA19507 (hoxV); YP_015636 (hoxV); ABF08172 (hoxV); YP_002802113 (hoxV); YP_583441 (hoxV); ZP_08506132 (hoxV); EGK70311 (hoxV); NP_942647 (hoxM); YP_004638462 (hoxM); AEI04507 (hoxM); AAA19501 (hoxM); YP_002802119 (hoxM);

<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Thermoproteus tenax</i> Kra 1; <i>Acidithiobacillus</i> sp. GGI-221; <i>Metiloversatilis universalis</i> FAM5; <i>Burkholderiales bacterium</i> 1_1_47; <i>Thiomonas intermedia</i> K12; <i>Thermococcus gammatolerans</i> EJ3; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571; <i>Bradyrhizobium japonicum</i>; <i>Hyphomicrobium</i> sp. MC1; <i>Azoarcus</i> sp. BH72; <i>Metiloversatilis universalis</i> FAM5; <i>Grimontia hollisae</i> CIP 101886; <i>Oxalobacteraceae bacterium</i>; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Azoarcus</i> sp. BH72; <i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Azoarcus</i> sp. BH72; <i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM4; <i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5; <i>Oxalobacteraceae bacterium</i> IMCC9480; <i>Alcaligenes hydrogenophilus</i>; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> B316; <i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5; <i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM4; <i>Desulfitobacterium metallireducens</i> DSM 15288; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803; <i>Cyanothece</i> sp. CCY0110; <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34, <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34; <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34; <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3); <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Rhizobium leguminosarum</i>; <i>Azotobacter vinelandii</i>; <i>Aeropyrum pernix</i> K1; <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Syntrophothermus lipocalidus</i> DSM 12680; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Syntrophothermus lipocalidus</i> DSM	YP_583447 (hoxM); BAF73673 (hoxM); YP_003432119 (hoxM); CCC80713 (hoxM); EGQ60729 (hoxM); ZP_08506138 (hoxM); ZP_07342912 (hoxM); YP_003644737 (hoxM); YP_002958602 (hybD/hycl/hoxM); NP_942661 (hoxA), AAP85775; AAS91037 (hoxA); CAA78991 (hoxA); YP_004674255 (hoxA); YP_935307 (hoxA); ZP_08506123 (hoxA); ZP_06053565 (hoxA); ZP_08276168 (hoxA); NP_942662 (hoxB), AAP85776; YP_935309 (hoxB); YP_004638467 (hoxB); AAP85777 (hoxC), NP_942663; YP_935310 (hoxC); AEI04502 (hoxC); YP_004638457 (hoxC); ZP_08276171 (hoxJ), EGF30361 (hoxJ); AAB49362 (hoxJ); BAA18357 (hypA); NP_942654 (hypA1); NP_942733 (hypA2); NP_942716 (hypA3); YP_583440 (hypA); NP_942655 (hypB1); AAP85769 (hypB1); YP_003830670 (hypB1); YP_004638455 (hypB); AEI04500 (hypB); ZP_08976390 (hypB), EHC20145 (hypB); BAA18180 (hypC); EAZ91066 (hypC); ABF08421(hypC); NP_942657 (hypC1); AAP85826 (hypC2); CAA49734 (hypD); YP_583436 (hypD); ABF08422 (hypD); ACT44398 (hypD); BAA17478 (hypE); CAA49735 (hypE); NP_942659 (hypE1); AAP85829 (hypE2); CAA37164 (hypE); AAA19513 (hypE); NP_148343 (hypE); NP_341628 (hypE); YP_003432665 (hypE); YP_001212249 (hypE); ADI01176 (hypE), YP_003701741 (hypE); YP_003432667 (hypF); YP_001212246 (hypF); ADI01173 (hypF),
--	---

	12680; <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Rhizobium leguminosarum</i> ; <i>Metiloversatilis universalis</i> FAM5; <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34; <i>Ralstonia eutropha</i> H16;	YP_003701738 (hypF); YP_002572964 (hypF); CAA49731 (hypF); NP_942660 (hypX); AAP85774 (hypX) YP_003433460 (hypX); CAA37165 (hypX); ZP_08506124 (hoxX); ABF08424 (hoxX); CAA52735 (hoxX);
73: Hidrogenasa dependiente de NAD(P)	<i>Desulfobulbus propionicus</i> DSM 2032; <i>Acetohalobium arabaticum</i> DSM 5501; <i>Ilyobacter polytrophicus</i> DSM 2926; <i>Beta proteobacterium</i> KB13 <i>Acetohalobium arabaticum</i> DSM 5501;	ADY56959, YP_004195043; YP_003826884; ADO82414; EDZ65062, ZP_05082375; ADL11819
74: Formiato deshidrogenasa que usa NAD(P)H	<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073; <i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073; <i>Moorella thermoacetica</i> ; <i>Methanosaeta harundinacea</i> 6Ac; <i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1; <i>Methanocorpusculum labreanum</i> Z; <i>Helicobacter bilis</i> ATCC 43879; <i>Helicobacter bilis</i> ATCC 43879; <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Klebsiella variicola</i> At-22; <i>Azospirillum</i> sp. B510; <i>Thermococcus gammatolerans</i> EJ3; <i>Yersinia pestis</i> Antiqua; <i>Thermophilum pendens</i> Hrk 5; <i>Ferrimonas balearica</i> DSM 9799; <i>Thermodesulfatator indicus</i> DSM 15286; <i>Shewanella baltica</i> BA175; <i>Methanocella paludicola</i> SANAE; <i>Methanosaeta harundinacea</i> 6Ac;	YP_429324, ABC18781; YP_431142, ABC20599; AAB18330 (α), AAB18329 (β); AET63712, AET63711, YP_001047290; YP_001029904, YP_001029903; ZP_04582064 (NADPH); EEO23341 (NADPH); YP_001213196; YP_003432807; YP_003433330 (NDA dependent); ADC58081, YP_003439113; YP_003451652, YP_003450092; YP_002958615; ABG15899; YP_919603; YP_003913071; AEH46025; AEG12633; YP_003357462, YP_003357461; AET64643, AET64987, AET65705;
75: 10-formil-H ₄ folato sintetasa (10-Formiltetrahidrofolatosintetasa, forma ADP)	<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073; <i>Methanocorpusculum labreanum</i> Z; <i>Sphingomonas paucimobilis</i> ; <i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> AK-01; <i>Corynebacterium aurimucosum</i> ; <i>Clostridium acidurici</i> ; <i>Sphingobium</i> sp. SYK-6; <i>Listeria monocytogenes</i> serotype 4b str. CLIP 80459; <i>Vibrio fischeri</i> MJ11; <i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1; <i>Thermotoga lettingae</i> TMO; <i>Fervidobacterium nodosum</i> Rt17-B1; <i>Thermosiphon melanesiensis</i> BI429; <i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1 <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI;	YP_428991; YP_001030445; BAD61061; ACL05327; YP_002834788; AAA53187; YP_004834408; YP_002758587; YP_002156619; YP_002315932; YP_001471133; YP_001410584; YP_001305561; YP_001244647 YP_001210750;
76: 5,10-Metenil-H ₄ ciclohidrolasa (Meteniltetrahidrofolato ciclohidrolasa)	<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073; <i>Thermotoga lettingae</i> TMO; <i>Caldicellulosiruptor bescii</i> DSM 6725; <i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1; <i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1; <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Synechococcus</i> sp. JA-2-3B'a (2-13); <i>Synechococcus</i> sp. JA-3-3Ab; <i>Exiguobacterium</i> sp. AT1b; <i>Thermotoga lettingae</i> TMO;	YP_430368, ABC19825; ABV34070; YP_002572856; ABQ47072; YP_002315305; BAD76681; YP_148249; YP_476354; YP_475381; YP_002884899; YP_001471134;

77: 5,10-Metilen-H ₄ folatodeshidrogenasa	<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073; <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; <i>Syntrophothermus lipocalidus</i> ; <i>Caldicellulosiruptor kronotskyensis</i> ; <i>Caldicellulosiruptor kristjanssonii</i> ; <i>Caldicellulosiruptor hydrothermalis</i> ; <i>Caldicellulosiruptor owensensis</i> OL; <i>Caldicellulosiruptor hydrothermalis</i> ; <i>Kosmotoga olearia</i> TBF 19.5.1; <i>Exiguobacterium</i> sp. AT1b; <i>Komagataella pastoris</i> CBS 7435; <i>Homo sapiens</i> ; <i>Taeniopygia guttata</i> ; <i>Syntrophobotulus glycolicus</i> DSM 8271; <i>Olsenella uli</i> DSM 7084;	ABC19825, YP_430368; BAD76681; ADI01214; ADQ46551; ADQ40482; ADQ07463; ADQ04336; YP_003992832; ACR80790; ACQ69454; CCA37557; AAH09806; XP_002200380; ADY56189; ADK67906;
78: 5,10-Metilen-H ₄ folato reductasa (Metilene-tetrahidrofolato reductasa)	<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073; <i>Syntrophothermus lipocalidus</i> ; <i>Fervidobacterium nodosum</i> Rt17-B1; <i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1; <i>Fervidobacterium nodosum</i> Rt17-B1; <i>Thermotoga lettingae</i> TMO; <i>Thermosiphon melanesiensis</i> BI429; <i>Synechococcus</i> sp. JA-2-3B'a (2-13); <i>Hippea maritima</i> DSM 10411; <i>Spirochaeta thermophila</i> DSM 6192; <i>Deferribacter desulfuricans</i> SSM1; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI;	YP_430048, ABC19505; ADI02156; ABS61421; ABQ46674; ABS61126; ABV33918; YP_001305980; YP_477166; YP_004340445; YP_003875363; YP_003496368; YP_003432279; BAF59187, YP_001211556;
79: metil-H ₄ -folato:proteína corrienóide hierro-sulfuro metiltransferasa (Metiltetrahidrofolato:proteína corrienóide/ hierro-sulfuro Metiltransferasa)	<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073; <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Clostridium carboxidivorans</i> P7; <i>Desulfotobacterium hafniense</i> DCB-2; <i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL 12; <i>Ammonifex degensii</i> KC4; <i>Desulfotomaculum acetoxidans</i> ; <i>Rhodobacter sphaeroides</i> KD131; <i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i> ; <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1; <i>Heliobacterium modesticaldum</i> Ice1; <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021; <i>Acetone</i> <i>longum</i> DSM 6540	YP_430950, YP_430174; YP_001211554; ADO12092; YP_002461301; YP_001533020; YP_003238352; YP_003190781; YP_002525435; YP_360065; YP_352826; YP_001680302; NP_386092; ZP_08625620;
80: Proteína corrienóide hierro-sulfuro (CFeSP)	<i>Moorella thermoacetica</i> ; <i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i> <i>Clostridium ragsdalei</i> ; <i>Clostridium autoethanogenum</i> ; <i>Clostridium sticklandii</i> DSM 519; <i>Clostridium sticklandii</i> ;	AAA23255; 2H9A_A, 2H9A_B; AEI90763, AEI90762; AEI90746, AEI90745; YP_003936194; CBH21289;
81: CO deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa (Fd ²⁻)	<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073; <i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073; <i>Moorella thermoacetica</i> ; <i>Caldicellulosiruptor kristjanssonii</i> ; <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> ; <i>Clostridium ragsdalei</i> ; <i>Clostridium autoethanogenum</i> ; <i>Desulfosporosinus orientis</i> DSM 765; <i>Methanococcus aeolicus</i> Nankai-3; <i>Desulfobacca acetoxidans</i> DSM 11109; <i>Thermodesulfatator indicus</i> ; <i>Acetohalobium arabaticum</i> DSM 5501; <i>Desulfarculus baarsii</i> DSM 2075; <i>Archaeoglobus veneficus</i> SNP6; <i>Methanosalsum zhilinae</i> DSM 4017; <i>Thermosediminibacter oceani</i> ;	ABC19516, YP_430059; YP_430813 (CODH); AAA23229, AAA23228; ADQ39747; YP_001179230; AEI90761; AEI90744; AET68776; ABR56750; YP_004370981; AEH46031; ADL12817; YP_003806211; YP_004341848; AEH60991; ADL07576;

	<i>Desulfotomaculum kuznetsovii</i> ; <i>Methanosalsum zhilinae</i> DSM 4017;	YP_004517493, YP_004516875; AEH60989,AEH60993;
82: Piruvato sintasa (Fd ²⁻)	<i>Thermodesulfobium narugense</i> ; <i>Desulfobacca acetoxidans</i> ; <i>Archaeoglobus veneficus</i> SNP6; <i>Hippea maritima</i> DSM 10411; <i>Desulfurobacterium thermolithotrophum</i> ; <i>Archaeoglobus veneficus</i> ; <i>Thermodesulfobium narugense</i> ; <i>Archaeoglobus veneficus</i> SNP6; <i>Thermobacillus composti</i> KWC4; <i>Desulfobacca acetoxidans</i> ; <i>Metanolinea tarda</i> NOBI-1; <i>Methanobacterium</i> sp. AL-21; <i>Methanocella paludicola</i> SANAЕ;	YP_004437266; YP_004370392; YP_004341929; YP_004339618; YP_004281767,YP_004281766, ADY73708 ; AEA47214; AEE14134; YP_004341930; ZP_08918406; AEB09210; EHF09898; YP_004289712, ADZ08740; YP_003356312, YP_003356313;
83: Formilmetanofurano deshidrogenasa (Fmd) (Fd ²⁻)	<i>Methanothermobacter marburgensis</i> str. <i>Marburg</i> ; <i>Methanothermobacter</i> <i>thermautotrophicus</i> ; <i>Methanothermobacter</i> <i>thermautotrophicus</i> ; <i>Agrobacterium</i> sp. H13-3; <i>Agrobacterium vitis</i> S4; <i>Metilomonas methanica</i> MC09; <i>Desulfobacca acetoxidans</i> DSM 11109; <i>Metilovorus glucosetrophus</i> SIP3-4; <i>Metilotenera mobilis</i> JLW8; <i>Metilotenera versatilis</i> 301; <i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1; <i>Methanosaeta harundinacea</i> 6Ac; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ;	ADL58895, ADL58894, ADL58283, ADL58893, ADL57751, ADL57749, ADL57750, ADL57748; CAA66401, CAA61212, CAA66400, CAA66402; CAA61213, CAA61214, CAA61210, CAA61211, CAA61209; YP_004444030; YP_002547540; YP_004511613; YP_004370144, AEB08963; YP_003051278; YP_003048298; ADI29297; YP_001046285, YP_001046287,YP_001046533; AET63761, AET64650, AET65189, AET64652; ABC56660, ABC56659,YP_447302, ABC56661, ABC56658,ABC56657 ;
84: Formil transferasa	<i>Methanothermobacter marburgensis</i> str. <i>Marburg</i> ; <i>Methanosaeta harundinacea</i> 6Ac; <i>Methanosarcina barkeri</i> ; <i>Methanopyrus kandleri</i> AV19; <i>Thermosipho melanesiensis</i> BI429; <i>Desulfobacca acetoxidans</i> DSM 11109; <i>Metilobacterium chloromethanicum</i> ; <i>Metilomicrobium alcaliphilum</i> ; <i>Methanopyrus kandleri</i> AV19; <i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1; <i>Methanocorpusculum labreanum</i> Z; <i>Methanopyrus kandleri</i> AV19; <i>Methanocella paludicola</i> SANAЕ;	ADL59225, YP_003850538; AET65566; CAA62582; NP_614099; YP_001305762; YP_004369335; YP_002421530; YP_004917963; NP_613403; YP_001046543; YP_001029658, YP_001029834; AAM02029,AAM01333; YP_003356088, BAI61105;
85: 5,10-Metenil- tetrahidrometanopterina (H4 metanopterina) ciclohidrolasa	<i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanothermus fervidus</i> DSM 2088; <i>Methanosalsum zhilinae</i> DSM 4017; <i>Methanohalophilus mahii</i> DSM 5219; <i>Methanoplanus petrolearius</i> ; <i>Archaeoglobus veneficus</i> SNP6; <i>Planctomyces brasiliensis</i> DSM 5305; <i>Metilobacillus flagellates</i> ; <i>Xanthobacter autotrophicus</i> ; <i>Metilosinus trichosporium</i> OB3b;	ABC57615, YP_448258; YP_004003819; AEH61193; ADE36644; ADN34846; YP_004342719; YP_004269775; AAD55893; AAD55896; AAD56174;

	<i>Metilobacterium organophilum</i> ; <i>Metilococcus capsulatus</i> ; <i>Metilomicrobium kenyense</i> ; <i>Metilomonas</i> sp. LW13; <i>Metilosinus</i> sp. LW2; <i>Metilomicrobium kenyense</i> ; <i>Methanohalophilus mahii</i> DSM 5219; <i>Metanolinea tarda</i> NOBI-1; <i>Methanothermococcus okinawensis</i> IH1; <i>Methanobacterium</i> sp. SWAN-1; <i>Metilomonas methanica</i> MC09;	AAD55900; AAD55899; AAS88982; AAS88987; AAS88975; AAS86344; YP_003542289; EHF09908; YP_004577331; YP_004519292; YP_004513168;
86: 5,10-Metilen-H ₄ -metanopterina deshidrogenasa (F ₄₂₀ H ₂)	<i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanococcus maripaludis</i> X1; <i>Methanothermobacter</i> <i>thermautotrophicus</i> ; <i>Methanopyrus kandleri</i> ; <i>Metilobacterium extorquens</i> AM1; <i>Metilobacillus flagellatus</i> KT; <i>Xanthobacter autotrophicus</i> ; <i>Metiloversatilis universalis</i> FAM5; <i>Metilobacterium chloromethanicum</i> ; <i>Metilobacterium populi</i> BJ001; <i>Metilobacterium extorquens</i> PA1; <i>Burkholderia</i> sp. CCGE1001; <i>Metilovorus</i> sp. MP688; <i>Methanocaldococcus fervens</i> AG86; <i>Methanocaldococcus jannaschii</i> ; <i>Methanobrevibacter smithii</i> ;	ADL57660, YP_003848973; YP_447224; AEK19019; CAA63376; CAA43127; AAC27020; ABE49928; AAD55895; ZP_08504846; ACK83011; YP_001924478; YP_001639299; YP_004230417; YP_004039958; YP_003128308; NP_247770; YP_001273145;
87: 5,10- Metilen -H ₄ -metanopterina reductasa (F ₄₂₀ H ₂)	<i>Methanoplanus petrolearius</i> ; <i>Methanocaldococcus</i> sp. FS406-22; <i>Methanocaldococcus infernus</i> ME; <i>Methanocaldococcus fervens</i> AG86; <i>anococcus maripaludis</i> C6; <i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14; <i>Amycolatopsis mediterranei</i> S699; <i>Corynebacterium glutamicum</i> ; <i>Acinetobacter</i> sp. DR1; <i>Acinetobacter baumannii</i> ABNIH4; <i>Acinetobacter</i> sp. DR1; <i>Paenibacillus terrae</i> HPL-003; <i>Acinetobacter baumannii</i> ABNIH3; <i>Cupriavidus necator</i> N-1; <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1; <i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Methanococcus voltae</i> A3; <i>Methanococcus aeolicus</i> Nankai-3; <i>Methanocaldococcus vulcanius</i> M7;	ADN36752; YP_003458803; ADG13507; ACV24808; ABX01642; EED39154, ZP_05135093; AEK43785; EHE83474; ADI90167; EGU03459; YP_003731540; AET61191; EGT94264; AEI79563; YP_003777169; YP_840196; YP_003423269, ADC46377; ADI37005; ABR56603; ACX71899;
88: Metil-H4-metanopterina: proteína corrienoide hierro-sulfuro metiltransferasa	<i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Methanothermobacter marburgensis</i> str. <i>Marburg</i> ;	MTBMA_c02920; ADL57900;
89: Proteína corrienoide hierro- sulfuro(MTBMA_c02910)	<i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Methanothermobacter marburgensis</i> str. <i>Marburg</i> ;	MTBMA_c02910; ADL57899;
90: CO deshidrogenasa /acetil-CoA sintasa (Fd ²⁻ _{red})	<i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Methanothermobacter marburgensis</i> str. <i>Marburg</i> ;	αMTBMA_c02870/14220/14210/14 200; ε MTBMA_c14190/02880; βMTBMA_c02890; ADL57895; ADL59006; ADL57897;

91: Hidrogenasa convertidora de energía (Ech)	<i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Methanobacterium</i> sp. SWAN-1; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1;	ABC57827 (ehbA); ABC57826 (ehbB); ABC57825 (ehbC); ABC57824 (ehbD); ABC57823 (ehbE); ABC57822 (ehbF); ABC57821 (ehbG); ABC57820 (ehbH); ABC57819 (ehbI); ABC57818 (ehbJ); ABC57817 (ehbK); ABC57816 (ehbL); ABC57815 (ehbM); ABC57814 (ehbN); ABC57813 (ehbO); ABC57812 (ehbP); ABC57807 (ehbQ); ADL59203, YP_003850516; YP_004520980; YP_003424741, ADC47849;
92: Metil-H4MPT: coenzima-M metiltransferasa (MtrA-H)	<i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosaeta harundinacea</i> 6Ac; <i>Methanopyrus kandleri</i> AV19; <i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1; <i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1 <i>Methanopyrus kandleri</i> AV19; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 4304; <i>Methanopyrus kandleri</i> AV19; <i>Methanocella paludicola</i> SANAE; <i>Methanosaeta harundinacea</i> 6Ac; <i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1; <i>Methanocella paludicola</i> SANAE; <i>Methanocella paludicola</i> SANAE; <i>Methanocella paludicola</i> SANAE; <i>Methanocella paludicola</i> SANAE; <i>Methanocella paludicola</i> SANAE; <i>Methanocella paludicola</i> SANAE; <i>Methanocella paludicola</i> SANAE; <i>Methanocella paludicola</i> SANAE;	ABC56714 (mtrA); ABC56713 (mtrB); YP_447355 (mtrC); YP_447354 (mtrD); AET65445 (mtrE); AAM01871 (mtrE); YP_001046527 (mtrE); YP_001046522 (mtrF); NP_614768 (mtrF); YP_447359 (mtrG); YP_447360 (mtrH); NP_068850 (mtrH); AAM01874 (mtrB); BAI60614 (mtrB); AET65448 (mtrB); YP_001046524 (mtrB); YP_003355598 (mtrA); YP_003355597 (mtrB); YP_003355596 (mtrC); YP_003355595 (mtrD); YP_003355594 (mtrE); BAI60616 (mtrF); YP_003355600 (mtrG); YP_003355601 (mtrH);
93: Metil-coenzima M reductasa (Mcr)	<i>Methanobacterium aarhusense</i> ; <i>Methanobacterium</i> sp. MB4; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ;	AAR27839 (mcrA); ABG78755 (mcrA); CAE48306 (mcrA); CAE48303 (mcrB); ABC56709 (mcrC); CAE48305 (McrG); ABC56731, ABC56728; YP_447371, ABC56730 (mrtG); ABC56794;
94: Hetero disulfuro reductasas(HdrABC, HdrDE)	<i>Methanocella paludicola</i> SANAE; <i>Methanocella paludicola</i> SANAE; <i>Methanocella paludicola</i> SANAE; <i>Methanosaeta harundinacea</i> 6Ac; <i>Methanosaeta harundinacea</i> 6Ac; <i>Methanosaeta harundinacea</i> 6Ac; <i>Methanosaeta harundinacea</i> 6Ac; <i>Methanosaeta harundinacea</i> 6Ac; <i>Methanopyrus kandleri</i> AV19; <i>Methanopyrus kandleri</i> AV19;	YP_003357823 (hdrA); YP_003357824 (hdrB); YP_003357825 (hdrC); AET63985 (hdrA); AET63982 (hdrB); AET63983 (C); AET64166 (D); AET64165 (E); NP_613552 (hdrA); NP_613857 (hdrB);

		<i>Methanopyrus kandleri</i> AV19;	NP_613858 (hdrC);
95: [NiFe]-hidrogenasaMvhADG (hidrogenasa no-reductora de F420; hidrogenasa reductora de metil viológeno)		<i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Cyanobium</i> sp. PCC 7001; <i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Desulfobacterium autotrophicum</i> HRM2 <i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> AK-01; <i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> AK-01; <i>Methanobrevibacter smithii</i> DSM 2374; <i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Methanobrevibacter smithii</i> ; <i>Methanobrevibacter smithii</i> ; <i>Methanothermobacter</i> <i>thermautotrophicus</i> ; <i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> AK-01; <i>Cyanobium</i> sp. PCC 7001; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanobrevibacter smithii</i> DSM 2374; <i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> AK-01; <i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> AK-01; <i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1;	ABC56726 (mvhA); EDY38497 (mvhA); ADL59096 (mvhA); YP_003424648 (mvhA); YP_002602450 (mvhA) ACL06634 (mvhA); ADL59095 (mvhB); ACL06636 (mvhB); ZP_05975561 (mvhB); ADL59098 (mvhD); YP_003850411 (mvhD); YP_001273574 (mvhD); ABQ87206 (mvhD); AAB02349 (mvhD); ADL59097 (mvhG); ACL06635 (mvhG); EDY38425 (mvhG); ABC56725 (mvhG); EFC93226 (mvhG); ACL06638; ACL03322; YP_001046332 (hypF);
96: Hidrogenasareductora Coenzima F420 (Frh)	de	<i>Methanocella paludicola</i> SANAÉ; <i>Methanocella paludicola</i> SANAÉ; <i>Methanocella paludicola</i> SANAÉ; <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803; <i>Synechococcus</i> sp. WH 7803; <i>Synechococcus</i> sp. RCC307; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 8802; <i>Cyanobium</i> sp. PCC 7001; <i>Synechococcus</i> sp. RS9916; <i>Synechococcus</i> sp. JA-2-3B'a (2-13); <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI; <i>Methanothermus fervidus</i> DSM 2088; <i>Methanococcus maripaludis</i> S2; <i>Methanococcus maripaludis</i> S2; <i>Methanococcus maripaludis</i> S2; <i>Methanococcus maripaludis</i> S2;	YP_003357229 (frhB-1); YP_003357467 (frhB-2); YP_003357509 (frhB-3); ABB57389 (frhB); BAA18574, YP_001735870; YP_001225273; YP_001227030; ACV00312 (frhB); EDY39891 (fehB); EAU74116 (frhB); YP_477499; YP_001212042, YP_001211959; YP_004004590; CAF30376 (A), NP_988502 (A); NP_988505 (B); NP_988503 (D); NP_988504 (G);
97: A ₁ A ₀ -ATP sintasa (AhaA-IK)		<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Ferroplasma acidarmanus</i> fer1; <i>Thermococcus sibiricus</i> MM 739; <i>Thermoproteus tenax</i> Kra 1; <i>Thermoproteus tenax</i> Kra 1; <i>Methanosarcina mazei</i> Go1; <i>Methanosarcina mazei</i> Go1; <i>Methanosarcina mazei</i> Go1; <i>Methanosarcina mazei</i> Go1; <i>Methanosarcina mazei</i> Go1; <i>Methanosarcina mazei</i> Go1; <i>Methanosarcina mazei</i> Go1; <i>Methanosarcina mazei</i> Go1;	YP_003423444 (ahaA); YP_003423445 (ahaB); YP_003423442 (ahaC); ADC46554 (ahaD); ADC46549 (ahaE); YP_003423443 (ahaF); YP_003423438 (ahaH) ADC46547 (ahaI); YP_003423440 (ahaK); ZP_05570724; YP_002995194; CCC82573; CCC82176; AAC06375 (ahaA); AAC06376 (ahaB); AAC06373 (ahaC); AAC06377 (ahaD) AAC06372 (ahaE); AAC06374 (ahaF); AAC06378 (ahaG);
98: Hidrogenasa unida a membrana		<i>Methanosarcina mazei</i> Go1; <i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A;	CAA58177 (mhtA); NP_616088 (mhtA);

con citocromo y no-reductora de F ₄₂₀ (VhtGAC, VhtD)	<i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 4304; <i>Ferroglobus placidus</i> DSM 10642; <i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A; <i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 4304; <i>Methanosarcina mazei</i> Go1; <i>Methanocella paludicola</i> SANA E; <i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A; <i>Methanosarcina mazei</i> Go1; <i>Methanosarcina mazei</i> Go1; <i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A; <i>Methanosarcina mazei</i> Go1; <i>Methanocella paludicola</i> SANA E; <i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A; <i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A; <i>Methanosarcina mazei</i> Go1; <i>Methanocella paludicola</i> SANA E; <i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A; <i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 4304;	NP_070209 (mhtA); ADC65001 (mhtA); NP_616088 (mhtB); NP_070209 (mhtB); CAA58178 (mhtB); YP_003357991 (mhtC); NP_616084(mhtC); CAA58178 (nhtC); NP_634195 (mhtC); AAM04564 (mhtC); CAA62962 (nhtD); YP_003355429 (mhtD); NP_616085 (mhtD); NP_616087 (mhtG); CAA58176 9 (mhtG); YP_003357989 (mhtG); AAM04562 (mhtG); AAB89863 (mhtG);
99a: CofA: Lactaldehído deshidrogenasa (Para síntesis de F ₄₂₀)	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Methanothermococcus okinawensis</i> IH1; <i>Methanotorris igneus</i> Kol 5; <i>Metanolinea tarda</i> NOBI-1; <i>Methanobacterium</i> sp. SWAN-1; <i>Methanobacterium</i> sp. AL-21; <i>Metanolinea tarda</i> NOBI-1;	YP_003423415 (cofA); ADC46523 (cofA); YP_004576675; YP_004484309; EHF10591; YP_004520759; YP_004289639; ZP_09042363;
99b: CofB: L-Lactato quinasa (Para síntesis de F ₄₂₀)	<i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Methanothermobacter</i> <i>thermautotrophicus</i>	cofB; cofB;
99c: CofC: 2-fosfo-L-lactato guanililtransferasa (Para síntesis de F ₄₂₀)	<i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Haloquadratum walsbyi</i> C23; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Archaeoglobus veneficus</i> SNP6; <i>Natronobacterium gregoryi</i> SP2; <i>Methanosalsum zhilinae</i> DSM 4017; <i>Methanoplanus petrolearius</i> ; <i>Metanolinea tarda</i> NOBI-1;	ADL58588; CCC41432; YP_003423696; YP_004342334; ZP_08967286; AEH61444; ADN35493; EHF10295;
99d: CofD: LPPG:Fo 2-fosfo-L-lactato transferasa (Para síntesis de F ₄₂₀)	<i>Methanococcus maripaludis</i> S2; <i>Archaeoglobus veneficus</i> SNP6; <i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1; <i>Methanococcus maripaludis</i> XI; <i>Methanocella paludicola</i> SANA E; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanopyrus kandleri</i> AV19; <i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1; <i>Methanosaeta harundinacea</i> 6Ac; <i>Methanocorpusculum labreanum</i> Z; <i>Methanococcus maripaludis</i> S2;	NP_987524; YP_004341066; YP_503864; YP_004742044; YP_003356970; YP_448417; NP_614772; YP_001048050; AET64321; YP_001029596; CAF29960;
99e: CofE: F ₄₂₀ -0: gama-glutamil ligasa (Para síntesis de F ₄₂₀)	<i>Methanothermobacter</i> <i>thermautotrophicus</i> ; <i>Methanocorpusculum labreanum</i> Z; <i>Methanothermus fervidus</i> DSM 2088; <i>Methanohalophilus mahii</i> DSM 5219; <i>Mycobacterium</i> sp. Spyr1; <i>Halogeometricum borinquense</i> ; <i>Methanococcus maripaludis</i> C5; <i>Methanosarcina barkeri</i> str. Fusaro; <i>Methanocorpusculum labreanum</i> Z; <i>Methanococcoides burtonii</i> DSM 6242; <i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1; <i>Methanosaeta thermophila</i> PT; <i>Acidothermus cellulolyticus</i> 11B	NP_276154; YP_001030766; YP_004003885; ADE37403; YP_004078486; YP_004035572; ABO35054; YP_305815; YP_001030766; YP_566482; ABN57125; ABK13958; ABK53734;
99f:	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1;	YP_003424716 (cofG);

CofGH: Fo sintasa (Para síntesis de F ₄₂₀)	<i>Methanococcus maripaludis</i> S2; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanocella paludicola</i> SANA;E; <i>Methanopyrus kandleri</i> AV19; <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425; <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803; <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1; <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51472; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanococcus maripaludis</i> S2; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1, <i>Methanosarcina mazei</i> Go1; <i>Methanocella paludicola</i> SANA;E;	CAF30432 (cofG); YP_447349 (cofG); YP_003357513 (cofG); NP_614181 (cofG); YP_001734664 (cofG); YP_002481576 (cofG); ABB56922 (cofG); NP_440537 (cofG) YP_399705 (cofH); NP_440146 (cofH); NP_682387 (cofH); EHC24992 (cofH); ABC56793 (cofH); NP_987177 (cofH); YP_003424008 (cofH); NP_634520 (cofH); YP_003357511 (cofH);
100: L-tirosina decarboxilasa dependiente de Piridoxal fosfato (mfnA para síntesis de metanofurano)	<i>Methanocella paludicola</i> SANA;E; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Thermococcus gammatolerans</i> EJ3; <i>Halobacterium salinarum</i> R1; <i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Thermococcus gammatolerans</i> EJ3; <i>Haloferax volcanii</i> DS2;	YP_003355454; YP_003424638; YP_002960503; YP_001688512; ADL59079; ACS34639; YP_003534871;
101a: MptA: GTP ciclohidrolasa (para síntesis de metanopterina)	<i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Methanococcus maripaludis</i> S2; <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3; <i>Thermococcus gammatolerans</i> EJ3; <i>Methanosarcina mazei</i> Go1; <i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1; <i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1; <i>Methanopyrus kandleri</i> AV19; <i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A; <i>Methanocaldococcus fervens</i> AG86; <i>Methanoregula boonei</i> 6A8; <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> ; <i>Methanosarcina barkeri</i> str. Fusaro; <i>Methanocaldococcus jannaschii</i> ;	YP_447347; YP_003424704; NP_987154; NP_143623; YP_002959796; NP_633246; YP_503757; YP_183206; NP_613770; NP_619377; YP_003128348; YP_001403641; NP_276324; YP_304731; NP_247760;
101b: MptB: Fosfodiesterasa cíclica (para síntesis de metanopterina)	<i>Methanococcus maripaludis</i> C5; <i>Roseobacter denitrificans</i> Och 114; <i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Zea mays</i> ; <i>Medicago truncatula</i> ;	ABO35741; YP_683148; AEE84108; NP_001151923; XP_003629873;
101c: RFAP: Ribofuranosilaminobenceno 5'-fosfato sintasa (para síntesis de metanopterina)	<i>Methanothermus fervidus</i> DSM 2088; <i>Methanocella paludicola</i> SANA;E; <i>Methanoplanus petrolearius</i> ; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Archaeoglobus veneficus</i> SNP6; <i>Thermococcus</i> sp. AM4; <i>Methanococcus maripaludis</i> S2; <i>Methanothermus fervidus</i> DSM 2088; <i>Methanocella paludicola</i> SANA;E;	YP_004003771; YP_003356610; ADN37264; YP_003424432; YP_004342012; YP_002582695; NP_987399; ADP77009; BAI61627;
102a: ComA: Fosfosulfolactato sintasa (para síntesis de Coenzima M)	<i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Methanococcus maripaludis</i> S2; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanothermus fervidus</i> DSM 2088; <i>Methanothermococcus okinawensis</i> IH1; <i>Methanobacterium</i> sp. SWAN-1; <i>Methanocaldococcus fervens</i> AG86; <i>Methanococcus voltae</i> A3; <i>Methanococcus maripaludis</i> C6;	ADL57861; NP_987393; ABC57647; YP_004004617; YP_004575938; YP_004519242; YP_003127444; ADI36986; YP_001548728;

	<i>Methanobacterium</i> sp. AL-21; <i>Methanococcus</i> aeolicus Nankai-3; <i>Methanotorris igneus</i> Kol 5; <i>Methanobacterium</i> sp. AL-21 <i>Methanococcus maripaludis</i> X1; <i>Methanocaldococcus infernus</i> ME; <i>Methanocaldococcus</i> sp. FS406-22;	YP_004291430; YP_001324357; AEF96400; ADZ10458; AEK19167; ADG13665; YP_003457919;
102b: ComB: 2-Fosfolactatofosfatasa (para síntesis de Coenzima M)	<i>Methanococcus maripaludis</i> S2; <i>Methanopyrus kandleri</i> AV19; <i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Methanococcus maripaludis</i> S2; <i>Methanocella paludicola</i> SANAE; <i>Methanothermus fervidus</i> DSM 2088; <i>Methanothermus fervidus</i> DSM 2088; <i>Methanobacterium</i> sp. AL-21; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803; <i>Synechococcus</i> sp. JA-2-3B'a (2-13); <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002; <i>Synechococcus</i> sp. WH 7803; <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51472; <i>Synechococcus</i> sp. WH 8016;	NP_987281; AAM01355; YP_003850451; CAF29717; YP_003357619 YP_004004784; ADP78022; YP_004289567; YP_003424691; BAK50080; YP_476548; YP_001735079; YP_001224757; EHC21417; ZP_08955317;
102c: ComC: Sulfolactato deshidrogenasa (para síntesis de Coenzima M)	<i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Methanothermus fervidus</i> DSM 2088; <i>Roseobacter litoralis</i> Och 149; <i>Methanococcus maripaludis</i> C5; <i>Methanothermus fervidus</i> DSM 2088;	ADL59162; ABC56689; YP_003850475; YP_004003953; YP_004689622; ABO34766; ADP77191;
102d: ComDE: Sulfopiruvato decarboxilasa (para síntesis de Coenzima M)	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A; <i>Methanocella paludicola</i> SANAE; <i>Methanocorpusculum labreanum</i> Z; <i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1; <i>Methanosarcina barkeri</i> str. Fusaro; <i>Methanocella paludicola</i> SANAE; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanococcus maripaludis</i> S2;	NP_618188; YP_003357048; YP_001029945; ABN56047; YP_306991; BAI62065; ABC56687; NP_988809;
102e: ComF: Sulfoacetaldehído deshidrogenasa (para síntesis de Coenzima M)	<i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Methanothermobacter</i> <i>thermautotrophicus</i>	comF; comF;
103a: homólogoLeuA: Isopropilmalato sintasa (para síntesis de CoenzimaB)	<i>Methanopyrus kandleri</i> AV19; <i>Methanothermobacter</i> <i>thermautotrophicus</i> ; <i>Thermoproteus tenax</i> ; <i>Thermoplasma volcanium</i> GSS1; <i>Methanobrevibacter smithii</i> ; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1; <i>Methanococcus maripaludis</i> S2; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942; <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51472; <i>Synechococcus</i> sp. WH 8016; <i>Synechococcus</i> sp. JA-2-3B'a (2-13) <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1;	AAM01606; AAB85956; CAF18516; NP_111428; ABQ87451; YP_447259; YP_003424897; NP_988183; NP_442009; ABB56460; EHC25498; ZP_08954784; YP_477672; NP_682187;
103b: homólogoLeuB: Isopropilmalato deshidrogenasa (para síntesis de CoenzimaB)	<i>Methanopyrus kandleri</i> AV19; <i>Methanothermobacter marburgensis</i> ; <i>Methanothermus fervidus</i> DSM 2088; <i>Methanocella paludicola</i> SANAE; <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ; <i>Methanocella paludicola</i> SANAE; <i>Methanococcus maripaludis</i> S2;	NP_614498; ADL58232; YP_004004146; YP_003358048; YP_447715; BAI63065; CAF30095;

		<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803; <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942; <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51472; <i>Synechococcus</i> sp. JA-2-3B'a (2-13); <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1;	NP_441348; ABB57535; EHC23198; YP_477855; NP_682390;
103c: homólogoLeuCD: Isopropilmalatoisomerasa síntesis de CoenzimaB)	(para	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15; <i>Halorhabdus tiamatea</i> SARL4B; <i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049; <i>Halomicrobium mukohataei</i> ; <i>Haladaptatus paucihalophilus</i> DX253; <i>Escherichia coli</i> O103:H2 str. 12009; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 8801; <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120; <i>Synechococcus</i> sp. JA-2-3B'a (2-13); <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1;	ADP98363,ADP98362; ZP_08559069; YP_135090; YP_003178469; ZP_08045715; YP_003220086,YP_003220085; NP_442926,NP_441618; YP_002370476, YP_002373868; NP_485460, NP_485459; YP_478232, YP_476588; NP_681699,NP_682024;
104: Activador σ^{54} (BmoR)	transcripcional	<i>Thauera butanivorans</i> ; <i>Zymomonas mobilis</i> ; <i>Pectobacterium wasabiae</i> WPP163; <i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1; <i>Glaciecola</i> sp. 4H-3-7+YE-5; <i>Rahnella</i> sp. Y9602; <i>Pseudoalteromonas</i> sp. ND6B; <i>Colwellia psychrerythraea</i> ; <i>Escherichia coli</i> KO11FL; <i>Pectobacterium carotovorum</i> ; <i>Dickeya dadantii</i> Ech703; <i>Enterobacter cloacae</i> str. Hanford; <i>Shewanella baltica</i> ; <i>Sphingobium chlorophenolicum</i> L-1; <i>Hirschia baltica</i> ATCC 49814; <i>Tolumonas auensis</i> DSM 9187; <i>Desulfomicrobium baculatum</i> ; <i>Enterobacter asburiae</i> LF7a; <i>Serratia</i> sp.; <i>Serratia plymuthica</i> AS9; <i>Brenneria</i> sp. EniD312; <i>Desulfovibrio africanus</i> str. Walvis Bay; <i>Desulfovibrio alaskensis</i> G20; <i>Ralstonia eutropha</i> ; <i>Thermodesulfatator indicus</i> ; <i>Syntrophothermus lipocalidus</i> ; <i>Rhodopirellula baltica</i> SWK14; <i>Thauera butanivorans</i> ;	AY093933; AEI37129, AEH62108; ACX88367; ADZ89640; AEE22284; ADW74353; KGJ99007; KGJ96343,KGJ93164 ; ADX51149; ACT13368; ACS85518; EPR39571; AEH13482,ADT93851; AEG49721; ACT60594; ACQ91718; ACU89329; AEN65074; AEG28401, AEF50694; AEF45743; EHD21179; EGJ49660; ABB40021; AAZ64425,CAJ97131; AEH43902; ADI01014,ADI01359; ELP35849,ELP32292; ABU68842;
105: λ -Rojaproteína β de unión a ADN de hebra simple (en inglés ssDNA)		Vector de clonación pKaKa2; Vector de clonación pKaKa1; Broad host range Red recombinase vector de expresión pRKclRed;	ADO63859; ADO63841; AAV68245, ACJ06678; ACJ06694, ACJ06689;
106: Lipasa		<i>Geobacillus</i> sp.; <i>Pseudomonas fluorescens</i> ; <i>Rhodococcus erythropolis</i> ; <i>Brachybacterium tyrofermentans</i> ; <i>Enterobacter aerogenes</i> (<i>K. mobilis</i>); <i>Enterobacter aerogenes</i> ; <i>Pseudomonas</i> sp. XD; <i>Pseudomonas syringae</i> ; <i>Proteus</i> sp. K107; <i>Rhizomucor miehei</i> ; <i>Rhizopus oryzae</i> ; <i>Paenibacillus polymyxa</i> CR1; <i>Fluviicola taffensis</i> DSM 16823; <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2); <i>Candida Antarctica</i> ,	JC8061; AAU10321; ACD89059; ACD89058; KHM31672, KHM31091; WP_032716299, WP_032712977; ACD89057; ACD89056, EFW83541; ACC76759; B34959; BAG16821,ACW84344; AIW42352,YP_009097503; YP_004343248; NP_625552; 3W9B_C,CAA83122 (Nov435);

	<i>Rhizomucor miehei</i> ; <i>Pseudomonas</i> sp. 7323; <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i> ; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714; <i>Arthrospira platensis</i> ; <i>Cyanobium</i> sp. CACIAM 14; <i>Nostoc</i> sp. PCC 7107; <i>Trichodesmium erythraeum</i> ; <i>Thermosynechococcus elongatus BP-1</i> ; <i>Prochlorococcus marinus</i> ; <i>Arthrospira maxima</i> ; <i>Auxenochlorella protothecoides</i> ; <i>Tetraselmis</i> sp. GSL018; <i>Pseudomonas (Burkholderia) cepacia</i> ;	4TGL_A; CAJ76166; BAC98499, BAC98498; AAA25882 (can use butanol); ABV69592,ABV69591; AIE72887; KDR54344, WP_006623978; KEF43153; WP_006670868; WP_011611331; NP_682772; WP_032526888; AFY45335; KFM28616; JAC66493; WP_027791175,M58494,WP_034204948 (use etanol);
107: Proteína de superficie celular	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ; <i>Chlorella variabilis</i> ; <i>Auxenochlorella protothecoides</i> ; <i>Coccomyxa subellipsoidea C-169</i> ; <i>Bryopsis plumose</i> ; <i>Micromonas</i> sp. RCC299; <i>Microcoleus vaginatus FGP-2</i> ; <i>Trichodesmium erythraeum IMS101</i> ; <i>Prochlorococcus marinus</i> ; <i>Synechococcus</i> sp. WH 7805; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803; <i>Synechococcus elongatus PCC 7942</i> ; <i>Arthrospira platensis</i> ; <i>Arthrospira platensis NIES-39</i> ; <i>Thermosynechococcus elongatus</i> ; <i>Thermosynechococcus elongatus BP-1</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Rhodospirillum rubrum SWK14</i> ; <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ; <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ; <i>Ostreococcus tauri</i> ; <i>Auxenochlorella protothecoides</i> ; <i>Bathycoccus prasinos</i> ; <i>Methanosarcina mazei Tuc01</i> ; <i>Methanosarcina barkeri</i> ; <i>Mycoplasma bovis</i> ; <i>Streptococcus salivarius</i> ; <i>Planktothrix agardhii NIVA-CYA 126/8</i> ; <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005; <i>Synechococcus</i> sp. JA-2-3B'a (2-13); <i>Spirulina subsalsa</i> ; <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> ; <i>Synechococcus</i> sp. JA-3-3Ab; <i>Coleofasciculus chthonoplastes</i> ; <i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106; <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> ; <i>Methanosarcina barkeri str. Fusaro</i> ;	XP_001700395, XP_001698887; EDP03875, XP_001692397; EEC44787, XP_002183604; XP_005851371; KFM28220,EFN59119; XP_005652245; BAI43481; ACO60738; EGK87709, EGK89095; YP_721603,YP_720732; WP_011863058,WP_011376568; EAR19866, BAA17432, P73456, NP_442714; ABB58124,ABB56302; WP_006623132, WP_014273948, WP_014275283, EKD10810; YP_005067833; WP_011058259, WP_011056416; NP_681159,BAC07773; EDO99169,AAW67003; ELP31779; EEC44786, EEC44540; ACI65532,XP_002186062; XP_003083807,CEF97038; KFM28329,KFM23052; XP_007508599, CCO20216; YP_007491104; WP_011307725, AAZ71684; ADR25157 (polyamine ABC) AEJ52906(polyamine); KEI65453 (polyamine ABC); CDM95113 (polyamine ABC); ABD03026 (polyamine ABC); WP_033374023 (polyamine ABC) KHG40085 (polyamine ABC); ABD00934 (polyamine); EDX75495 (polyamine ABC); EAW39210 (polyamine); KHG39958 (polyamine ABC); YP_306783,YP_306264;
108: Polipéptido con carga positiva	<i>Rhodnius prolixus</i> ; <i>Trichomonas vaginalis G3</i> ; <i>Trichomonas vaginalis G3</i> ; <i>Tobacco mosaic virus</i> ;	AAQ20830 (polylysine); XP_001301096 (polylysine); XP_001291750 (polylysine); NP_597749;
108: Piruvato Decarboxilasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Scheffersomyces stipites</i> ;	CAA39398,CAA54522; EAZ63682,EAZ63546;

	<i>Kluyveromyces lactis</i> ; <i>Acetobacter pasteurianus</i> ; <i>Brettanomyces bruxellensis</i> AWR1499; <i>Lachancea kluyveri</i> ; <i>Rhodospiridium toruloides</i> NP11; <i>Wickerhamomyces anomalus</i> ; <i>Pseudozyma brasiliensis</i> GHG001; <i>Kluyveromyces marxianus</i> ; <i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1; <i>Pseudozyma hubeiensis</i> SY62; <i>Histoplasma capsulatum</i> G186AR; <i>Cyberlindnera jadinii</i> ; <i>Hanseniaspora uvarum</i> ; <i>Zymomonas mobilis</i> ; <i>Cyanobacterium aponinum</i> PCC 10605; <i>Microcystis aeruginosa</i> ; <i>Synechococcus</i> sp. WH 8016; <i>Crocospaera watsonii</i> WH 0401; <i>Crocospaera watsonii</i> ; <i>Auxenochlorella protothecoides</i> ; <i>Cocomyxa subellipsoidea</i> C-169;	CAA59953; AAM21208; EIF49850; AAP75899,AAP75898; EMS25670; CAH56494; EST04586; BAO41366; ESW98764; GAC99677; EEH10009,EEH04743; BAI23188; AAA85103; AFN57569; AFZ53994; GAL91844, WP_002787689; EHA63558; CCQ62787, WP_021836129; WP_007303683, EAM53387; KFM24239; XP_005643654, EIE19110;
109: Formiate deshidrogenasa	<i>Candida boidinii</i> ; <i>Komagataella pastoris</i> ; <i>Metilophaga thiooxydans</i> ; <i>Metilophaga nitratireducenticrescens</i> ; <i>Mycobacterium vaccae</i> ; <i>Hyphomicrobium nitrativorans</i> NL23; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Vibrio tubiashii</i> ATCC 19109; <i>Cedecea neteri</i> ; <i>Klebsiella pneumonia</i> ; <i>Pluralibacter gergoviae</i> ; <i>Enterobacter</i> sp. R4-368; <i>Citrobacter braakii</i> ; <i>Citrobacter freundii</i> ; <i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Prochlorococcus</i> sp. scB245a_518D8; <i>Mastigocoleus testarum</i> ; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 8802; <i>Nostoc punctiforme</i> ; <i>Trichodesmium erythraeum</i> ; <i>Thermodesulfatator indicus</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Sulfobacillus acidophilus</i> DSM 10332; <i>Syntrophothermus lipocalidus</i> ; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6;	CAA09466,O13437; BAH57505; KGM07232, KGM07233; AFI83744,AFI83745; BAB69476; AHB48368; AAA23754; AIW15822; AIR05429,KHE39131; AIW99319,KHE25480; AIR00162; YP_008107767; KHE12739,KHE08171; KGY88354; KGY63138; WP_025936369; WP_027846123; WP_015783314; WP_012407412; WP_011610267; AEH45674, AEH46025; KFC29810; AEW04854; ADI02197; BAI69388,YP_003432590;
110: Formaldehído deshidrogenasa	<i>Sulfobacillus acidophilus</i> DSM 10332; <i>Geobacillus thermoglucosidans</i> ; <i>Geobacillus</i> sp. GHH01; <i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1; <i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6; <i>Burkholderia multivorans</i> ; <i>Granulicella mallensis</i> MP5ACTX8; <i>Arthrobacter</i> sp. PAMC25486; <i>Pseudomonas putida</i> ; <i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC 11170; <i>Bacillus</i> sp. BSC154; <i>Bacillus subtilis</i> BEST7613; <i>Hyphomicrobium zavarzinii</i> ; <i>Halopiger xanaduensis</i> SH-6; <i>Thalassotalea</i> sp. ND16A; <i>Brevibacillus brevis</i> ; <i>Pseudomonas putida</i> ;	AEW04442, YP_005256114; EID43710; AGE20787; NP_864907; YP_002489735,YP_002487096; YP_001583515; YP_005060061; AIY02235; AHZ74859,YP_004701746; YP_428486; KFI04000; BAM50883; CAC85637; YP_004595370, AEH35491; KGK00333; AEM59539; BAA04743,YP_007227278;

	<i>Halalkalicoccus jeotgali</i> B3; <i>Pseudomonas</i> sp. UW4; <i>Candidatus Halobonum tyrrellensis</i> ; <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> NB2011; <i>Halococcus thailandensis</i> JCM 13552; <i>Halococcus salifodinae</i> DSM 8989; <i>Halococcus saccharolyticus</i> DSM 5350; <i>Haloarcula japonica</i> DSM 6131; <i>Haloferax denitrificans</i> ATCC 35960; <i>Haloferax sulfurifontis</i> ATCC BAA-897; <i>Haloferax alexandrinus</i> JCM 10717; <i>Natrialba aegyptia</i> DSM 13077; <i>Burkholderia</i> sp. SJ98; <i>Burkholderia terrae</i> BS001; <i>Pseudomonas fluorescens</i> A506; <i>Haloquadratum walsbyi</i> C23; <i>Natrialba taiwanensis</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803; <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942; <i>Arthrospira platensis</i> ; <i>Amycolatopsis metanolica</i> 239; <i>Mycobacterium marinum</i> MB2;	YP_003736860,ADJ15068; AFY22196; ESP87727; EPB95789; EMA53947; EMA52447; EMA44468; EMA27812; EMA06490; ELZ96420; ELZ95747; ELZ03549; EKS67251; EIM95920; YP_006326331; YP_005841059; WP_006824465; BAA22412; NP_440484; ABB56491; YP_005071621; AIJ21411; EPQ77120;
111: Proteína de resistencia a tetraciclina (tetA)	<i>Escherichia coli</i> ; Vector de clonación pRK7813; Vector de clonación pKS800; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Corynebacterium glutamicum</i> ; <i>Thermococcus gammatolerans</i> EJ3; <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2); <i>Streptococcus pneumoniae</i> Taiwan; <i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar El Tor; <i>Burkholderia glumae</i> PG1; <i>Rhizobium etli</i> bv. phaseoli str. IE4803;	P02981; AGF38340; BAJ06605; YP_008997867,AHF45941; NP_052571, AAD25063; YP_002958733, YP_002959779; CAC14348,NP_625085; ACO23503; BAG66128; AJK48844; AJC80365;
112: Proteína de resistencia a Kanamicina (Kan ^r)	<i>Campylobacter jejuni</i> ; Vector de clonación pLMK; yfp plasmidomarcador pWM1011; cfp plasmido marcador pWM1009; constructo sintético; cfp plasmido marcador pWM1012; Vector de clonación pNIGEL19;	CAD35325; CAP74563; AAG34047; AAG34043; CAA05684; AAG34051; ACO48265;
113: Proteína de resistencia a Gentamicina	<i>Bacillus cereus</i> ; Vector de clonación pCR2.1-gentR; Vector de clonación pTH1522; Vector de clonación pJC8; Plasmido R; <i>Enterococcus gallinarum</i> ; Vector de entrega de transposónpZXL5; <i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407; Baculovirus vector de expression pFastBac1-HM;	WP_016513111, EOP95255; ABS71237; ABC47322; AGA63621; AAA19915; AAB49832; AFD97621; YP_006926052; AAT09789;
114: Proteína de resistencia a Espectinomicina (Spcr)	<i>Streptomyces netropsis</i> <i>Streptomyces spectabilis</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; Vector de clonación pCDF-J23100-TetO-lacI-LVA;synthetic vector pCDF-MCS; Vector de entrega pDGIEF; Vector de entrega pIEF16S; <i>Listeria innocua</i> ; <i>Micromonospora</i> sp. ATCC 39149; vector binariopOSCAR; vector suicidapMRKO1; Vector de entrega de transposón	AAB66654; AAF63341; KII21062; AIO11020; AIS22788; ABC88414; ABC88419; YP_008119852,AGN12845; EEP72249; ADR73032; ADV78249; ABV70028;

	pAW068; Vector de transporte pMTL83353; Vector de clonación pFW_GFP;	ACR43899; AAC53685;
114: Proteína de resistencia a Estreptomicina (aadA)	<i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; Vector de Integración pZR606; <i>Escherichia coli</i> Vector de clonación pBAMD1-4;; <i>Streptococcus dysgalactiae</i> ; <i>Salmonella enterica</i> ; <i>Staphylococcus rostri</i> ; <i>Agrobacterium sp. H13-3</i> ; Vector de expresión pBS437V; Vector de clonación pBS152v;	AIK76614, AIK74539; YP_007349701, AIK72509; AHZ10952; AAO49597,ADH82152; AIX94015; BAM60369; BAK19730; CBA13544; ADY64157; AAP45701; AAG09291;
115: Proteína de resistencia a Ampicilina (<i>amp^r</i>)	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> ; <i>Bacillus weihenstephanensis</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> MB73/2; Vector de clonación pUG7; Vector de expresión pTip-CH2; vector templado PCR pUG6; Vector de clonación pCAT-Mgen-recA; Vector de expresión de recombinasa pSH47; <i>Baculovirus</i> vector de expresión pRADM; Vector de transporte pNR-46121; Vector sintético pET-T7p(-12T)-Espaciador A-GFP-LVA;	YP_006952162, YP_006952158; EGI75151; AIW88365; EME04863; AAG34548; BAD11229; AAG34544; AFM47375; AAG34516; AEY64193; AIL56504 AIS22810;
116: Proteína de resistencia a Cloramfenicol (CmR)	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ; Vector de clonación pDEST414CYC1t7; Vector de clonación pIPKTA30N; Vector de clonación GWluc-basic; <i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103; Levaduravector de expresión pJG518; Vector binario pEAQ-HT-DEST3; Vector binario pIPKb009; vector de expresión pUCDMIG vector de expresión transiente de planta;	NP_044444, AAB46601; AGL80176; ABQ65200; ABO76903; ADD75805; AAX94717; ACV49954; ABW70109; AEY64192; AFX83551;
117: Proteína de resistencia a Higromicina (hph)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; Vector de clonación pMQ351 Vector de clonación pNIGEL17; <i>Salmonella enterica</i> ; Vector de clonación pMQ300; BiFC vector pCHGC155;	YP_007349547, CCN79980; ADQ43406; ACO48271; AIT72690; ADK63421; AGH62558;
118: Proteína de resistencia a Glifosato (epsp) o, glifosatoacetil transferasa (Gat)	<i>Agrobacterium sp. CP4</i> ; constructo sintético; <i>Escherichia coli</i> K-12; <i>Amaranthus tuberculatus</i> ; <i>Amaranthus palmeri</i> ; <i>Gluconobacter frateurii</i> NBRC 103465; <i>Pseudomonas sp. PG2982</i> ; Vector de clonación pAM3G; Vector mini-Tn7-gat; Vector de clonación pwFRT-GSr; Vector de clonación pFlp-AB7;	Q9R4E4 (CP4 EPSP sintasa); AII80555, AEM75108 (CP4); P0A6D3 (epsp); ACV67278, ACV67277 (epsp); ACV53022, ACV53021 (epsp); GAD08994; P18896; ADO63834; ACX31712; ACJ70055; ACJ70061;
119: Argininosuccinatoliasa (arg7)	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1; <i>Arthrospira platensis</i> ; <i>Spirulina subsalsa</i> ; <i>Arthrospira maxima</i> CS-328; <i>Synechocystis sp. PCC 6803</i> ; <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942; <i>Synechococcus sp. PCC 7002</i> ; <i>Nostoc sp. PCC 7107</i> ;	NP_681156, BAC07918; YP_005067487, BAI88949; WP_017306995; EDZ94142; NP_440604, WP_010871913; ABB58505; ACB00465; YP_007051699;

	<i>Cyanobacterium aponinum</i>; <i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122; <i>Synechococcus</i> sp. WH 8016; <i>Prochlorococcus marinus</i>; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlorella variabilis</i> <i>Auxenochlorella protothecoides</i>; <i>Bathycoccus prasinus</i>; <i>Shewanella algae</i>; <i>Emiliana huxleyi</i> CCMP1516 <i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP1335 <i>Ralstonia eutropha</i> H16; <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134; <i>Zymomonas mobilis</i> <i>Syntrophothermus lipocalidus</i>; <i>Hippea maritima</i> DSM 10411; <i>Sulfobacillus acidophilus</i> DSM 10332; <i>Thermovirga lienii</i> DSM 17291; <i>Thermodesulfatator indicus</i>; <i>Geobacillus thermoleovorans</i>; <i>Caldicellulosiruptor kristjanssonii</i>; <i>Thermus</i> sp. CCB_US3_UF1; <i>Caldicellulosiruptor hydrothermalis</i>; <i>Melioribacter roseus</i> P3M-2; <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>; <i>Bacillus metanolicus</i> MGA3; <i>Spirochaeta thermophila</i>; <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-6; <i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1; <i>Geobacillus</i> sp. JF8; <i>Bacillus subtilis</i>; <i>Bacillus coagulans</i> 2-6; <i>Anoxybacillus</i> sp. BCO1; <i>Thermus</i> sp. CCB_US3_UF1; <i>Thermoanaerobacter</i> sp. YS13; <i>Methanothermobacter marburgensis</i>; <i>Methanothermobacter</i> <i>thermautotrophicus</i>; <i>Methanocella conradii</i> HZ254; <i>Methanoregula formicica</i> SMSP; <i>Methanococcus maripaludis</i> S2; <i>Methanococcoides metilutens</i>; <i>Methanococcus maripaludis</i> OS7; <i>Methanococcus maripaludis</i> KA1; <i>Methanococcus maripaludis</i> S2; <i>Bacillus metanolicus</i> MGA3; <i>Candida maltosa</i> Xu316; <i>Clostridium pasteurianum</i> NRRL B-598; <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 (<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120);	AFZ52419; AFZ58080; EHA59113; WP_032525717, WP_032523803; CAA34615, CAA09001; EFN52305, XP_005844407; KFM28402; XP_007510956; WP_025011590; EOD30692, XP_005783121; EED90549; CAJ94001, QOK7M0; AAZ63178, AAZ60077 ; WP_023593629, WP_015740233; ADI02913; AEA33832; AEW04357; AER66275; AEH45167; AEV20403; ADQ40738; AEV17054; ADQ07194; AFN74157; ABP67398; AIE61023; ADN02278; YP_003433478, BAI70277 ; YP_001244661; AGT33097; KFC31226; AEH53530; KHF26873; AEV16454; KHO61828; WP_013295538, ADL58314 ; BAM69481, AAB84775; YP_005379810, AFC99291; AGB03410; NP_987133; KGK97821; BAP62099; BAP60130; CAF29569; EIJ84201, EIJ79262; EMG47575; ETD70657; NP_487927, BAB75586, WP_010998028;
120: Nitrato reductasa	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1; <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803; <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942; <i>Arthrospira platensis</i>; <i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca; <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005; <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142; <i>Cyanothece</i> sp. PCC 8801; <i>Stanieria cyanosphaera</i> PCC 7437; <i>Synechococcus</i> sp. CC9311; <i>Synechococcus</i> sp. JA-2-3B'a (2-13); <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002; <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120;	NP_682145, BAC08907; AGF51177, BAA17488; CAA52675; YP_005067893, BAI89355; KDR58325; CDM94135, CCE18678; ACB50564; AAO25121; AFZ35100; ABI46326, ABI46326; ABD01041; ACA99311; NP_484656, BAB72570;

	<i>Cyanobium sp. CACIAM 14;</i> <i>Dolichospermum circinale;</i> <i>Aphanizomenon flos-aquae;</i> <i>Planktothrix prolifica;</i> <i>Pseudanabaena sp. PCC 6802;</i> <i>Anabaena sp. 90;</i> <i>Cyanothece sp. ATCC 51142;</i> <i>Prochlorococcus marinus;</i> <i>Prochlorococcus sp. scB241_528J8;</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii;</i> <i>Shewanella algae;</i> <i>Chlorella vulgaris;</i> <i>Pseudochlorella pringsheimii;</i> <i>Dunaliella salina;</i> <i>Volvox carteri;</i> <i>Dunaliella viridis;</i> <i>Coccomyxa subellipsoidea C-169;</i> <i>Gracilaria tenuistipitata;</i> <i>Heterosigma akashiwo;</i> <i>Nannochloropsis sp. W2J3B;</i> <i>Bathycoccus prasinos;</i> <i>Phaeodactylum tricornutum;</i> <i>Cyanidioschyzon merolae cepa 10D;</i> <i>Thalassiosira oceanica;</i> <i>Ralstonia eutropha H16;</i> <i>Burkholderia sp. K24;</i> <i>Bacillus thuringiensis serovar;</i> <i>Metilomonas denitrificans;</i> <i>Marinithermus hydrothermalis;</i> <i>Bacillus subtilis;</i> <i>Geobacillus sp. JF8;</i> <i>Thermodesulfatator indicus;</i> <i>Caldicellulosiruptor hydrothermalis;</i> <i>Thermovirga lienii DSM 17291;</i> <i>Caldicellulosiruptor kronotskyensis;</i> <i>Desulfovibrio vulgaris str. 'Miyazaki F';</i> <i>Desulfovibrio sp. FW1012B;</i> <i>Thiorhodococcus drevsii AZ1;</i> <i>Thiocapsa marina 5811;</i> <i>Hyphomicrobium nitrativorans NL23;</i> <i>Ogataea angusta;</i> <i>Rhodotorula glutinis ATCC 204091;</i> <i>Wickerhamomyces anomalus;</i> <i>Blastobotrys adeninivorans;</i> <i>Ogataea angusta;</i>	KEF41492; WP_028090041; WP_027400668; WP_026796600; WP_026102963; AFW96426; ACB50564; WP_032520378; WP_025926746; EDP00805, XP_001696697; WP_025008973; ACF22999, ABP97095; AAP32278; AGC97428, AAP75705; AAA11144; AAT72293, ABJ91208; XP_005646409, EIE21865; ACX31653, ACX31652; ACS44801; AET85052; XP_007514576; AAV66996; XP_005535839; EJK46860; CAA50508; KFX64654; EXL37784; KHD30476; AEB12539; KFC29867; AGT32146, AGT31099; AEH45676; ADQ07227; AER66908; ADQ46341; ACL08432; EHJ47733; EGV31372; EGV16886; AHB47344; CAA11232; EGU11696; AAF28059; CAQ77148; CAA88925;
--	--	---

Vías de Producción de Butanol de diseño canalizadas con el Ciclo de Calvin

De acuerdo a una de varias representaciones, una vía de diseño canalizada con el Ciclo de Calvin es creada de manera tal que toma el producto intermediario del ciclo de Calvin 3-fosfoglicerato, y lo convierte en 1-butanol mediante el uso de , por ejemplo, un conjunto de enzimas consistente en (como se muestra con las etiquetas numéricas **34**, **35**, **03–05**, **36-43** en La Figura4): gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34**, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvatoquinasa **05**, citromalato sintasa **36**, 2-

metilmalato deshidratasa **37**, 3-isopropilmalato deshidratasa **38**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, 2-Isopropilmalato Sintasa **40**, isopropilmalato isomerasa **41**, 2-cetoácido decarboxilasa **42**, y alcohol deshidrogenasa (dependiente de NAD) **43**. En este diseño de la vía, como se ha mencionado más arriba, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34** y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35** sirven como un mecanismo de conversión NADPH/NADH que puede convertir cierta cantidad del NADPH generado fotosintéticamente a NADH el que puede ser usado por la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADH **43** (ejemplos de los genes que codifican para estas con los siguientes números de accesos GenBank: BAB59540, CAA89136, NP_148480) para la producción de 1-butanol por la reducción de butirilaldehído.

De acuerdo a una de varias representaciones, es una práctica preferida usar además una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH **44** la que puede usar NADPH como fuente reductora de manera de disminuir el requerimiento del suministro de NADH para la producción fotobiológica aumentada de butanol y otros alcoholes. Como se lista en la Tabla 1, ejemplos de alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH **44** incluyen (pero no se limitan a) enzimas con cualquiera de los siguientes números de accesos de GenBank: YP_001211038, ZP_04573952, XP_002494014, CAY71835, NP_417484, EFC99049, y ZP_02948287.

Nótese, la 2-cetoácido decarboxilasa **42** (p.ej., AAS49166, ADA65057, CAG34226, AAA35267, CAA59953, A0QBE6, A0PL16) y alcohol deshidrogenasa **43** (y/o **44**) tienen una amplia especificidad de sustrato. Consecuentemente, su uso puede resultar en la producción no solo de 1-butanol pero también otros alcoholes tales como propanol dependiendo en los antecedentes genéticos y metabólicos de los organismos fotosintéticos huéspedes. Esto es porque los 2-cetoácidos pueden ser convertidos a alcoholes por la 2-cetoácido decarboxilasa **42** y la alcohol deshidrogenasa **43** (y/o **44**) debido a su amplia especificidad de sustrato. Por lo tanto, de acuerdo a otra representación, es una práctica preferida el usar una enzima de sustrato específico tal como la butanol deshidrogenasa **12** cuando/si la producción de 1-butanol es deseable. Como se lista en la Tabla 1, ejemplos de la butanol deshidrogenasa son butanol deshidrogenasa dependiente de NADH (p.ej., GenBank: YP_148778, NP_561774, AAG23613, ZP_05082669, ADO12118) y/o butanol deshidrogenasa dependiente de

NAD(P)H (p.ej., NP_562172, AAA83520, EFB77036, EFF67629, ZP_06597730, EFE12215, EFC98086, ZP_05979561).

En una de varias representaciones, otra vía de producción de diseño de 1-butanol canalizada con el ciclo de Calvin es creada de manera tal que toma el producto intermediario del ciclo de Calvin, 3-fosfoglicerato, y lo convierte en 1-butanol mediante el uso de, por ejemplo, un conjunto de enzimas consistentes en (como se muestra con las etiquetas numéricas **34, 35, 03, 04, 45-52 y 40-43 (44/12)** en la Figura 4): gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34**, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35**, fosfogliceratomutasa **03**, enolasa **04**, fosfoenolpiruvato carboxilasa **45**, aspartato aminotransferasa **46**, aspartoquinasa **47**, aspartatoe-semialdehído deshidrogenasa **48**, homoserina deshidrogenasa **49**, homoserinaquinasa **50**, treonina sintasa **51**, treoninaamónio-liasa **52**, 2-isopropilmalato sintasa **40**, isopropilmalatoisomerasa **41**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, 2-cetoácido decarboxilasa **42**, y alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD **43** (y/o alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH **44**, o butanol deshidrogenasa **12**).

De acuerdo a otra representación, las vías de producción de 1-butanol relacionadas con metabolismo de aminoácidos [etiquetas numéricas **03–05, 36-43**; y/o **03, 04, 45-52 y 39-43 (44/12)**] pueden operar en combinación y/o en paralelo con otras vías de producción fotobiológica de butanol. Por ejemplo, como se muestra también en la Figura 4, la vía de producción de 1-butanol derivada de Fructosa-6-fosfato (etiquetas numéricas **13-32 y 44/12**) pueden operar con las partes de las vías relacionadas al metabolismo de aminoácidos [etiquetas numéricas **36-42**, y/o **45-52 y 40-42**] con piruvato y/o fosfoenolpiruvato como sus puntos de unión.

Ejemplos de genes (constructos de ADN) de diseño para vías de producción de 1-butanol canalizados con el ciclo de Calvin se muestran en la lista de secuencias de ADN. SEQ ID NOS: 58–70 representan un conjunto de genes de diseño para una vía de producción de 1-butanol canalizada con el ciclo de Calvin controlado por el promotor nirA (como se muestra en las etiquetas numéricas **34, 35, 03–05, y 36-43** en la Figura 4) en una oxifotobacteria huésped tal como *Thermosynechococcus elongatus* BP1. Brevemente, SEQ ID NO: 58 presenta el ejemplo 58 de un constructo de ADN de diseño para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de

NADPH controlada por el promotor NirA **(34)** (1417 pb) que incluye: un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21–251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1277) seleccionada/modificada de la secuencia de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH de *Staphylococcus aureus* 04-02981 (GenBank: ADC37857), un terminador de 120-bp *rbcS* de BP1 (1278–1397), y un partidor PCR RE (1398–1417) en el extremo 3’.

La SEQ ID NO: 59 presenta el ejemplo 59 de un constructo de ADN de diseño para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD controlada por el promotor NirA **(35)** (1387 pb) que incluye: un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21–251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1247) seleccionada/modificada de la secuencia de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD de *Edwardsiella tarda* FL6-60 (GenBank: ADM41489), un terminador de 120-bp *rbcS* de BP1 (1248–1367), y un partidor PCR RE (1368–1387) en el extremo 3’.

La SEQ ID NO: 60 presenta el ejemplo 60 de un constructo de ADN de diseño para la Fosfoglicerato mutasa controlada por el promotor NirA **(03)** (1627 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21–251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1487) seleccionada/modificada de la secuencia de la fosfoglicerato mutasa de *Oceanithermus profundus* DSM 14977 (GenBank: ADR35708), un terminador de 120-bp *rbcS* de BP1 (1488–1607), y un partidor PCR RE (1608–1627) .

La SEQ ID NO: 61 presenta el ejemplo 61 de un constructo de ADN de diseño para la Enolasa controlada por el promotor NirA **(04)** (1678 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21–251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1538) seleccionada de la secuencia de la Enolasa de *Syntrophothermus* (GenBank: ADI02602), un terminador de 120-bp *rbcS* de BP1 (1539–1658), y un partidor PCR RE (1659–1678) .

La SEQ ID NO: 62 presenta el ejemplo 62 de un constructo de ADN de diseño para la Piruvato Quinasa controlada por el promotor NirA **(05)** (2137 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21–251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1997)

seleccionada de la secuencia de la piruvato quinasa de *Syntrophothermus lipocalidus* (GenBank: ADI02459), un terminador de 120-bp *rbcS* de BP1 (1998–2117), un partidor PCR RE (2118–2137) .

La SEQ ID NO: 63 de un constructo de ADN de diseño para la Citramalato Sintasa controlada por el promotor NirA (**36**) (2163 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21–325), una secuencia que codifica para la enzima (326–1909) seleccionada y modificada de la secuencia de la citramalato sintasa de *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 (YP_003433013), un terminador de 234-pb *rbcS* de BP1 (1910–2143), un partidor PCR RE (2144–2163).

La SEQ ID NO: 64 presenta el ejemplo 64 de un constructo de ADN de diseño para la 3-Isopropilmalato/(R)-2-Metilmalato Deshidratasa controlada por el promotor NirA (**37**) (2878 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21–251), una secuencia que codifica para la subunidad mayor de la 3-isopropilmalato/(R)-2-metilmalato deshidratasa (252–2012) seleccionada/modificada de la secuencia de la subunidad mayor de la 3-isopropilmalato/(R)-2-metilmalato deshidratasa de *Eubacterium* (YP_002930810), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus* (2013–2243), una secuencia que codifica para la subunidad pequeña de la 3-isopropilmalato/(R)-2-metilmalato deshidratasa (2244–2738) seleccionada/modificada de la secuencia de la subunidad pequeña de la 3-isopropilmalato/(R)-2-metilmalato deshidratasa de *Eubacterium* (YP_002930809), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (2739–2858), y un partidor PCR RE (2859–2878).

La SEQ ID NO: 65 presenta el ejemplo 65 de un constructo de ADN de diseño para la 3-Isopropilmalato Deshidratasa controlada por el promotor NirA (**38**) (2380 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21–251), una secuencia que codifica para la subunidad grande de la 3-isopropilmalato deshidratasa (252–1508) seleccionada/modificada de las secuencias de la subunidad grande de la 3-isopropilmalato deshidratasa de *Thermotoga petrophila* (ABQ46641), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (1509–1739), una secuencia que codifica para la subunidad pequeña de la 3-isopropilmalato deshidratasa (1740–2240)

seleccionada/modificada de las secuencias de la subunidad pequeña de la 3-isopropilmalato deshidratasa de *Thermotoga* (ABQ46640), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (2241–2360), y un partidor PCR RE (2361–2380).

La SEQ ID NO: 66 presenta el ejemplo 66 de un constructo de ADN de diseño para la 3-Isopropilmalato Deshidrogenasa controlada por el promotor NirA (**39**) (1456 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la 3-isopropilmalato deshidrogenasa (252–1316) seleccionada de las secuencias de la 3-isopropilmalato deshidrogenasa de *Thermotoga* 3 (GenBank: CP000702 Region 349983..351047), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1317–1436), y un partidor PCR RE (1437–1456) .

La SEQ ID NO: 67 presenta el ejemplo 67 de un constructo de ADN de diseño para la 2-Isopropilmalato sintasa controlada por el promotor NirA (**40**, EC 4.1.3.12) (1933 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1793) seleccionada/modificada de la secuencia de la 2-Isopropilmalato sintasa de *Thermotoga petrophila* (CP000702 Region: 352811..354352), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1794–1913), y un partidor PCR RE (1914–1933) .

La SEQ ID NO: 68 presenta el ejemplo 68 de un constructo de ADN de diseño para la Isopropilmalato isomerasa controlada por el promotor NirA (**41**) (2632 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la subunidad grande de la subunidad grande de la isopropilmalato isomerasa (252–1667) seleccionada/modificada de la secuencia de la subunidad grande de la isopropilmalato isomerasa de *Geobacillus kaustophilus* (YP_148509), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus* (1668-1898), una secuencia que codifica para la subunidad pequeña de la subunidad pequeña de la isopropilmalato isomerasa (1899–2492) seleccionada/modificada de la secuencia de la subunidad pequeña de la isopropilmalato isomerasa de *Geobacillus kaustophilus* (YP_148508), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (2493–2612), y un partidor PCR RE (2613–2632).

La SEQ ID NO: 69 presenta el ejemplo 69 de un constructo de ADN de diseño para la 2-Cetoácido Decarboxilasa controlada por el promotor NirA (**42**) (2035 pb) que

incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la 2-Cetoácido Decarboxilasa (252–1895) seleccionada/modificada de la secuencia de la alfa-cetoácido decarboxilasa de cadena ramificada de *Lactococcus lactis* (AAS49166), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1896–2015), y un partidor PCR RE (2016–2035) en el extremo 3’.

La SEQ ID NO: 70 presenta el ejemplo 70 de un constructo de ADN de diseño para la Alcohol Deshidrogenasa dependiente de NAD controlada por el promotor NirA (**43**) (1426 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1286) seleccionada/modificada de la secuencia de la Alcohol Deshidrogenasa dependiente de NAD *Aeropyrum pernix* K1 (NP_148480), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1287–1406), y un partidor PCR RE (1407–1426).

Como se mencionó anteriormente, el uso de la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH **44** la que puede usar NADPH como fuente reductora puede ayudar a aliviar el requerimiento de NADH para la producción fotobiológica aumentada de butanol y otros alcoholes. SEQ ID NO: 71 presenta el ejemplo 71 de un constructo de ADN de diseño para la Alcohol Deshidrogenasa dependiente de NADPH controlada por el promotor NirA (**44**) (1468 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1328) seleccionada de la secuencia de la Alcohol Deshidrogenasa dependiente de NADPH con especificidad de sustrato amplia de *Pichia pastoris* (XP_002494014), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1329–1458), y un partidor PCR RE (1459–1468) en el extremo 3’. En uno de los ejemplos, este tipo de gen para la Alcohol Deshidrogenasa dependiente de (SEQ ID NO: 71) es también usada en la construcción de una vía de producción de butanol canalizada con el ciclo de Calvin.

Sin embargo, debido a la amplia especificidad de sustrato de la 2-cetoácido decarboxilasa (**42**, SEQ ID NO: 69) y de la alcohol deshidrogenasa (**43**, SEQ ID NO: 70; o **44**, SEQ ID NO: 71), la vía expresada con los genes de diseño de las SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 71 (y/o SEQ ID NO: 70) pueden resultar en la producción de mezclas de alcoholes más que alcoholes únicos ya que todos los 2-cetoácidos pueden ser

convertidos a alcoholes por las dos enzimas de amplia especificidad de sustrato. Por lo tanto, para mejorar la especificidad de la producción de 1-butanol, es una práctica preferida el usar la butanol deshidrogenasa **12** que tiene mayor especificidad de sustrato. SEQ ID NO: 72 presenta el ejemplo 72 de un constructo de ADN de diseño para la Butanol Deshidrogenasa dependiente de NADH controlada por el promotor NirA (**12a**) (1555 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1415) seleccionada/modificada de la secuencia de la Butanol Deshidrogenasa dependiente de NADH de *Geobacillus kaustophilus* (YP_148778), un terminador de 120-pb rbcS de BP1 (1416–1535), y un partidor PCR RE (1536–1555) en el extremo 3’.

La SEQ ID NO: 73 presenta el ejemplo 73 de un constructo de ADN de diseño para la Butanol Deshidrogenasa dependiente de NADPH controlada por el promotor NirA (**12b**) (1558 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la Butanol Deshidrogenasa dependiente de NADPH (252–1418) seleccionada/modificada de la secuencia de la Butanol Deshidrogenasa dependiente de NADPH de *Clostridium perfringens* (NP_562172), un terminador de 120-pb rbcS de BP1 (1419–1528), y un partidor PCR RE (1529–1558) en el extremo 3’.

La El uso de las SEQ ID NOS: 72 y/o 73 (12a y/o 12b) junto con las SEQ ID NOS: 58–69 representa una vía de producción de 1-butanol canalizada con el ciclo de Calvin específica, etiquetada numéricamente como **34, 35, 03–05, 36–42 y 12** en La Figura 4.

La SEQ ID NOS: 74–81 representa una vía alternativa (relacionada con el metabolismo de aminoácidos) (**45–52** en la Figura 4) que se desprende desde el punto de fosfoenolpiruvato y se une en el punto de 2-cetobutirato en la vía de producción de butanol canalizada con el ciclo de Calvin. Brevemente, la SEQ ID NO: 74 presenta el ejemplo 74 de un constructo de ADN de diseño para la Fosfoenolpiruvato Carboxilasa controlada por el promotor nirA (**45**) (3646 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–3506) seleccionada/modificada de la secuencia de la Fosfoenolpiruvato Carboxilasa de

Thermaerobacter subterraneus DSM 13965 (EFR61439), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (3507–3626), y un partidor PCR RE (3627–3646) en el extremo 3’.

La SEQ ID NO: 75 presenta el ejemplo 75 de un constructo de ADN de diseño para la Aspartato Aminotransferasa controlada por el promotor nirA (46) (1591 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21–251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1451) seleccionada/modificada de la secuencia de la Aspartato Aminotransferasa de *Thermotoga lettingae* (YP_001470126), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1452–1471), y un partidor PCR RE (1472–1591) .

La SEQ ID NO: 76 presenta el ejemplo 76 de un constructo de ADN de diseño para la Aspartato Quinasa controlada por el promotor nirA (47) (1588 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21–251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1448) seleccionada/modificada de la secuencia de la Aspartato quinasa de *Thermotoga lettingae* TMO (YP_001470361), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1449–1568), y un partidor PCR RE (1569–1588).

La SEQ ID NO: 77 presenta el ejemplo 77 de un constructo de ADN de diseño para la Aspartato Semialdehído Deshidrogenasa controlada por el promotor nirA (48) (1411 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21–251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1271) seleccionada/modificada de la secuencia de la Aspartato Semialdehído Deshidrogenasa de *Thermotoga lettingae* TMO (YP_001470981), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1272–1391), y un partidor PCR RE (1392–1411) en el extremo 3’.

La SEQ ID NO: 78 presenta el ejemplo 78 de un constructo de ADN de diseño para la Homoserina Deshidrogenasa controlada por el promotor nirA (49) (1684 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21–251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1544) seleccionada/modificada de la secuencia de la Homoserina Deshidrogenasa de *Syntrophothermus lipocalidus* DSM 12680 (ADI02231), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1545–1664), y un partidor PCR RE (1665–1684) en el extremo 3’.

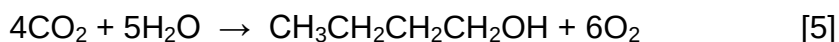
La SEQ ID NO: 79 presenta el ejemplo 79 de un constructo de ADN de diseño para la Homoserina Quinasa controlada por el promotor nirA (**50**) (1237 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21–251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1097) seleccionada/modificada de la secuencia de la Homoserina Quinasa de *Thermotoga petrophila* *RKU-1* (YP_001243979), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1098–1217), y un partidor PCR RE (1218–1237) en el extremo 3'.

La SEQ ID NO: 80 presenta el ejemplo 80 de un constructo de ADN de diseño para la Treonina Sintasa controlada por el promotor nirA (**51**) (1438 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21–251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1298) seleccionada de la secuencia de la Treonina Sintasa *Thermotoga* (YP_001243978), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1299–1418), y un partidor PCR RE (1419–1438).

La SEQ ID NO: 81 presenta el ejemplo 81 de un constructo de ADN de diseño para la Treonina Amonio Liasa controlada por el promotor nirA (**52**) (1600 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21–251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1460) seleccionada/modificada de la secuencia de la treonina amonio liasa de *Geobacillus kaustophilus* (BAD75876), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1461–1580), y un partidor PCR RE (1581–1600) en el extremo 3'.

Nótese, las SEQ ID NOS: 58–61, 74–81, 66–69, y 72 (y/o 73) representan un conjunto de muestras de genes de diseño que pueden expresar una vía de producción fotosintética de butanol mejorada, dependiente de NADPH y derivada de 3-fosfoglicerato del ciclo de Calvin de **34, 35, 03, 04, 45–52 40, 41, 39, 42, y 12** mientras que las SEQ ID NOS: 58–69 y 72 (y/o 73) representan otro conjunto de muestras de genes de diseño que pueden expresar una vía de producción fotosintética de butanol mejorada, dependiente de NADPH y derivada de 3-fosfoglicerato del ciclo de Calvin numeradas como **34, 35, 03–05, 36–42, y 12** en la Figura 4. El resultado neto de las vías fotosintéticas dependientes de NADPH mejoradas que operan con el ciclo de Calvin son la producción fotobiológica de 1-butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) usando ATP (Adenosina trifosfato) generado

fotosintéticamente y NADPH (dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato reducido) de acuerdo al siguiente proceso de reacción:



Vías Productoras de 2-Metil-Butanol canalizadas con el Ciclo de Calvin

De acuerdo a una de varias representaciones, una vía Productora de 2-Metil-Butanol canalizada con el Ciclo de Calvin es creada de manera tal que toma el producto intermediario del ciclo de Calvin, 3-fosfoglicerato, y lo convierte a isobutanol mediante el uso de, por ejemplo, un conjunto de enzimas consistente en (como se muestran con las etiquetas numéricas **34**, **35**, **03–05**, **36–39**, **53–55**, **42**, **43** or **44/56** en La Figura 5): gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34**, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvato quinasa **05**, citramalato sintasa **36**, 2-metilmalato deshidratasa **37**, 3-isopropilmalato deshidratasa **38**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, acetolactato sintasa **53**, cetoácido reductoisomerasa **54**, dihidroxi ácido deshidratasa **55**, 2-cetoácido decarboxilasa **42**, y Alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD **43** (o Alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH **44**; más preferentemente, 2-metilbutiraldehído reductasa **56**).

En otra representación, una vía Productora de 2-Metil-Butanol canalizada con el Ciclo de Calvin es creada de manera tal que toma el producto intermediario del ciclo de Calvin, 3-fosfoglicerato, y lo convierte a 2-metil-1-butanol mediante el uso de, por ejemplo, un conjunto de enzimas consistente en (como se muestran con las etiquetas numéricas **34**, **35**, **03**, **04**, **45–55**, **42**, **43** y **44/56** en La Figura 5): gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34**, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, fosfoenolpiruvato carboxilasa **45**, aspartato aminotransferasa **46**, aspartoquinasa **47**, aspartato semialdehído deshidrogenasa **48**, homoserina deshidrogenasa **49**, homoserina quinasa **50**, treonina sintasa **51**, treonina amonio liasa **52**, acetolactato sintasa **53**, cetoácido reductoisomerasa **54**, dihidroxi ácido deshidratasa **55**, 2-cetoácido decarboxilasa **42**, y alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD **43** (alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH **44**; más preferentemente, 2-metilbutiraldehído reductasa **56**).

Estas vías (Fig. 5) son similares a aquellas de la Fig. 4, excepto que la acetolactato sintasa **53**, cetoácido reductoisomerasa **54**, dihidroxi ácido deshidratasa **55**, y 2-metilbutiraldehído reductasa **56** son usadas para producir 2-Metil-1-Butanol.

La SEQ ID NO: 82 presenta el ejemplo 82 de un constructo de ADN de diseño para la Acetolactato sintasa controlada por el promotor nirA (**53**) (2107 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la acetolactato sintasa (252–1967) seleccionada/modificada de la secuencia de la acetolactato sintasa de *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168* (CAB07802), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1968–2087), y un partidor PCR RE (2088–2107) en el extremo 3’.

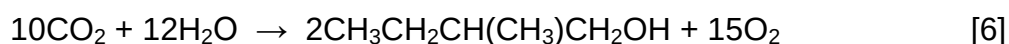
La SEQ ID NO: 83 presenta el ejemplo 83 de un constructo de ADN de diseño para la Cetoácido reductoisomerasa controlada por el promotor nirA (**54**) (1405 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la cetoácido reductoisomerasa (252–1265) seleccionada/modificada de la secuencia de la cetoácido reductoisomerasa de *Syntrophothermus lipocalidus* DSM 12680 (ADI02902), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1266–1385), y un partidor PCR RE (1386–1405) en el extremo 3’.

La SEQ ID NO: 84 presenta el ejemplo 84 de un constructo de ADN de diseño para la Dihidroxi ácido deshidratasa controlada por el promotor nirA (**55**) (2056 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1916) seleccionada de la secuencia de la dihidroxi ácido deshidratasa de *Thermotoga* (YP_001243973), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1917–2036), y un partidor PCR RE (2037–2056).

La SEQ ID NO: 85 presenta el ejemplo 85 de un constructo de ADN de diseño para la 2-metilbutiraldehído reductasa controlada por el promotor nirA (**56**) (1360 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1220) seleccionada/modificada de la secuencia de la 2-metilbutiraldehído

reductasa de *Schizosaccharomyces japonicus* (XP_002173231), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1221–1340), y un partidor PCR RE (1341–1360) en el extremo 3'.

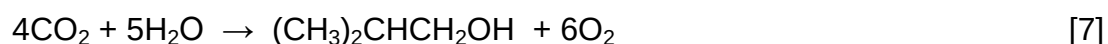
Nótese, las SEQ ID NOS: 58–66, 82–84, 69 y 85 representan otro conjunto de genes de muestra de diseño que pueden expresar una vía de producción fotosintética de 2-metil-butanol dependiente de NADPH y canalizada con el ciclo de Calvin y a partir de 3-fosfoglicerato, las que están etiquetadas numéricamente como **34, 35, 03–05, 36–39, 53–55, 42 y 56** ;mientras que las SEQ ID NOS: 58–61, 74–84, 69 y 85 representan otro conjunto de genes de muestra de diseño que pueden expresar una vía de producción fotosintética de 2-metil-butanol dependiente de NADPH y canalizada con el ciclo de Calvin y a partir de 3-fosfoglicerato de números **34, 35, 03, 04, 45–55, 42 y 56** en la Figura5. Estos genes pueden ser usados en combinación con genes de otras vías para expresar algunas otras tales como la vía de producción de 2-metil-butanol canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de Fructosa-6-fosfato, numéricamente etiquetadas como **13–26, 36–39, 53–55, 42 y 56** (y/o, como **13–25, 45–55, 42 y 56**) también en la Figura5. El resultado neto de las vías fotosintéticas mejoradas dependientes de NADPH de diseño que trabajan con el ciclo de Calvin son la producción de 2-metil-1-butanol $[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}]$ a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) usando el ATP y NADPH generado fotosintéticamente de acuerdo a la siguiente reacción de proceso:



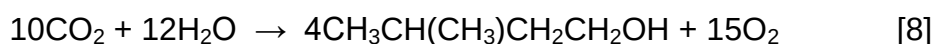
Vías de Diseño Productoras de Isobutanol y 3-Metil-1-Butanol canalizadas con el Ciclo de Calvin

De acuerdo a una de varias representaciones una vía canalizada con el Ciclo de Calvin es creada de manera tal que toma el producto intermediario del ciclo de Calvin, 3-fosfoglicerato, y lo convierte a 2-metil-1-butanol mediante el uso de, por ejemplo, un conjunto de enzimas consistente en (como se muestran con las etiquetas numéricas **34, 35, 03–05, 53–55, 42, 43 (o 44)** en La Figura6): gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34**, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvato quinasa **05**, acetolactato sintasa **53**, cetoácido reductoisomerasa **54**, dihidroxi ácido deshidratasa **55**, 2-cetoácido decarboxilasa **42**, y Alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD **43 (o**

Alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH **44**). El resultado neto de esta vía que trabaja con el ciclo de Calvin es la producción de isobutanol ((CH₃)₂CHCH₂OH) a partir de dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O) usando el ATP y NADPH generado fotosintéticamente de acuerdo a la siguiente reacción de proceso:



De acuerdo a otra representación, la vía de diseño canalizada con el ciclo de Calvin es creada de manera tal que toma el producto intermediario del ciclo de Calvin, 3-fosfoglicerato, y lo convierte a 3-metil-1-butanol mediante el uso de, por ejemplo, un conjunto de enzimas consistente en (como se muestran con las etiquetas numéricas **34, 35, 03–05, 53–55, 40, 38, 39, 42, 43** (o **44/57**) en La Figura6): gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34**, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvato quinasa **05**, acetolactato sintasa **53**, cetoácido reductoisomerasa **54**, dihidroxi ácido deshidratasa **55**, 2-isopropilmalato sintasa **40**, 3-isopropilmalato deshidratasa **38**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, 2-cetoácido decarboxilasa **42**, y Alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD **43** (o Alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH **44**; o más preferentemente, 3-metilbutanal reductasa **57**). El resultado neto de esta vía que trabaja con el ciclo de Calvin es la producción de 3-metil-1-butanol (CH₃CH(CH₃)CH₂CH₂OH) a partir de dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O) usando el ATP y NADPH generado fotosintéticamente de acuerdo a la siguiente reacción de proceso:



Estas vías de diseño (Figura6) comparten un número de enzimas con las vías de diseño de las Figuras 4 y 5, excepto que la 3-metilbutanal reductasa **57** es preferentemente usada para la producción de 3-metil-1-butanol; todas tienen una característica común de usar la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34** y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35** como mecanismo de conversión NADPH/NADH para convertir cierta cantidad del NADPH generado fotosintéticamente a NADH, el que puede ser usado por enzimas de vías que requieran NADH tal como la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADH **43**.

La SEQ ID NO: 86 presenta el ejemplo 86 de un constructo de ADN de diseño para la 3-Metilbutanal Reductasa controlada por el promotor nirA (**57**) (1420 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21–251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1280) seleccionada/modificada de la secuencia de la 3-Metilbutanal reductasa de *Saccharomyces cerevisiae* S288c (DAA10635), un terminador de 120-pb rbcS de BP1 (1281–1400), y un partidor PCR RE (1401–1420) en el extremo 3'.

Las SEQ ID NOS: 58–62, 82–84, 69, 70 (o 71) representan un conjunto de genes de muestra de diseño que expresan una vía fotosintética dependiente de NADPH de producción de Isobutanol canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato (**34, 35, 03–05, 53–55, 42, 43 o 44**); mientras que las SEQ ID NOS: 58–62, 82–84, 65–67, 69 y 86 representan un conjunto de genes de muestra de diseño que expresan una vía fotosintética dependiente de NADPH de producción de 3-metil-1-butanol canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato (**34, 35, 03–05, 53–55, 40, 38, 39, 42, y 57** en La Figura 6).

Estos genes de diseño pueden ser usados con otros genes de diseño para expresar ciertas otras vías tal como la vía de producción de 3-metil-1-butanol canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de Fructosa-6-fosfato como se muestra en **13–26, 53–54, 39–40, 42 y 57 (o 43/44)** también en la Figura 6. El resultado neto de las vías fotosintéticas dependientes de NADPH mejoradas que operan con el ciclo de Calvin son también la producción de isobutanol ((CH₃)₂CHCH₂OH) y/o 3-metil-1-butanol (CH₃CH(CH₃)CH₂CH₂OH) a partir de dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O) usando ATP y NADPH generado fotosintéticamente.

Vías de Diseño Productoras de 1-Hexanol y 1-Octanol canalizadas con el Ciclo de Calvin

De acuerdo a una de varias representaciones una vía canalizada con el Ciclo de Calvin es creada de manera tal que toma el producto intermediario del ciclo de Calvin, 3-fosfoglicerato, y lo convierte a 1-hexanol mediante el uso de, por ejemplo, un conjunto de enzimas consistente en (como se muestran con las etiquetas numéricas **34, 35, 03–10, 07'–12'** en la Figura 7): gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34**, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35**,

fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvato quinasa **05**, piruvato-ferredoxina oxidoreductasa **06**, tiolasa **07**, 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa **08**, crotonasa **09**, butiril-CoA deshidrogenasa **10**, 3-cetotiolasade diseño **07'**, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasade diseño **08'**, enoil-CoA deshidratasade diseño **09'**, 2-enoil-CoA reductasade diseño **10'**, acil-CoA reductasade diseño **11'**, y hexanol deshidrogenasa **12'**. El resultado neto de esta vía que trabaja con el ciclo de Calvin es la producción de 1-hexanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) usando el ATP y NADPH generado fotosintéticamente de acuerdo a la siguiente reacción de proceso:



De acuerdo a otra representación, la vía de diseño canalizada con el ciclo de Calvin es creada de manera tal que toma el producto intermediario del ciclo de Calvin, 3-fosfoglicerato, y lo convierte a 1-octanol mediante el uso de, por ejemplo, un conjunto de enzimas consistente en (como se muestran con las etiquetas numéricas **34**, **35**, **03–10**, **07'–10'**, y **07''–12''** en La Figura 7): gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34**, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvato quinasa **05**, piruvato-ferredoxina oxidoreductasa **06**, tiolase **07**, 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa **08**, crotonasa **09**, butiril-CoA deshidrogenasa **10**, 3-cetotiolasade diseño **07'**, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de diseño **08'**, enoil-CoA deshidratasade diseño **09'**, 2-enoil-CoA reductasade diseño **10'**, 3-cetotiolase de diseño **07''**, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de diseño **08''**, enoil-CoA deshidratasa de diseño **09''**, 2-enoil-CoA reductasade diseño **10''**, acil-CoA reductasade diseño **11''**, y octanol deshidrogenasa **12''**.

Estas vías significan un mejoramiento significativo en el diseño de vías con parte de la vía de producción de 1-butanol revelada (**03–10**). Una característica clave es la utilización de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34** y una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35** como un mecanismo de conversión NADPH/NADH para favorecer una vía de diseño de elongación de la cadena hidrocarbonada dependiente de NADH (**07'–10'**) para la producción de 1-hexanol (**07'–12'** como se muestra en La Figura 7).

Las SEQ ID NOS: 87–92 representan un conjunto de genes de diseño que pueden expresar la vía de diseño de elongación de la cadena hidrocarbonada para la producción de 1-hexanol (**07'–12'** como se muestra en la Figura7). Brevemente, SEQ ID NO: 87 presenta el ejemplo 87 de un constructo de ADN de diseño para la 3-Cetotiolasa controlada por el promotor nirA (**07'**) (1540 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1400) seleccionada/modificada de la secuencia de la 3-Cetotiolasa de *Geobacillus kaustophilus* (YP_147173), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1401–1520), y un partidor PCR RE (1521–1540) .

La SEQ ID NO: 88 presenta el ejemplo 88 de un constructo de ADN de diseño para la 3-Hidroxiacil-CoA Deshidrogenasa controlada por el promotor nirA (**08'**) (1231 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1091) seleccionada/modificada de la secuencia de la 3-Hidroxiacil-CoA Deshidrogenasa de *Syntrophothermus lipocalidus* (YP_003702743), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1092–1211), y un partidor PCR RE (1212–1231) .

La SEQ ID NO: 89 presenta el ejemplo 89 de un constructo de ADN de diseño para la Enoil-CoA Deshidratasa controlada por el promotor nirA (**09'**) (1162 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1022) seleccionada/modificada de la secuencia de la Enoil-CoA Deshidratasa de *Bordetella petrii* (CAP41574), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1023–1442), y un partidor PCR RE (1443–1162) en el extremo 3'.

La SEQ ID NO: 90 de un constructo de ADN de diseño para la 2-Enoil-CoA Reductasa controlada por el promotor nirA (**10'**) (1561 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1421) seleccionada/modificada de la secuencia de la 2-Enoil-CoA Reductasa de *Xanthomonas campestris* (CAP53709), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1422–1541), y un partidor PCR RE (1542–1561) .

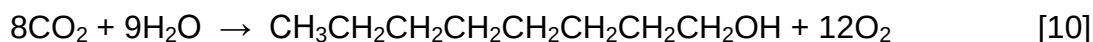
La SEQ ID NO: 91 presenta el ejemplo 91 de un constructo de ADN de diseño para la Acil-CoA Reductasa controlada por el promotor nirA (**11'**) (1747 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1607) seleccionada/modificada de la secuencia de la Acil-CoA Reductasa de *Clostridium cellulovorans* (YP_003845606), un terminador de 120-pb rbcSde BP1 (1608–1727), y un partidor PCR RE (1728–1747).

La SEQ ID NO: 92 presenta el ejemplo 92 of de un constructo de ADN de diseño para la Hexanol Deshidrogenasa controlada por el promotor nirA (**12'**) (1450 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1310) seleccionada/modificada de la secuencia de la Hexanol Deshidrogenasa de *Mycobacterium chubuense* (ACZ56328), un terminador de 120-pb rbcSde BP1 (1311–1430), y un partidor PCR RE (1431–1450).

La SEQ ID NO: 93 presenta el ejemplo 93 de un constructo de ADN de diseño para la Octanol Deshidrogenasa controlada por el promotor nirA (**12''**) (1074 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–934) seleccionada/modificada de la secuencia de la Octanol Deshidrogenasa de *Drosophila subobscura* (ABO65263), un terminador de 120-pb rbcSde BP1 (935–1054), y un partidor PCR RE (1055–1074) en el extremo 3'.

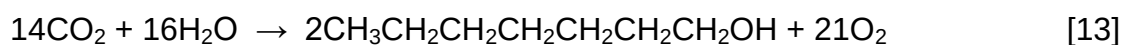
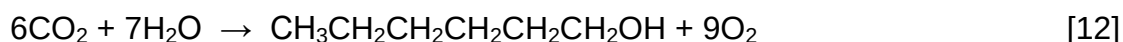
Nótese, las enzimas de diseño de las SEQ ID NOS: 87–91 tiene una amplia especificidad de sustrato. Consecuentemente, pueden también ser usadas como 3-cetotiolasa de diseño **07''**, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de diseño **08''**, enoil-CoA deshidratasa de diseño **09''**, 2-enoil-CoA reductasa de diseño **10''**, y acil-CoA reductasa de diseño **11''**. Por lo tanto, las SEQ ID NOS: 87–91 y 93 representan un conjunto de genes de diseño que pueden expresar otra vía de elongación de cadenas hidrocarbonadas de diseño para la producción de 1-octanol (**07'–10'** y **07''–12''** como se muestra en La Figura 7). La SEQ ID NO: 93 (que codifica para octanol deshidrogenasa **12''**) es otro gen de diseño clave que permite la producción de 1-octanol en esta vía. El resultado neto de esta vía que trabaja con el ciclo de Calvin es la producción de 1-octanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) a partir de dióxido de carbono (CO_2)

yagua (H₂O) usando el ATP y NADPH generado fotosintéticamente de acuerdo a la siguiente reacción de proceso:



Vías de Diseño Productoras de 1-Pentanol, 1-Hexanol y 1-Heptanol canalizadas con el Ciclo de Calvin

De acuerdo a una de varias representaciones una vía canalizada con el Ciclo de Calvin es creada de manera tal que toma el producto intermediario del ciclo de Calvin, 3-fosfoglicerato, y lo convierte a 1-pentanol, 1-hexanol, y/o 1-heptanol mediante el uso de, por ejemplo, un conjunto de enzimas consistente en (como se muestran con las etiquetas numéricas **34**, **35**, **03–05**, **36–41**, **39**, **39'–43'**, **39'–43',12'**, y **39''–43''** en La Figura 8): gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34**, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvato quinasa **05**, citramalato sintasa **36**, 2-metilmalato deshidratasa **37**, 3-isopropilmalato deshidratasa **38**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, 2-Isopropilmalato Sintasa **40**, isopropilmalato isomerasa **41**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, isopropilmalato sintasa de diseño **40'**, isopropilmalato isomerasa de diseño **41'**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39'**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42'**, deshidrogenasa de alcohol de cadena corta **43'**, hexanol deshidrogenasa **12'**, isopropilmalato sintasa de diseño **40''**, isopropilmalato isomerasa de diseño **41''**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39''**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42''**, y deshidrogenasa de alcohol de cadena corta de diseño **43''**. Esta vía de diseño opera con el ciclo de Calvin usando el ATP y NADPH generado fotosintéticamente para la producción fotobiológica de 1-pentanol (CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂OH), 1-hexanol (CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OH), y/o 1-heptanol (CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OH) a partir de dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O) de acuerdo a las siguientes reacciones de proceso:



De acuerdo a otra representación, la vía de diseño canalizada con el ciclo de Calvin es creada de manera tal que toma el producto intermediario del ciclo de Calvin, 3-fosfoglicerato, y lo convierte a 1-pentanol, 1-hexanol, y/o 1-heptanol mediante el uso de, por ejemplo, un conjunto de enzimas consistente en (como se muestran con las etiquetas numéricas **34, 35, 03, 04, 45–52, 40, 41, 39, 39'–43', 39'–43', 12', y 39''–43''** en La Figura8): gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34**, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, fosfoenolpiruvato carboxilasa **45**, aspartato aminotransferasa **46**, aspartoquinasa **47**, aspartato-semialdehídodeshidrogenasa **48**, homoserinadeshidrogenasa **49**, homoserinaquinasa **50**, treoninasintasa **51**, treoninaamonio-liasa **52**, 2-Isopropilmalato Sintasa **40**, isopropilmalatoisomerasa **41**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, isopropilmalato sintasa de diseño **40'**, isopropilmalatoisomerasade diseño **41'**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39'**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42'**, deshidrogenasa dealcohol de cadena corta de diseño **43'**, hexanol deshidrogenasa **12'**, Isopropilmalato Sintasade diseño **40''**, isopropilmalatoisomerasade diseño **41''**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39''**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42''**, y deshidrogenasa dealcohol de cadena corta de diseño **43''**.

Estas vías (Figura 8) comparten una característica común de usar una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34** y una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35** como un mecanismo para la conversión NADPH/NADH para lograr la producción de 1-pentanol, 1-hexanol, y/o 1-heptanol a través de una vía de diseño canalizada con el ciclo de Calvin en combinación con una vía de elongación de cadenas de hidrocarburos de diseño (**40', 41', 39'**). Esta representación toma la ventaja de la amplia especificidad de sustrato (promiscuidad) de la 2-Isopropilmalato Sintasa **40**, isopropilmalato isomerasa **41**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, 2-cetoácido decarboxilasa **42**, deshidrogenasa dealcohol de cadena corta **43** de manera tal que estas pueden ser usadas también como: Isopropilmalato Sintasa de diseño **40'**, isopropilmalato isomerasade diseño **41'**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39'**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42'**, y deshidrogenasa dealcohol de cadena corta **43'**; Isopropilmalato Sintasa **40''**, isopropilmalatoisomerasa de diseño **41''**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño

39", 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42"**, y deshidrogenasa de alcohol de cadena corta de diseño **43"**.

En este caso, la selección adecuada de una deshidrogenasa dealcohol de cadena corta con algún grado de promiscuidad es también esencial. La SEQ ID NO: 94 presenta el ejemplo94 de un constructo de ADN de diseño para la Deshidrogenasa dealcohol de cadena corta controlada por el promotor nirA (1096 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–956) seleccionada/modificada de la secuencia de la deshidrogenasa de alcohol de cadena corta de *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 (AAC25556), un terminador de 120-pb rbcS de BP1 (957–1076), y un partidor PCR RE (1077–1096) en el extremo 3'.

Por lo tanto, las SEQ ID NOS: 58–69 y 94 representan un conjunto de genes de diseño que pueden expresar una vía fotosintética dependiente de NADPH mejorada canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato para la producción de 1-Pentanol, 1-Hexanol y/o 1-Heptanol como se muestra en las etiquetas numéricas **34, 35, 03–05, 36–41, 39, 39'–43', 39'–43', 39''–43''** en la Figura 8. Similarmente, las SEQ ID NOS: 58–61, 74–81, 66–69, y 94 representan otro conjunto de genes de diseño que pueden expresar una vía fotosintética dependiente de NADPH mejorada canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato para la producción de 1-Pentanol, 1-Hexanol y/o 1-Heptanol como se muestra en las etiquetas numéricas **34, 35, 03, 04, 45–52, 40, 41, 39, 39'–43', 39'–43', 39''–43''** en la Figura 8. Nótese, ambas vías producen mezclas de alcoholes con distintas longitudes de cadena en vez de alcoholes únicos ya que todos los 2-cetoácidos (tales como 2-cetohexanoato, 2-cetoheptanoato, y 2-cetooctanoato) pueden ser convertidos a alcohol debido a la promiscuidad de la 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42'** y de la deshidrogenasa de alcohol de cadena corta de diseño **43'**.

Para mejorar la especificidad de este producto, es una práctica preferida el uso de enzimas de diseño de sustrato específico. Por ejemplo, el uso de la 1-hexanol deshidrogenasa de diseño **12'** (SEQ ID NO: 92) de sustrato específico en lugar de la promiscua deshidrogenasa de alcohol de cadena corta (**43'**) puede mejorar la especificidad del producto más hacia 1-hexanol. Consecuentemente, las SEQ ID NOS: 58–69 y 92 representan un conjunto de genes de diseño que expresan una vía

fotosintética dependiente de NADPH de diseño, canalizada del ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato, y mejorada para la producción de 1-hexanol como se muestra con las etiquetas numéricas **34, 35, 03–05, 36–41, 39, 39'–40', 39'–42' y 12'** en La Figura8.

Vías de Diseño Productoras de 3-Metil-1-Pentanol, 4-Metil-1-Hexanol, y 5-Metil-1-Heptanol canalizadas con el Ciclo de Calvin

De acuerdo a una de varias representaciones una vía canalizada con el Ciclo de Calvin es creada de manera tal que toma el producto intermediario del ciclo de Calvin, 3-fosfoglicerato, y lo convierte a 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, y/o 5-metil-1-heptanol mediante el uso de, por ejemplo, un conjunto de enzimas consistente en (como se muestran con las etiquetas numéricas

34, 35, 03–05, 36–39, 53–55, 39'–43', 39'–43', y 39''–43'' in Figura9): gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34**, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvato quinasa **05**, citramalato sintasa **36**, 2-metilmalato deshidratasa **37**, 3-isopropilmalato deshidratasa **38**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, acetolactato sintasa **53**, cetoácido reductoisomerasa **54**, dihidroxi ácido deshidratasa **55**, Isopropilmalato Sintasa de diseño **40'**, isopropilmalatoisomerasa de diseño **41'**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39'**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42'**, deshidrogenasa de alcohol de cadena cortada de diseño **43'**, Isopropilmalato Sintasa de diseño **40''**, isopropilmalatoisomerasa de diseño **41''**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39''**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42''**, y deshidrogenasa de alcohol de cadena cortada de diseño **43''**.

De acuerdo a otra representación, la vía de diseño canalizada con el ciclo de Calvin es creada de manera tal que toma el producto intermediario del ciclo de Calvin, 3-fosfoglicerato, y lo convierte a 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, y/o 5-metil-1-heptanol mediante el uso de, por ejemplo, un conjunto de enzimas consistente en (como se muestran con las etiquetas numéricas

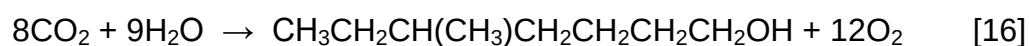
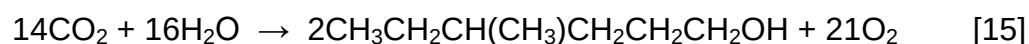
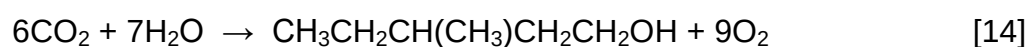
34, 35, 03, 04, 45-55, 39'–43', 39'–43', y 39''–43'' en La Figura9): gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34**, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**,

fosfoenolpiruvatocarboxilasa **45**, aspartatoAminotransferasa **46**, aspartoquinasa **47**, aspartato-semialdehído deshidrogenasa **48**, homoserinadeshidrogenasa **49**, homoserinaquinasa **50**, treoninasintasa **51**, treonina amonio-liasa**52**, acetolactato sintasa **53**, cetoácido reductoisomerasa **54**, dihidroxi ácido deshidratasa **55**, Isopropilmalato Sintasa de diseño **40'**, isopropilmalatoisomerasa de diseño **41'**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39'**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42'**, deshidrogenasa de alcohol de cadena corta **43'**, Isopropilmalato Sintasa de diseño **40''**, isopropilmalatoisomerasa de diseño **41''**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39''**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42''**, y deshidrogenasa de alcohol de cadena corta de diseño **43''**.

Estas vías (Figura 9) son similares a las de la Figura 8, excepto que usan acetolactato sintasa**53**, cetoácido reductoisomerasa **54**, dihidroxi ácido deshidratasa **55** como parte de las vías para la producción de 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, y/o 5-metil-1-heptanol. Si comparten una característica común de usar una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34** y una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35** como un mecanismo para la conversión NADPH/NADH para lograr la producción de 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, y/o 5-metil-1-heptanol a través de una vía de diseño canalizada con el ciclo de Calvin en combinación con una vía de elongación de cadenas de hidrocarburos de diseño (**40'**, **41'**, **39'**). Esta representación toma la ventaja de la amplia especificidad de sustrato (promiscuidad) de la 2-Isopropilmalato Sintasa **40**, isopropilmalatoisomerasa **41**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, 2-cetoácido decarboxilasa **42**, y deshidrogenasa de alcohol de cadena corta **43** de manera tal que estas pueden ser usadas también como: Isopropilmalato Sintasa de diseño **40'**, isopropilmalatoisomerasa de diseño **41'**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39'**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42'**, y deshidrogenasa de alcohol de cadena corta **43'**; Isopropilmalato Sintasa de diseño **40''**, isopropilmalatoisomerasa de diseño **41''**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39''**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42''**, y deshidrogenasa de alcohol de cadena corta de diseño **43''**.

Por lo tanto, las SEQ ID NOS: 58–69, 82–84, y 94 representan un conjunto de genes de diseño que pueden expresar una vía fotosintética dependiente de NADPH mejorada canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato para la producción de 3-

metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, y 5-metil-1-heptanol como se muestra en las etiquetas numéricas **34, 35, 03–05, 36–39, 53–55, 39'–43', 39'–43', y 39''–43''** en La Figura 9. Similarmente, las SEQ ID NOS: 58–61, 74–81, 82–84, 66–69, y 94 representan otro conjunto de genes de diseño que pueden expresar una vía fotosintética dependiente de NADPH mejorada canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato para la producción de 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, y/o 5-metil-1-heptanol como se muestra en las etiquetas numéricas **34, 35, 03, 04, 45–55, 39'–43', 39'–43', 39''–43''** en La Figura 9. El resultado neto de esta vía fotosintética de diseño dependiente de NADPH que trabaja con el ciclo de Calvin es la producción de 3-metil-1-pentanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 4-metil-1-hexanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), y 5-metil-1-heptanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) usando el ATP y NADPH generado fotosintéticamente de acuerdo a la siguiente reacción de proceso:



Vías de Diseño Productoras de 4-Metil-1-Pentanol, 5-Metil-1-Hexanol, y 6-Metil-1-Heptanol canalizadas con el Ciclo de Calvin

De acuerdo a una de varias representaciones una vía canalizada con el Ciclo de Calvin es creada de manera tal que toma el producto intermediario del ciclo de Calvin, 3-fosfoglicerato, y lo convierte a 4-metil-1-pentanol, 5-metil-1-hexanol, y 6-metil-1-heptanol mediante el uso de, por ejemplo, un conjunto de enzimas consistente en (como se muestran con las etiquetas numéricas

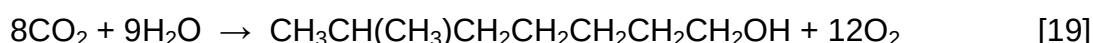
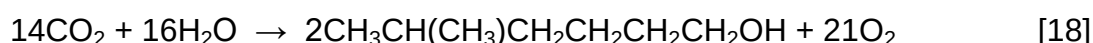
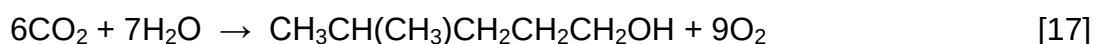
34, 35, 03–05, 53–55, 40, 38, 39, 39'–43', 39'–43', y 39''–43'' en La Figura 10): gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34**, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvato quinasa **05**, acetolactato sintasa **53**, cetoácido reductoisomerasa **54**, dihidroxi ácido deshidratasa **55**, Isopropilmalato Sintasa **40**, 3-Isopropilmalato deshidratasa **38**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, Isopropilmalato

Sintasa de diseño **40'**, isopropilmalatoisomerasa de diseño **41'**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39'**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42'**, deshidrogenasa de alcohol de cadena corta **43'**, Isopropilmalato Sintasa de diseño **40''**, isopropilmalatoisomerasa de diseño **41''**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39''**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42''**, y deshidrogenasa de alcohol de cadena corta de diseño **43''**.

Esta vía (Figura 10) es similar a las de La Figura 8, excepto que no usa citramalato sintasa **36** y 2-metilmalato deshidratasa **37**, pero usa acetolactato sintasa **53**, cetoácido reductoisomerasa **54**, dihidroxi ácido deshidratasa **55** como parte de las vías para la producción de 4-metil-1-pentanol, 5-metil-1-hexanol, y/o 6-metil-1-heptanol. Si comparten una característica común de usar una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH **34** y una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD **35** como un mecanismo para la conversión NADPH/NADH para lograr la producción de 3-metil-1-butanol, 4-metil-1-butanol, y 5-metil-1-butanol a través de una vía de diseño canalizada con el ciclo de Calvin en combinación con una vía de elongación de cadenas de hidrocarburos de diseño (**40'**, **41'**, **39'**). Esta representación toma la ventaja de la amplia especificidad de sustrato (promiscuidad) de la 2-Isopropilmalato Sintasa **40**, isopropilmalatoisomerasa **41**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, 2-cetoácido decarboxilasa **42**, y deshidrogenasa de alcohol de cadena corta **43** de manera tal que estas pueden ser usadas también como: Isopropilmalato Sintasa de diseño **40'**, isopropilmalatoisomerasa de diseño **41'**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39'**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42'**, y deshidrogenasa de alcohol de cadena corta **43'**, Isopropilmalato Sintasa de diseño **40''**, isopropilmalatoisomerasa de diseño **41''**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39''**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42''**, deshidrogenasa de alcohol de cadena corta de diseño **43''**.

Por lo tanto, las SEQ ID NOS: 58–62, 82–84, 65–69 y 94 representan un conjunto de genes de diseño que pueden expresar una vía fotosintética dependiente de NADPH mejorada canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato para la producción de 4-metil-1-pentanol, 5-metil-1-hexanol, y/o 6-metil-1-heptanol como se muestra en las etiquetas numéricas

34, 35, 03–05, 53–55, 40, 38, 39, 39'–43', 39'–43', y 39''–43'' en la Figura 10. El resultado neto de esta vía fotosintética de diseño dependiente de NADPH que trabaja con el ciclo de Calvin es la producción de 4-metil-1-pentanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 5-metil-1-hexanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), y 6-metil-1-heptanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) usando el ATP y NADPH generado fotosintéticamente de acuerdo a las siguientes reacciones:



Oxifotobacterias de diseño con vías de Producción de Butanol y Alcoholes Superiores Relacionados canalizadas con el Ciclo de Calvin

De acuerdo a una de varias representaciones, el uso de constructos de ADN de diseño para la transformación genética de ciertas oxifotobacterias huéspedes puede crear varias oxifotobacterias transgénicas de diseño con vías canalizadas del ciclo de Calvin para la producción fotobiológica de butanol y alcoholes superiores relacionados a partir de dióxido de carbono y agua. Para asegurar la bioseguridad del uso de la tecnología productora de biocombustibles basada en organismos fotosintéticos transgénicos de diseño, es una práctica preferida el incorporar características de resguardo de la bioseguridad en este organismo fotosintético transgénico de diseño. Por lo tanto, de acuerdo a la presente invención, varios organismos fotosintéticos de diseño incluyendo oxifotobacterias transgénicas de diseño son creados, con resguardo de la bioseguridad, para la producción fotobiológica de biocombustibles basados en organismos fotosintéticos transgénicos con división celular controlable. Los organismos fotosintéticos transgénicos con división celular controlable poseen dos funciones clave: un mecanismo (o más) de bioseguridad de diseño y una vía (o más) de producción de biocombustible de diseño. La característica de resguardo de la bioseguridad es conferida por un número de mecanismos que incluyen: a) la inserción inducible de un canal de protones de diseño en la membrana plasmática para inhabilitar permanentemente cualquier capacidad de división celular y/o apareamiento, b) la aplicación selectiva de una proteína regulatoria del ciclo de división celular o de un

ARN de interferencia (ARNi) para inhibir permanentemente el ciclo de división celular y preferentemente mantener la célula en la fase G₁o en el estado G₀, y c) el uso innovativo de un organismo fotosintético huésped con altos requerimientos de CO₂ para poder expresar las vías de producción de biocombustibles de diseño. La tecnología de control de la división celular de diseño puede ayudar a asegurar la bioseguridad en el uso de organismos de diseño para la producción de biocombustibles.

Oxifotobacterias (incluyendo cianobacterias y oxiclorobacterias) las que pueden ser seleccionadas para su uso como organismos huéspedes para crear oxifotobacteriastransgénicas de diseño para la producción fotobiológica de butanol y alcoholes superiores relacionados incluyen (pero no se limitan a): *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Nostoc* sp. PCC 7120, *Synechococcus elongatus* PCC 6301, *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942, *Synechococcus* sp. cepa PCC 7002, *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803, *Prochlorococcus marinus* MED4, *Prochlorococcus marinus* MIT 9313, *Prochlorococcus marinus* NATL1A, *Prochlorococcus* SS120, *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*), *Spirulina pacifica*, *Lyngbya majuscula*, *Anabaena* sp., *Synechocystis* sp., *Synechococcus elongates*, *Synechococcus* (MC-A), *Trichodesmium* sp., *Richelia intracellularis*, *Synechococcus* WH7803, *Synechococcus* WH8102, *Nostoc punctiforme*, *Synechococcus* sp. cepa PCC 7943, *Synechocystis* PCC 6714 mutante ficocianina-deficiente PD-1, *Cyanothece* cepa 51142, *Cyanothece* sp. CCY0110, *Oscillatoria limosa*, *Lyngbya majuscula*, *Symploca muscorum*, *Gloeobacter violaceus*, *Prochloron didemni*, *Prochlorothrix hollandica*, *Prochlorococcus marinus*, *Prochlorococcus* SS120, *Synechococcus* WH8102, *Lyngbya majuscula*, *Symploca muscorum*, *Synechococcus bigranulatus*, cryophilic *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Nostoc* sp.-1, *Calothrix parietina*, thermophilic *Synechococcus bigranulatus*, *Synechococcus lividus*, thermophilic *Mastigocladus laminosus*, *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912, *Synechococcus vulcanus*, *Synechococcus* sp. cepa MA4, *Synechococcus* sp. cepa MA19, y *Thermosynechococcus elongatus*.

De acuerdo a uno de los ejemplos, el uso de constructos de ADN de diseño tales como los de las SEQ ID NOS: 58–94 para la transformación genética de ciertas oxifotobacterias huéspedes tales como *Thermosynechococcus elongatus* BP1 puede crear una serie de oxifotobacterias transgénicas de diseño con vías canalizadas del

ciclo de Calvin para la producción de butanol y alcoholes superiores relacionados. Consecuentemente, las SEQ ID NOS: 58–61, 74–81, 66–69, y 72 (y/o 73) representan oxifotobacterias transgénicas de diseño tales como *Thermosynechococcus* transgénica de diseño que incluyen genes de diseño de una vía fotosintética dependiente de NADPH mejorada, canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato (numéricamente etiquetada como **34, 35, 03, 04, 45–52, 39–42, y 12** en La Figura 4) para la producción fotobiológica de 1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua. Las SEQ ID NOS: 58–69 y 72 (y/o 73) representa otra oxifotobacteria transgénica de diseño tal como *Thermosynechococcus* transgénica de diseño que incluye los genes de diseño genes de una vía fotosintética dependiente de NADPH mejorada, canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato (numéricamente etiquetada como **34, 35, 03–05, 36–42, y 12** en la Figura 4) para la producción fotobiológica de 1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua.

Similarmente, las SEQ ID NOS: 58–66, 82–84, 69 y 85 representan otras oxifotobacterias transgénicas de diseño tal como *Thermosynechococcus* transgénica de diseño que incluye los genes de diseño genes de una vía fotosintética dependiente de NADPH mejorada, canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato (numéricamente etiquetada como **34, 35, 03–05, 36–39, 53–55, 42 y 56** en La Figura 5) para la producción fotobiológica de 2-metil-1-butanol a partir de dióxido de carbono; mientras que las SEQ ID NOS: 58–61, 74–84, 69 y 85 representan otras *Thermosynechococcus* transgénica de diseño que incluye los genes de diseño de una vía fotosintética dependiente de NADPH mejorada, canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato (**34, 35, 03, 04, 45–55, 42 y 56** en la Figura 5) para la producción fotobiológica de 2-metil-1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua.

Las SEQ ID NOS: 58–63, 82–84, 69, 70 (o 71) representan otras oxifotobacterias transgénicas de diseño tal como *Thermosynechococcus* transgénica de diseño que incluye los genes de diseño genes de una vía fotosintética dependiente de NADPH mejorada, canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato para la producción de isobutanol (**34, 35, 03–05, 53–5, 42, 43 o 44**); mientras que las SEQ ID NOS: 58–62, 81–83, 65–67, 69 y 86 representan otras oxifotobacterias transgénicas de diseño tal como *Thermosynechococcus* transgénicas de diseño que incluye los genes de diseño genes de una vía fotosintética dependiente de NADPH mejorada, canalizada

con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato para la producción de 3-metil-1-butanol (etiquetas numéricas **34, 35, 03–05, 53–55, 40, 38, 39, 42, y 57** en La Figura 6).

Las SEQ ID NOS: 87–92 representan otras *Thermosynechococcus* transgénicas de diseño con una vía de elongación de la cadena de hidrocarburos de diseño (**07'–12'** como se muestra en la Figura 7) para la producción fotobiológica de 1-hexanol. Las SEQ ID NOS: 87–91 y 93 representan otras *Thermosynechococcus* transgénicas de diseño con una vía de elongación de la cadena de hidrocarburos de diseño (**07'–10' y 07''–12''** como se muestran en la Figura 7) para la producción fotobiológica de 1-octanol.

Las SEQ ID NOS: 58–69 y 92 representan otras *Thermosynechococcus* transgénicas de diseño que incluye los genes de diseño genes de una vía fotosintética dependiente de NADPH mejorada, canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato (**34, 35, 03–05, 36–41, 39, 39'–40', 39'–42' y 12'** en la Figura 8) para la producción fotobiológica de 1-hexanol a partir de dióxido de carbono y agua.

Las SEQ ID NOS: 58–69, 82–84, y 94 representan otras *Thermosynechococcus* transgénicas de diseño que incluye los genes de diseño genes de una vía fotosintética dependiente de NADPH mejorada, canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato (**34, 35, 03–05, 36–39, 53–55, 39'–43', 39'–43', 39''–43''** en La Figura 9) para la producción fotobiológica de 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, y 5-metil-1-heptanol a partir de dióxido de carbono y agua. Similarmente, las SEQ ID NOS: 58–61, 74–81, 82–84, 66–69, y 94 representan otras *Thermosynechococcus* transgénicas de diseño que incluye los genes de diseño genes de una vía fotosintética dependiente de NADPH mejorada, canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato (**34, 35, 03, 04, 45–55, 39'–43', 39'–43', 39''–43''** in Figura 9) para la producción fotobiológica de 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, y 5-metil-1-heptanol a partir de dióxido de carbono y agua.

Las SEQ ID NOS: 58–62, 82–84, 65–69 y 94 representan *Thermosynechococcus* transgénicas de diseño con vías fotosintéticas dependientes de NADPH mejoradas, canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato (**34, 35, 03–05, 53–55, 40, 38, 39, 39'–43', 39'–43', y 39''–43''** en Figura 10) para la producción

fotobiológica de 4-metil-1-pentanol, 5-metil-1-hexanol, y/o 6-metil-1-heptanol a partir de dióxido de carbono y agua.

El uso de otras oxifotobacterias huéspedes tales como *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942, *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803, *Prochlorococcus marinus*, *Cyanothece* sp. ATCC 51142, para la transformación genética con constructos apropiados de ADN (genes) de diseño pueden crear otras oxifotobacterias de diseño para la producción fotobiológica de butanol y alcoholes superiores también. Por ejemplo, el uso de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 como organismo huésped de la transformación genética con las SEQ ID NOS: 95–98 (y/o99) puede crear *Synechococcus* transgénicas de diseño para la producción fotobiológica de 1-butanol. Brevemente, SEQ ID NO: 95 presenta el ejemplo 95 de un constructo de ADN detallado (1438 pares de bases (pb)) de un gen para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH (**34**) de diseño que incluye un partidor PCR FD (secuenciapb 1–20), un promotor de 88-pb *nirA* (21–108) seleccionado de la secuencia del promotor de la nitrito reductasa de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (cianobacteria de agua dulce), una secuencia que codifica para la enzima (109–1110) seleccionada y modificada de la secuencia de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH de *Staphylococcus* (GenBank número de acceso: YP_003471459), un terminador de 308-pb *rbcS* de *Synechococcus* (1111–1418), y un partidor PCR RE (1419–1438).

La SEQ ID NO: 96 presenta el ejemplo 96 de un constructo de ADN detallado (1447 pb) de un gen para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD(**35**) de diseño que incluye un partidor PCR FD (secuencia pb 1–20), un promotor de 88-pb *nirA* (21–108) seleccionado de la secuencia del promotor de la nitrito reductasa de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (cianobacteria de agua dulce), una secuencia que codifica para la enzima (109–1119) seleccionada de la secuencia de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD de *Staphylococcus aureus* (GenBank número de acceso: ADC36961), un terminador de 308-pb *rbcS* de *Synechococcus* (1120–1427), y un partidor PCR RE (1428–1447) .

La SEQ ID NO: 97 presenta el ejemplo 97 de un constructo de ADN detallado (2080 pb) de un gen para la 2-cetoácido decarboxilasa (**42**) de diseño que incluye un partidor PCR FD (secuencia pb 1–20), un promotor de 88-pb *nirA* (21–108) seleccionado de la secuencia del promotor de la nitrito reductasa de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942

(cianobacteria de agua dulce), una secuencia que codifica para la enzima (109–1752) seleccionada de la secuencia de la alfa-cetoácido decarboxilasa de cadena ramificada de *Lactococcus lactis* (GenBank número de acceso: AAS49166), un terminador de 308-pb *rbcS* de *Synechococcus* (1753–2060), y un partidor PCR RE (2061–2080).

La SEQ ID NO: 98 de un constructo de ADN detallado (1603 pb) de un gen para la butanol deshidrogenasa dependiente de NADH (**12a**) de diseño que incluye un partidor PCR FD (secuencia pb 1–20), un promotor de 88-pb *nirA* (21–108) seleccionado de la secuencia del promotor de la nitrito reductasa de *Synechococcus*, una secuencia que codifica para la enzima (109–1275) seleccionada de la secuencia de la butanol deshidrogenasa dependiente de NADH *Clostridium* (GenBank número de acceso: ADO12118), un terminador de 308-pb *rbcS* de *Synechococcus* (1276–1583), y un partidor PCR RE (1584–1603).

La SEQ ID NO: 99 presenta el ejemplo 99 de un constructo de ADN detallado (1654 pb) de un gen para la butanol deshidrogenasa dependiente de NADPH (**12b**) de diseño que incluye un partidor PCR FD (secuencia pb 1–20), un promotor de 88-pb *nirA* (21–108) seleccionado de la secuencia del promotor de la nitrito reductasa de *Synechococcus*, una secuencia que codifica para la enzima (109–1326) seleccionada de la secuencia de la butanol deshidrogenasa dependiente de NADPH de *Butyrivibrio* (GenBank: EFF67629), un terminador de 308-pb *rbcS* de *Synechococcus* (1327–1634), y un partidor PCR RE (1635–1654).

Nótese, en las *Synechococcus* transgénicas de diseño representadas por las SEQ ID NOS: 95–98 (y/o99), las enzimas nativas de *Synechococcus* **03–05**, **36–41** y **45–52** son usadas en combinación con las enzimas controladas por el promotor *nirA* **34**, **35**, **42** y **12** [codificadas por las SEQ ID NOS: 95–98 (y/o99)] para conferir las vías fotosintéticas dependientes de NADPH mejoradas, canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato para la producción fotobiológica de 1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua (Figura 4).

Similarmente, el uso de *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803 como organismo huésped en la transformación genética con las SEQ ID NOS: 100–102 (y/o103) crea un *Synechocystis* transgénico de diseño para la producción de 1-butanol. Brevemente, SEQ ID NO: 100 presenta el ejemplo 100 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *nirA* para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

dependiente de NAD (**35**) (1440 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 89-pb de la nitrito reductasa nirA de *Synechocystis sp.* cepa PCC 6803 (21–109), una secuencia que codifica para la enzima (110–1011) seleccionada de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD de *Streptococcus pyogenes* (GenBank: YP_002285269), un terminador de 409-pb rbcS *Synechocystis sp.* PCC 6803 (1012–1420), y un partidor PCR RE (1421–1440).

SEQ ID NO: 101 presenta el ejemplo 101 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor nirA para la 2-cetoácido decarboxilasa (**42**) (2182 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 89-pb de la nitrito reductasa nirA de *Synechocystis sp.* cepa PCC 6803 (21–109), una secuencia que codifica para la enzima (110–1753) seleccionada de la alfa-cetoácido decarboxilasa de cadena ramificada de *Lactococcus lactis* (GenBank: AAS49166), un terminador de 409-pb rbcS *Synechocystis sp.* PCC 6803 (1754–2162), y un partidor PCR RE (2163–2182).

SEQ ID NO: 102 presenta el ejemplo 102 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor nirA para la butanol deshidrogenasa dependiente de NADH (**12a**) (1705 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 89-pb de la nitrito reductasa nirA de *Synechocystis sp.* cepa PCC 6803 (21–109), una secuencia que codifica para la enzima (110–1276) seleccionada de la butanol deshidrogenasa dependiente de NADH de *Clostridium carboxidivorans* P7 (GenBank: ADO12118), un terminador de 409-pb rbcS *Synechocystis sp.* PCC 6803 (1277–1685), y un partidor PCR RE (1686–1705).

SEQ ID NO: 103 presenta el ejemplo 103 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor nirA para la butanol deshidrogenasa dependiente de NADPH (**12b**) (1756 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 89-pb de la nitrito reductasa nirA de *Synechocystis sp.* cepa PCC 6803 (21–109), una secuencia que codifica para la enzima (110–1327) seleccionada de la butanol deshidrogenasa dependiente de NADPH de *Butyrivibrio crossotus* (GenBank: EFF67629), un terminador de 409-pb rbcS *Synechocystis sp.* PCC 6803 (1328–1736), y un partidor PCR RE (1737–1756).

Nótese, en las *Synechocystis* transgénicas de diseño que contienen los genes de diseño de las SEQ ID NOS: 100–102 (y/o 103), las enzimas nativas de *Synechocystis* de **34**, **03–05**, **36–41** y **45–52** son usadas en combinación con las enzimas controladas

por el promotor *nirA* **35**, **42** y **12** [codificadas por las SEQ ID NOS: 100–102 (y/o103)] para conferir las vías fotosintéticas dependientes de NADPH mejoradas, canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato para la producción fotobiológica de 1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua (Figura4).

El uso de *Nostoc sp.* cepa PCC 7120 para la transformación genética con las SEQ ID NOS: 104–109 pueden crear *Nostoc* transgénicas de diseño para la producción fotobiológica de 2-metil-1-butanol (Figura5). Brevemente, la SEQ ID NO: 104 presenta el ejemplo 104 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD (**35**) (1655 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc sp.* cepa PCC 7120 (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1203) seleccionada/modificada de la secuencia de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD de *Streptococcus pyogenes* NZ131 (GenBank: YP_002285269), un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc sp.* cepa PCC 7120(1204–1635), y un partidor PCR RE (1636–1655) .

SEQ ID NO: 105 presenta el ejemplo105 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Acetolactato sintasa (**53**) (2303 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc sp.* cepa PCC 7120 (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1851) seleccionada/modificada de la secuencia de la acetolactato sintasa de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (GenBank: NP_682614), un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc sp.* cepa PCC 7120(1852–2283), y un partidor PCR RE (2284–2303).

SEQ ID NO: 106 presenta el ejemplo106 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Cetoácido reductoisomerasa (**54**) (1661 pb) que incluye un partidorPCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc sp.* cepa PCC 7120 (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1209) seleccionada/modificada de la secuencia de la cetoácido reductoisomerasa de *Calditerrivibrio nitroreducens* (GenBank: YP_004050904), un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc sp.* (1210–1641), y un partidor PCR RE (1642–1661).

La SEQ ID NO: 107 presenta el ejemplo107 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Dihidroxi ácido deshidratasa (**55**) (2324 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc sp.* cepa PCC 7120 (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1872) seleccionada/modificada de la secuencia de la dihidroxi ácido deshidratasa de *Marivirga tractuosa* DSM 4126 (GenBank: YP_004053736), un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc sp.* (1873–2304), y un partidor PCR RE (2305–2324).

SEQ ID NO: 108 presenta el ejemplo108 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la alfa-Cetoácido Decarboxilasa de cadena ramificada (**42**) (2288 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc sp.* cepa PCC 7120 (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1836) seleccionada/modificada de la secuencia de la alfa-Cetoácido Decarboxilasa de cadena ramificada de *Lactococcus lactis* (GenBank: AAS49166), un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc sp.* (1837–2268), un partidor PCR RE (2269–2288).

SEQ ID NO: 109 presenta el ejemplo109 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la 2-metilbutiraldehído reductasa (**56**) (1613 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc sp.* cepa PCC 7120 (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1461) seleccionada/modificada de la secuencia de la 2-metilbutiraldehído reductasa *Schizosaccharomyces japonicus* y (GenBank: XP_002173231), un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc sp.* (1462–1893), y un partidor PCR RE (1894–1613).

Nótese, en las *Nostoc* transgénicas de diseño que contienen los genes de diseño controladas por el promotor *hox* de SEQ ID NOS: 104–109, las enzimas (genes) nativas de *Nostoc* **34**, **03–05**, **36–39** y **45–52** son usadas en combinación con las enzimas controladas por el promotor *hox* **35**, **53–55**, **42** y **56** (codificadas por los constructos de ADN de SEQ ID NOS: 104–109) para conferir las vías fotosintéticas dependientes de NADPH mejoradas, canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato para la producción fotobiológica de 2-metil-1-butanola partir de dióxido de carbono y agua (Figura 5).

El uso de *Prochlorococcus marinus* MIT 9313 como organismo huésped para la transformación genética con las SEQ ID NOS: 110–122 pueden crear *Prochlorococcus marinus* transgénicas de diseño para la producción fotobiológica de isobutanol y/o 3-metil-1-butanol (Figura 6). Brevemente, La SEQ ID NO:110 presenta el ejemplo 110 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *groE* para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD (**35**) (1300 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 137-pb de respuesta a calor y luz *groE* de *Prochlorococcus marinus* MIT 9313(21–157), una secuencia que codifica para la enzima (158–1159) seleccionada de la 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD de *Vibrio cholerae* MJ-1236 (GenBank: ACQ61431), un terminador de 121-pb *rbcS* de *Prochlorococcus marinus* MIT9313(1160–1280), y un partidor PCR RE (1281–1300).

La SEQ ID NO:111 presenta el ejemplo 111 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *groE* para la Fosfoglicerato mutasa (**03**) (1498 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 137-pb de respuesta a calor y luz *groE* de *Prochlorococcus marinus* MIT 9313(21–157), una secuencia que codifica para la enzima (158–1357) seleccionada de la fosfoglicerato mutasa de *Pelotomaculum thermopropionicum* SI (GenBank: YP_001212148), un terminador de 121-pb *rbcS* de *Prochlorococcus marinus* MIT9313(1358–1478), y un partidor PCR RE (1479–1498).

La SEQ ID NO:112 presenta el ejemplo 112 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *groE* para la Enolasa (**04**) (1588 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 137-pb de respuesta a calor y luz *groE* de *Prochlorococcus marinus* MIT 9313(21–157), una secuencia que codifica para la enzima (158–1447) seleccionada de la enolasa de *Thermotoga* (GenBank: ABQ46079), un terminador de 121-pb *rbcS* de *Prochlorococcus marinus* (1448–1568), y un partidor PCR RE (1569–1588).

SEQ ID NO:113 presenta el ejemplo 113 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *groE* para la Piruvato quinasa (**05**) (1717 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 137-pb de respuesta a calor y luz *groE* de *Prochlorococcus marinus* MIT 9313(21–157), una secuencia que codifica para la enzima (158–1576) seleccionada de la piruvato quinasa de *Thermotoga lettingae*

TMO (GenBank: YP_001471580), un terminador de 121-pb *rbcS* de *Prochlorococcus marinus* MIT9313(1577–1697), y un partidor PCR RE (1698–1717).

La SEQ ID NO:114 presenta el ejemplo114 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *groE* para la Acetolactato sintasa (**53**) (2017 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de137-pb de respuesta a calor y luz *groE* de *Prochlorococcus marinus* MIT 9313 (21–157), una secuencia que codifica para la enzima (158–1876) seleccionada de la acetolactato sintasa de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 (GenBank: AAU42663), un terminador de 121-pb *rbcS* de *Prochlorococcus marinus* MIT9313(1877–1997), y un partidor PCR RE (1998–2017).

SEQ ID NO:115 presenta el ejemplo 115 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *groE* para la Cetoácido reductoisomerasa (**54**) (1588 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de137-pb de respuesta a calor y luz *groE* de *Prochlorococcus marinus* MIT 9313(21–157), una secuencia que codifica para la enzima (158–1168) seleccionada de la cetoácido reductoisomerasa de *Thermotoga petrophila* RKU-1 (GenBank: ABQ46398), un terminador de 400-pb *rbcS* de *Prochlorococcus marinus* MIT9313(1169–1568), y un partidor PCR RE (1569–1588).

SEQ ID NO:116 presenta el ejemplo116 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *groE* para la Dihidroxi ácido deshidratasa (**55**) (1960 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 137-pb de respuesta a calor y luz *groE* de *Prochlorococcus marinus* MIT 9313(21–157), una secuencia que codifica para la enzima (158–1819) seleccionada de la dihidroxi ácido deshidratasa de *Syntrophothermus lipocalidus* DSM 12680 (GenBank: ADI02905), un terminador de 121-pb *rbcS* de *Prochlorococcus marinus* MIT9313 (1820–1940), y un partidor PCR RE (1941–1960).

SEQ ID NO:117 presenta el ejemplo 117 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *groE* para la 2-cetoácido decarboxilasa (**42**) (1945 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 137-pb de respuesta a calor y luz *groE* de *Prochlorococcus marinus* MIT 9313(21–157), una secuencia que codifica para la enzima (158–1804) seleccionada de la Alfa-cetoisovalerato decarboxilasa de *Lactococcus lactis* (GenBank: ADA65057), un terminador de 121-pb *rbcS* de *Prochlorococcus marinus* MIT9313 (1805–1925), y un partidor PCR RE (1926–1945).

La SEQ ID NO:118 presenta el ejemplo 118 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *nirA* para la Alcohol Deshidrogenasa (**43/44**) (1138 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 251-pb *nirA* de *Prochlorococcus* (21–271), una secuencia que codifica para la enzima (272–997) seleccionada de la deshidrogenasa de alcohol de cadena corta de *Geobacillus* (GenBank: YP_146837), un terminador de 121-pb *rbcS* de *Prochlorococcus marinus* (998–1118), y un partidor PCR RE (1119–1138).

Nótese, en la *Prochlorococcus* transgénicas de diseño que contienen los genes de SEQ ID NOS: 110–118, las enzimas (genes) nativas de *Prochlorococcus* **34** son usadas en combinación con las enzimas controladas por el promotor *groE* y *nirA* **35**, **03–05**, **53–55**, **42** y **43/44** (codificadas por los constructos de ADN de SEQ ID NOS: 110–118) para conferir las vías fotosintéticas dependientes de NADPH mejoradas, canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato para la producción fotobiológica de isobutanol a partir de dióxido de carbono y agua (Figura 6). La adición de los cuatro siguientes genes de diseño controlados por el promotor *groE* (SEQ ID NO:119–122) resulta en otras *Prochlorococcus* transgénicas de diseño que pueden producir tanto isobutanol y 3-metil-1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua (**35**, **03–05**, **53–55**, **42**, **43/44**, más **38–40** y **57** como se muestra en la Figura 6).

Brevemente, la SEQ ID NO:119 presenta el ejemplo 119 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *groE* para la 2-Isopropilmalato Sintasa (**40**) (1816 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 137-pb de respuesta a calor y luz *groE* de *Prochlorococcus marinus* MIT 9313 (21–157), una secuencia que codifica para la enzima (158–1675) seleccionada de la 2-isopropilmalato sintasa de *Pelotomaculum thermopropionicum* SI (GenBank: YP_001211081), un terminador de 121-pb *rbcS* de *Prochlorococcus marinus* (1676–1796), y un partidor PCR RE (1797–1816).

La SEQ ID NO:120 presenta el ejemplo 120 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *groE* para la 3-isopropilmalato deshidratasa (**38**) (2199 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 137-pb de respuesta a calor y luz *groE* de *Prochlorococcus marinus* MIT 9313 (21–157), una secuencia que codifica para la subunidad grande de la enzima (158–1420) seleccionada de la subunidad grande 3-isopropilmalato deshidratasa de *Pelotomaculum*

thermopropionicum SI (GenBank: YP_001211082), un promotor de 137-pb de respuesta a calor y luz *groE* de *Prochlorococcus marinus* MIT 9313(1421–1557), una secuencia que codifica para la subunidad pequeña de la enzima (1558–2058) seleccionada de la subunidad pequeña de la 3-isopropilmalato deshidratasa de *Pelotomaculum thermopropionicum* SI (GenBank: YP_001211083), un terminador de 121-pb *rbcS* de *Prochlorococcus marinus* (2059–2179), y un partidor PCR RE (2180–2199).

La SEQ ID NO:121 presenta el ejemplo 121 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *groE* para la 3-isopropilmalato deshidrogenasa (**39**) (1378 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 137-pb de respuesta a calor y luz *groE* de *Prochlorococcus marinus* MIT 9313(21–157), una secuencia que codifica para la enzima (158–1237) seleccionada de la 3-isopropilmalato deshidrogenasa de *Syntrophothermus lipocalidus* DSM 12680 (GenBank: ADI02898), un terminador de 121-pb *rbcS* de *Prochlorococcus marinus* (1238–1358), y un partidor PCR RE (1359–1378).

La SEQ ID NO:122 presenta el ejemplo 122 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *groE* para la 3-Metilbutanal Reductasa (**57**) (1327 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 137-pb de respuesta a calor y luz *groE* de *Prochlorococcus marinus* MIT 9313(21–157), una secuencia que codifica para la enzima (158–1186) seleccionada de la 3-Metilbutanal reductasa de *Saccharomyces cerevisiae* S288c (GenBank: DAA10635), un terminador de 121-pb *rbcS* de *Prochlorococcus marinus* (1187–1307), y un partidor PCR RE (1308–1327).

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS: 110–117 y 119–122 en la transformación genética de *Prochlorococcus marinus* MIT 9313 crea otro *Prochlorococcus marinus* transgénico de diseño controlado por el promotor *groE* con vías canalizadas del ciclo de Calvin (identificada como **34** (nativa), **35**, **03–05**, **53–55**, **38–40**, **42** y **57** en la Figura 6) para la producción fotobiológica de 3-metil-1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua.

El uso de *Cyanothecae* sp. ATCC 51142 como organismo huésped para la transformación genética con las SEQ ID NOS: 123–128 puede crear un *Cyanothecae* transgénico de diseño para la producción fotobiológica de 1-pentanol, 1-hexanol, y/o 1-heptanol (Figura 8). Brevemente, la SEQ ID NO:123 presenta el ejemplo 123 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *nirA* para la 2-Isopropilmalato

Sintasa (**40**) (2004 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 203-pb *nirA* de *Cyanothece sp.* (21–223), una secuencia que codifica para la enzima (224–1783) seleccionada de la 2-isopropilmalato sintasa de *Hydrogenobacter thermophilus* (GenBank: BAI69273), un terminador de 201-pb rbcS de *Cyanothece sp.* (1784–1984), y un partidor PCR RE (1985–2004).

La SEQ ID NO: 124 presenta el ejemplo 124 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *nirA* para la subunidad grande/pequeña de la Isopropilmalato Isomerasa (**41**) (2648 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 203-pb *nirA* de *Cyanothece sp.* (21–223), una secuencia que codifica para la subunidad grande de la enzima (224–1639) seleccionada de la subunidad grande de la isopropilmalato isomerasa de *Anoxybacillus flavithermus WK1* (GenBank: YP_002314962), un promotor de 203-pb *nirA* de *Cyanothece sp.* (1640–1842), una secuencia que codifica para la subunidad pequeña de la enzima (1843–2427) seleccionada de la subunidad pequeña de la isopropilmalato isomerasa de *Anoxybacillus flavithermus WK1* (GenBank: YP_002314963), un terminador de 201-pb rbcS de *Cyanothece sp.* (2428–1628), y un partidor PCR RE (2629–2648).

La SEQ ID NO: 125 presenta el ejemplo 125 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *nirA* para la 3-isopropilmalato deshidrogenasa (**39**) (1530 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 203-pb *nirA* de *Cyanothece sp.* (21–223), una secuencia que codifica para la enzima (224–1309) seleccionada de la 3-isopropilmalato deshidrogenasa de *Thermosynechococcus elongatus BP-1* (GenBank: BAC09152), un terminador de 201-pb rbcS de *Cyanothece sp.* (1310–1310), y un partidor PCR RE (1311–1530).

La SEQ ID NO: 126 presenta el ejemplo 126 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *nirA* para la 2-cetoácido decarboxilasa (**42'**) (2088 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 203-pb *nirA* de *Cyanothece sp.* (21–223), una secuencia que codifica para la enzima (224–1867) seleccionada de la 2-cetoácido decarboxilasa de *Lactococcus lactis* (GenBank: AAS49166), un terminador de 201-pb rbcS de *Cyanothece sp.* (1868–2068), y un partidor PCR RE (2069–2088).

SEQ ID NO: 127 presenta el ejemplo 127 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *nirA* para la Hexanol Deshidrogenasa (**12'**) (1503 pb) que incluye un

partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 203-pb *nirA* de *Cyanothece sp.* (21–223), una secuencia que codifica para la enzima (224–1282) seleccionada de la hexanol deshidrogenasa *Mycobacterium chubuense* (GenBank: ACZ56328), un terminador de 201-pb *rbcS* de *Cyanothece sp* (1283–1483), y un partidor PCR RE (1484–1503).

La SEQ ID NO: 128 presenta el ejemplo 128 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *nirA* para la deshidrogenasa de alcohol de cadena corta (**43'**, **43''**) (1149 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 203-pb *nirA* de *Cyanothece sp.* (21–223), una secuencia que codifica para la enzima (224–928) seleccionada de la deshidrogenasa de alcohol de cadena corta de *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 (GenBank: AAC25556), un terminador de 201-pb *rbcS* de *Cyanothece sp* (929–1129), y un partidor PCR RE (1130–1149).

Nótese, en los *Cyanothece* transgénicos de diseño que contienen los genes de diseño controlados por el promotor *nirA* de SEQ ID NOS: 123–127, las enzimas nativas de *Cyanothece* **34**, **03–05**, **36–38**, y **45–52** son usadas en combinación con las enzimas de diseño controladas por el promotor *nirA* **35,39–41** (**39'–41'**, **39'–41''**), **42'** y **12'** (codificadas por los constructos de ADN de SEQ ID NOS: 123–127) para conferir las vías fotosintéticas dependientes de NADPH mejoradas, canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato para la producción fotobiológica de 1-hexanola partir de dióxido de carbono y agua (Figura 8). La adición de un gen de diseño controlado por el promotor *nirA* (SEQ ID NO: 128) de una deshidrogenasa de alcohol de cadena corta **43'** (**43''**) de actividad promiscua resulta en otro *Cyanothece* transgénico de diseño que contiene una vía canalizada con el ciclo de Calvin (**35**, **39–41**, **39'–43'**, **39'–43''**, y **39''–43''** como se muestra en la Figura 8) que puede producir 1-pentanol, 1-hexanol, y 1-hexanola partir de dióxido de carbono y agua.

Organismos Fotosintéticos de Diseño Avanzados Canalizados con el Ciclo de Calvin para la Producción de Butanol y Alcoholes Superiores Relacionados

De acuerdo a una de varias representaciones, el uso de ciertos constructos de ADN de diseño en la transformación genética de organismos fotosintéticos eucariontes tales como células vegetales, plantas eucariotas acuáticas (incluyendo, por ejemplo, algas eucariotas, hierbas acuáticas sumergidas, lentejas de agua, repollitos de agua, botones

de oro, castañas de agua, nenúfares, jacinto de agua, *Bolbitis heudelotii*, *Cabomba* sp., ypasto marino) pueden crear organismos fotosintéticos eucariotas de diseño para la producción de butanol y alcoholes superiores relacionados a partir de dióxido de carbono y agua. Las algas eucariotas que pueden ser seleccionadas para su uso como organismo huésped para crear algas de diseño para la producción fotobiológica de butanol y alcoholes superiores relacionados incluyen (pero no se limitan a): *Dunaliella salina*, *Dunaliella viridis*, *Dunaliella bardowil*, *Cryptothecodinium cohnii*, *Schizochytrium* sp., *Chlamydomonas reinhardtii*, *Platymonas subcordiformis*, *Chlorella fusca*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, '*Chlorella*' *ellipsoidea*, *Chlorella* spp., *Haematococcus pluvialis*; *Parachlorella kessleri*, *Betaphycus gelatinum*, *Chondrus crispus*, *Cyanidioschyzon merolae*, *Cyanidium caldarium*, *Galdieria sulphuraria*, *Gelidiella acerosa*, *Gracilaria changii*, *Kappaphycus alvarezii*, *Porphyra miniata*, *Ostreococcus tauri*, *Porphyra yezoensis*, *Porphyridium* sp., *Palmaria palmata*, *Gracilaria* spp., *Isochrysis galbana*, *Kappaphycus* spp., *Laminaria japonica*, *Laminaria* spp., *Monostroma* spp., *Nannochloropsis oculata*, *Porphyra* spp., *Porphyridium* spp., *Undaria pinnatifida*, *Ulva lactuca*, *Ulva* spp., *Undaria* spp., *Phaeodactylum Tricornutum*, *Navicula saprophila*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Cyclotella cryptica*, *Euglena gracilis*, *Amphidinium* sp., *Symbiodinium microadriaticum*, *Macrocystis pyrifera*, *Ankistrodesmus braunii*, *Scenedesmus obliquus*, *Stichococcus* sp., *Platymonas* sp., *Dunaliella* sauna, y *Stephanoptera gracilis*.

De acuerdo a otras representaciones, el organismo fotosintético transgénico incluye una planta o célula vegetal transgénica seleccionada del grupo consistente en plantas acuáticas, células vegetales, algas verdes, algas rojas, algas pardas, algas verde-azules (oxifotobacterias incluyendo cianobacterias y oxiclrobacterias), diatomeas, algas marinas, algas de agua dulce, cepas de algas tolerantes a la sal, cepas de algas tolerantes al frío, cepas de algas tolerantes al calor, mutantes deficientes en pigmentos antena, cepas de algas tolerantes al butanol, cepas de algas tolerantes a alcoholes superiores, oxifotobacterias tolerantes al butanol, oxifotobacterias tolerantes a alcoholes superiores, y combinaciones de estas.

De acuerdo a otras representaciones, dicho organismo fotosintético transgénico incluye una característica de resguardo de bioseguridad del grupo consistente en: un gen para un canal de protones de diseño, inducible bajo condiciones predeterminadas, un gen

para un ARNi del ciclo de división celular, inducible bajo condiciones predeterminadas, Un mutante con altos requerimientos de CO₂ como organismo huésped para su transformación con vías productoras de biocombustibles de diseño para crear organismos fotosintéticos con división celular controlable, y combinaciones de estos.

La mayor complejidad y compartimentación de las células vegetales eucariotas permite la creación de un rango más amplio de organismos de diseño con actividad fotobiológica y vías metabólicas novedosas compartimentalmente segregadas para la producción de butanol y/o alcoholes superiores relacionados a partir de agua y dióxido de carbono. En una célula de alga eucariota, por ejemplo, la traducción de los genes de diseño nucleares ocurre en el citosol aunque la fotosíntesis/ciclo de Calvin ocurre dentro del cloroplasto del alga. Esta clara separación de la fotosíntesis en el cloroplasto de la planta de otras funciones subcelulares tales como las funciones de la membrana plasmática citoplasmática, citosol y mitocondria puede ser usado como una ventaja en la creación de algas de diseño con resguardo de bioseguridad a través de la inserción inducibles de canales de protones en la membrana plasmática citosólica para inhabilitar permanentemente cualquier capacidad división celular y/o apareamiento pero manteniendo el cloroplasto del alga funcional trabajando en la producción de biocombustibles, con las vías para producir butanol y alcoholes superiores relacionados. Sin embargo, es esencial de entregar genéticamente la enzima (o enzimas) de diseño en el cloroplasto para controlar el ciclo de Calvin y canalizar el metabolismo hacia la producción de butanol directamente a partir de CO₂ y H₂O. Esto requiere un diseño de genes más complicado para lograr los resultados deseados.

De acuerdo a una de varias representaciones, las enzimas de las vías canalizadas con el ciclo de Calvin que codifican de genes de diseño nucleares pueden ser destinadas para expresarse en cloroplasto de algas a través del uso de secuencias de péptido señal. Dicho péptido señal es seleccionado del grupo consistente en las secuencias del péptido señal de la hidrogenasa (HydA1 y HydA2), secuencia del péptido señal de la ferredoxina transit-peptide secuencia (Frax1), secuencia del péptido señal de la tioredoxina-m (Trx2), secuencia del péptido señal de la glutaminasintasa (Gs2), secuencia del péptido señal de LhcII, secuencia del péptido señal de PSII-T (PsbT), secuencia del péptido señal de PSII-S (PsbS), secuencia del péptido señal de PSII-W (PsbW), secuencia del péptido señal de la subunidad-γ de CF₀CF₁ (AtpC), secuencia

del péptido señal de la subunidad- δ de CF₀CF₁ (AtpD), secuencia del péptido señal de la subunidad-II de CF₀CF₁ (AtpG), secuencia del péptido señal del fotosistema I (PSI), secuencia del péptido señal de Rubisco SSU, y combinaciones de estas. Las secuencias de péptido señal preferidas incluyen el péptido señal HydI, el péptido señal Frx1, y los péptido señal de Rubisco SSU (tales como RbcS2).

Las SEQ ID NOS. 129 –165 presentan ejemplo de constructos de ADN de diseño de enzimas de destinación al cloroplasto de diseño para la creación de organismos fotosintéticos eucariotas de diseño tales como algas de diseño con vías fotosintéticas dependiente de NADPH mejoradas y canalizadas con el ciclo de Calvin para la producción fotobiológica de butanol y alcoholes superiores relacionados. Brevemente, la SEQ ID NO. 129 presenta el ejemplo 129 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Fosfoglicerato mutasa (**03**) (1910 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* (nitrato reductasa) de *Chlamydomonas* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la Fosfoglicerato mutasa (324–1667) seleccionada de la Fosfoglicerato mutasa de *Nostoc azollae* (ADI65627), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1668–1890), y un partidor PCR RE (1891–1910).

La SEQ ID NO. 130 presenta el ejemplo 130 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Enolasa (**04**) (1856 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* (nitrato reductasa) de *Chlamydomonas* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la Enolasa (324–1613) seleccionada/modificada de la Enolasa de *Nostoc azollae* (ADI63801), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1614–1836), y un partidor PCR RE (18837–1856).

La SEQ ID NO. 131 presenta el ejemplo 131 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Piruvato-Quinasa (**05**) (1985 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* (nitrato reductasa) de *Chlamydomonas* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la enzima (324–1742) seleccionada/modificada de la piruvato-quinasa *Cyanothece sp. PCC 8802*

(YP_003138017), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1743–1965), y un partidor PCR RE (1966–1985).

La SEQ ID NO. 132 presenta el ejemplo 132 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa dependiente de NADPH (**34**) (1568 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa dependiente de NADPH (324–1325) seleccionada/modificada de la Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa dependiente de NADPH de *Staphylococcus lugdunensis* (ADC87332), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1326–1548), y un partidor PCR RE (1549–1568).

La SEQ ID NO. 133 presenta el ejemplo 133 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa dependiente de NAD (**35**) (1571 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa dependiente de NAD (324–1328) seleccionada/modificada de la Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa dependiente de NAD de *Flavobacteriaceae bacterium* (YP_003095198), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1329–1551), y un partidor PCR RE (1552–1571).

La SEQ ID NO. 134 presenta el ejemplo 134 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Citramalato sintasa (**36**) (2150 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la Citramalato sintasa (324–1907) seleccionada de la Citramalato sintasa de *Hydrogenobacter* (ADO45737), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1908–2130), y un partidor PCR RE (2131–2150).

La SEQ ID NO. 135 presenta el ejemplo 135 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de las subunidades

grande/pequeña de la 3-Isopropilmalato/(R)-2-metilmalato deshidratasa (**37**) (3125 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb Nial de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas*(189–323), una secuencia que codifica para la subunidad grande de la 3-isopropilmalato/(R)-2-metilmalato deshidratasa (324–2084) seleccionada /modificada de la subunidad grande de la 3-isopropilmalato/(R)-2-metilmalato deshidratasa (YP_002930810), un promotor de 2 x 84-pb Nial de *Chlamydomonas*(2085–2252), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas*(2253–2387), una secuencia que codifica para la subunidad pequeña de la 3-isopropilmalato/(R)-2-metilmalato deshidratasa (2388–2882) seleccionada /modificada de la subunidad pequeña de la 3-isopropilmalato/(R)-2-metilmalato deshidratasa (YP_002930809), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (2883–3105), y un partidor PCR RE (3106–3125).

La SEQ ID NO. 136 presenta el ejemplo 136 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la subunidades grande/pequeña 3-isopropilmalato deshidratasa (**38**) (2879 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb Nial de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la subunidad grande de la 3-isopropilmalato deshidratasa (324–1727) seleccionada /modificada de la subunidad grande de la 3-isopropilmalato deshidratasa de *Cyanothece* (YP_003886427), un promotor de 2 x 84-pb Nial de *Chlamydomonas* (1727–1894), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1895–2029), una secuencia que codifica para la subunidad pequeña de la 3-isopropilmalato deshidratasa (2030–2636) seleccionada de la subunidad pequeña de la 3-isopropilmalato deshidratasa de *Cyanothece* 3- (YP_003889452), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (2637–2859), y un partidor PCR RE (2860–2879).

La SEQ ID NO. 137 presenta el ejemplo 137 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la 3-isopropilmalato deshidrogenasa (**39**) (1661 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb Nial de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la 3-isopropilmalato deshidrogenasa (324–1418) seleccionada/modificada de la 3-

isopropilmalato deshidrogenasa de *Cyanothece* (YP_003888480), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1419–1641), y un partidor PCR RE (1642–1661).

La SEQ ID NO. 138 presenta el ejemplo 138 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la 2-Isopropilmalato Sintasa (**40**) (2174 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la 2-Isopropilmalato Sintasa (324–1931) seleccionada/modificada de la 2-isopropilmalato sintasa de *Cyanothece* (YP_003890122), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1932–2154), y un partidor PCR RE (2155–2174).

La SEQ ID NO. 139 presenta el ejemplo 139 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de las subunidades grande/pequeña de la Isopropilmalato Isomerasa **41** (2882 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la subunidad grande de la isopropilmalatoisomerasa (324–1727) seleccionada /modificada de la subunidad grande de la isopropilmalato isomerasa de *Anabaena variabilis* (YP_324467), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas* (1728–1895), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1896–2030), una secuencia que codifica para la subunidad pequeña de la isopropilmalatoisomerasa (2031–2639) seleccionada /modificada de la subunidad pequeña de la isopropilmalato isomerasa de *Anabaena* (YP_324466), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (2640–2862), y un partidor PCR RE (2863–2882).

La SEQ ID NO. 140 presenta el ejemplo 140 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la 2-cetoácido decarboxilasa (**42**) (2210 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la 2-cetoácido decarboxilasa (324–1967) seleccionado de la 2-cetoácido decarboxilasa de *Lactococcus* (AAS49166), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1968–2190), y un partidor PCR RE (2191–2210).

La SEQ ID NO. 141 presenta el ejemplo 141 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de laAlcohol Deshidrogenasa dependiente de NADH (**43**) (1724 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas*(189–323), una secuencia que codifica para la Alcohol Deshidrogenasa dependiente de NADH (324–1481) seleccionada/modificada de la Alcohol Deshidrogenasa dependiente de NADH de *Gluconacetobacter hansenii* (ZP_06834544), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas*(1482–1704), y un partidor PCR RE (1705–1724).

La SEQ ID NO. 142 presenta el ejemplo 142 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de laAlcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH (**44**) (1676 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para laAlcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH (324–1433) seleccionada/modificada de la Alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH de *Fusobacterium* (ZP_04573952), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1434–1656), y un partidor PCR RE (1657–1676).

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS.129–141 (y/o 142) en la transformación genética de un organismo fotosintético eucariota tal como *Chlamydomonas* puede crear organismos fotosintéticos eucariotas de diseño tales como *Chlamydomonas* de diseño vías mejoradas-dependientes de NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato (**03–05, 34–43/44** en la Figura 4) para la producción fotobiológica de 1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua.

La SEQ ID NO. 143 presenta el ejemplo 143 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Fosfoenolpiruvato Carboxilasa (**45**) (3629 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas*(189–323), una secuencia que codifica para laFosfoenolpiruvato Carboxilasa (324–3386) seleccionada/modificada de la Fosfoenolpiruvato Carboxilasa de *Cyanothece sp. PCC 7822* (YP_003887888), un

terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (3387–3609) y un partidor PCR RE (3610–3629).

La SEQ ID NO. 144 presenta el ejemplo 144 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Aspartato Aminotransferasa (**46**) (1745 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la Aspartato Aminotransferasa (324–1502) seleccionada/modificada de la Aspartato Aminotransferasa de *Synechococcus elongatus* PCC 6301 (YP_172275), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1503–1525), y un partidor PCR RE (1526–1745).

La SEQ ID NO. 145 presenta el ejemplo 145 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Aspartoquinasa (**47**) (2366 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la Aspartoquinasa (324–2123) seleccionada/modificada de la Aspartoquinasa de *Cyanotheca* (YP_003136939), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (2124–2346), y un partidor PCR RE (2347–2366).

La SEQ ID NO. 146 presenta el ejemplo 146 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Aspartato-Semialdehído Deshidrogenasa (**48**) (1604 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la Aspartato-Semialdehído Deshidrogenasa (324–1361) seleccionada/modificada de la Aspartato-Semialdehído Deshidrogenasa de *Trichodesmium erythraeum* IMS101 (ABG50031), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1362–1584), y un partidor PCR RE (1585–1604).

La SEQ ID NO. 147 presenta el ejemplo 147 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Homoserina Deshidrogenasa (**49**) (1868 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal

de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la homoserina Deshidrogenasa (324–1625) seleccionada de la homoserina Deshidrogenasa de *Cyanothece* (YP_003887242), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1626–1848), y un partidor PCR RE (1849–1868).

La SEQ ID NO. 148 presenta el ejemplo 148 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Homoserina Quinasa (**50**) (1472 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la Homoserinaquinasa (324–1229) seleccionada/modificada de la Homoserina quinasa de *Cyanothece* (YP_003886645), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1230–1452), y un partidor PCR RE (1453–1472).

La SEQ ID NO. 149 presenta el ejemplo 149 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Treonina Sintasa (**51**) (1655 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la Treoninasintasa (324–1412) seleccionada/modificada de la Treonina sintasa de *Cyanothece* (YP_002485009), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1413–1635), y un partidor PCR RE (1636–1655).

La SEQ ID NO. 150 presenta el ejemplo 150 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Treonina Amonio-Liasa (**52**) (2078 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la treonina amonio-liasa (324–1835) seleccionada/modificada de la treonina amonio-liasa *Synechococcus* (ZP_05035047), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1836–2058), y un partidor PCR RE (2059–2078).

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS. 129, 130, 132, 133, 143–150, 137–141 (y/o 141) para la transformación genética de un organismo fotosintético eucariota tal como *Chlamydomonas* puede crear un organismo fotosintético eucariota de diseño tal como *Chlamydomonas* de diseño con vías mejoradas dependientes de NADPH, canalizadas

con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato (**03, 04, 34, 35, 45–52, 39–43/44** en la Figura 4) para la producción fotobiológica de 1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua.

La SEQ ID NO. 151 presenta el ejemplo151 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Acetolactato sintasa (**53**) (2282 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la acetolactato sintasa (324–2039) seleccionada de la acetolactato sintasa de *Bacillus subtilis* (CAB07802), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (2040–2262), y un partidor PCR RE (2263–2282).

La SEQ ID NO. 152 presenta el ejemplo152 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Cetoácido reductoisomerasa (**54**) (1562 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la enzima (324–1319) seleccionada/modificada de la cetoácido reductoisomerasa de *Cyanothece* (YP_003885458), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1320–1542), y un partidor PCR RE (1543–1562).

SEQ ID NO. 153 presenta el ejemplo153 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Dihidroxi ácido deshidratasa (**55**) (2252 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la dihidroxi ácido deshidratasa (324–2009) seleccionada de la dihidroxi ácido deshidratasa *Cyanothece* (YP_003887466), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (2010–2232), y un partidor PCR RE (2233–2252).

La SEQ ID NO. 154 presenta el ejemplo154 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la 2-metilbutiraldehído reductasa (**56**) (1496 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la

enzima (324–1253) seleccionada/modificada de la 2-metilbutiraldehído reductasa de *Pichia pastoris* GS115 (XP_002490018), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1254–1476), y un partidor PCR RE (1477–1496).

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS. 129–137, 140, y 151–154 en la transformación genética de un organismo fotosintético eucariota tal como *Chlamydomonas* puede crear organismos fotosintéticos eucariotas de diseño tales como *Chlamydomonas* de diseño vías mejoradas-dependientes de NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato (**03–05, 34–39, 53–55, 42, y 56** en La Figura 5) para la producción fotobiológica de 2-metil-1-butanol a partir dedióxido de carbono y agua.

La SEQ ID NO. 155 presenta el ejemplo 155 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la 3-Metilbutanal Reductasa (**57**) (1595 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la 3-metilbutanal reductasa (324–1352) seleccionada/modificada de la 3-metilbutanal reductasa de *Saccharomyces cerevisiae* S288c (DAA10635), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1353–1575), y un partidor PCR RE (1576–1595).

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS. 129–133, 151–153, 140 y 141 (o 142) para la transformación genética de un organismo fotosintético eucariota tal como *Chlamydomonas* puede crear un organismo fotosintético eucariota de diseño tal como *Chlamydomonas* de diseño con vías mejoradas dependientes de NADPH, canalizadas con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato (**03–05, 34, 35, 53–55, 42, y 43 (44)** en la Figura 6) para la producción fotobiológica de isobutanol a partir dedióxido de carbono y agua. Mientras que, las SEQ ID NOS. 129–133, 151–153, 136–138, 140 y 155 representan organismo fotosintético eucariota de diseño tal como *Chlamydomonas* de diseño con vías mejoradas dependientes de NADPH, canalizadas con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato (**03–05, 34, 35, 53–55, 40, 38, 39, 42, y 57** en la Figura 6) que puede producir de manera fotobiológica 3-metil-1-butanol a partir dedióxido de carbono y agua.

La SEQ ID NO. 156 presenta el ejemplo 156 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Butanol Deshidrogenasa dependiente de NADH (**12a**) (1739 pb) que incluye un partidor PCR

FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la enzima (324–1496) seleccionada/modificada de la *Clostridium perfringens* Butanol Deshidrogenasa dependiente de NADH (NP_561774), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1497–1719), y un partidor PCR RE (1720–1739).

La SEQ ID NO. 157 presenta el ejemplo 157 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Butanol Deshidrogenasa dependiente de NADPH (**12b**) (1733 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la enzima (324–1490) seleccionada/modificada de la butanol Deshidrogenasa dependiente de NADPH *Clostridium saccharobutylicum* (AAA83520), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1491–1713), y un partidor PCR RE (1714–1733).

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS. 129–140 y 156 (y/o 157) en la transformación genética de un organismo fotosintético eucariota tal como *Chlamydomonas* puede crear organismos fotosintéticos eucariotas de diseño tales como *Chlamydomonas* de diseño vías mejoradas-dependientes de NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato (**03–05, 34–42 y 12** en la Figura 4) para la producción fotobiológica más específica de 1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua. Similarmente, las SEQ ID NOS. 129, 130, 132, 133, 143–150, 137–140, y 156 (y/o 157) representan otro organismo fotosintético eucariota de diseño tal como *Chlamydomonas* con vías mejoradas-dependientes de NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato (**03, 04, 34, 35, 45–52, 39–42 y 12** en la Figura 4) para la producción fotobiológica 1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua.

La SEQ ID NO. 158 presenta el ejemplo 158 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la 3-Cetotiolasa (**07'**) (1745 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la 3-Cetotiolasa (324–1502) seleccionada/modificada de la 3-Cetotiolasa *Azohydromonas lata* (AAD10275),

un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1503–1725), y un partidor PCR RE (1726–1745).

La SEQ ID NO. 159 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la 3-Hidroxiacil-CoA Deshidrogenasa (**08'**) (1439 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la enzima (324–1196) seleccionada/modificada de la *Oceanithermus* 3-Hidroxiacil-CoA Deshidrogenasa (ADR36325), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1197–1419), y un partidor PCR RE (1420–1439).

SEQ ID NO. 160 presenta el ejemplo 160 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Enoil-CoA deshidratasa (**09'**) (1337 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la enzima (324–1094) seleccionada/modificada de la Enoil-CoA deshidratasa *Bordetella petrii* (YP_001629844), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1095–1317), y un partidor PCR RE (1318–1337).

La SEQ ID NO. 161 presenta el ejemplo 161 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* de la 2-Enoil-CoA reductasa (**10'**) (1736 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la enzima (324–1493) seleccionada/modificada de la 2-Enoil-CoA reductasa de *Xanthomonas campestris* (YP_001905744), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1494–1716), y un partidor PCR RE (1717–1736).

SEQ ID NO. 162 presenta el ejemplo 162 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Acil-CoA reductasa (**11'**) (2036 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la enzima (324–1793) seleccionada/modificada de la Acil-CoA reductasa de *Thermosphaera aggregans*

(YP_003649571), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1794–2016), y un partidor PCR RE (2017–2036).

La SEQ ID NO. 163 presenta el ejemplo 163 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Hexanol Deshidrogenasa (**12'**) (1625 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la enzima (324–1382) seleccionada/ modificada de la hexanol Deshidrogenasa de *Mycobacterium chubuense* (ACZ56328), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1383–1605), y un partidor PCR RE (1606–1625).

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS. 158–163 con constructos de ADN apropiados tales como las SEQ ID NOS. 132 y 133 en la transformación genética de un organismo fotosintético eucariototal como *Chlamydomonas* puede crear organismos fotosintéticos eucariotas de diseño tales como *Chlamydomonas* de diseño con vías mejoradas dependientes de NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato productoras de hexanol (**34, 35, 03–10, y 07'–12'** en la Figura 7) para la producción fotobiológica de 1-hexanol a partir de dióxido de carbono y agua.

La SEQ ID NO. 164 presenta el ejemplo 164 para un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* y con destinación a cloroplasto de la Octanol Deshidrogenasa (**12''**) (1249 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la enzima (324–1006) seleccionada/modificada de la Octanol Deshidrogenasa de *Drosophila subobscura* (ABO65263), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1007–1229), y un partidor PCR RE (1230–1249).

Nótese, las SEQ ID NOS. 132, 133, y 158–163 representan un organismo fotosintético eucariota tal como *Chlamydomonas* con una vía de diseño para la elongación de cadenas de hidrocarburos (**34, 35, 07'–12'** como se muestra en la Figura 7) para la producción fotobiológica de 1-hexanol. SEQ ID NOS: 132, 133, 158–162 y 164 representan otro organismo fotosintético eucariota de diseño tal como *Chlamydomonas* con una vía de diseño para la elongación de cadenas de hidrocarburos (**34, 35, 07'–10'**

y **07''–12''** como se muestra en La Figura7) para la producción fotobiológica de 1-octanol.

La SEQ ID NO. 165: un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *Nial* con destinación a cloroplasto de la Deshidrogenasa de Alcohol de cadena corta (**43'**) (1769 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb *Nial* de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (189–323), una secuencia que codifica para la enzima (324–1526) seleccionada/ modificada de la Deshidrogenasa de Alcohol de cadena corta de *Burkholderia* (ABO56626), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas* (1527–1749), y un partidor PCR RE (1750–1769).

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS. 129–140 y 165 en la transformación genética de un organismo fotosintético eucariota tal como *Chlamydomonas* puede crear organismos fotosintéticos eucariotas de diseño tales como *Chlamydomonas* de diseño vías mejoradas-dependientes de NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato (**03–05, 34–41, 39'–43', 39'–43' y 39''–43''** en la Figura 8) para la producción fotobiológica de 1-pentanol, 1-hexanol, y 1-heptanol a partir de dióxido de carbono y agua. Similarmente, las SEQ ID NOS. 129–140 y 163 representan otro organismo fotosintético eucariota de diseño tales como *Chlamydomonas* con vías mejoradas-dependientes de NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato (**03–05, 34–41, 39'–41', 39'–42' y 12'** en la Figura 8) para la producción fotobiológica de 1-hexanol a partir de dióxido de carbono y agua.

Similarmente, el uso de las SEQ ID NOS. 129–137, 151–153, 138–140 y 165 la transformación genética de un organismo fotosintético eucariota tal como *Chlamydomonas* puede crear organismos fotosintéticos eucariotas de diseño tales como *Chlamydomonas* de diseño con vías mejoradas-dependientes de NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato (**03–05, 34–39, 53–55, 39'–43', 39'–43', y 39''–43''** en la Figura 9) para la producción fotobiológica de 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, y 5-metil-1-heptanol a partir de dióxido de carbono y agua; La expresión de las SEQ ID NOS. 129, 130, 132, 133, 143–150, 151–153, 137–140 y 165 en un organismo fotosintético eucariota tal como *Chlamydomonas* representa otro organismo fotosintético eucariota de diseño tal como *Chlamydomonas* con vías mejoradas-dependientes de NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de

3-fosfoglicerato(03, 05, 34, 35, 42–55, 39'–43', 39'–43', y 39''–43'' en la Figura 9) para la producción fotobiológica de 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, y 5-metil-1-heptanol a partir de dióxido de carbono y agua; La expresión de las SEQ ID NOS. 129–133, 151–153, 136–140 y 165 en un organismo fotosintético eucariota huésped tal como *Chlamydomonas* representa otro organismo fotosintético eucariota de diseño tal como *Chlamydomonas* con vías mejoradas-dependientes de NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato (03–05, 34, 35, 53–55, 40, 38, 39, 39'–43', 39'–43', y 39''–43'' en la Figura 10) para la producción fotobiológica de 4-metil-1-pentanol, 5-metil-1-hexanol, y 6-metil-1-heptanol a partir de dióxido de carbono y agua.

Uso de Organismos Fotosintéticos de Diseño con un Fotobiorreactor Para la Producción y Recolección de Butanol y Alcoholes Superiores Relacionados

Los organismos fotosintéticos de diseño con vías fotosintéticas mejoradas-dependientes de NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin (Figuras 1, y 4-10) pueden ser usados con un fotobiorreactor para la producción y recolección de butanol y/o alcoholes superiores relacionados. Este butanol y/o alcoholes superiores relacionados son seleccionados del grupo consistente en: 1-butanol, 2-metil-1-butanol, isobutanol, 3-metil-1-butanol, 1-hexanol, 1-octanol, 1-pentanol, 1-heptanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, 5-metil-1-heptanol, 4-metil-1-pentanol, 5-metil-1-hexanol, 6-metil-1-heptanol, y combinaciones de estos.

Dichos organismos fotosintéticos de diseño tales como oxifotobacterias y algas transgénicas de diseño incluyen genes de vías fotosintéticas mejoradas-dependientes de NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin y tecnología de resguardo de bioseguridad para la producción fotobiológica mejorada de butanol y alcoholes superiores relacionados a partir de dióxido de carbono y agua. De acuerdo a una de varias representaciones, es una práctica preferida el crecer organismos fotosintéticos de diseño fotoautotróficamente usando dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O) como las fuentes de carbono y electrones en un medio de cultivo que contiene nutrientes inorgánicos. Los elementos nutrientes que son comúnmente requeridos para el crecimiento de un organismo fotosintético oxigénico son: N, P, y K a concentraciones de alrededor de 1-10 mM, y Mg, Ca, S, y Cl a concentraciones de alrededor de 0,5 a 1,0 mM, más algunos elementos traza como Mn, Fe, Cu, Zn, B, Co, Mo entre otros a

concentraciones μM . Todos los nutrientes minerales pueden ser suministrados en un medio acuoso mínimo que puede ser hecho con recetas bien establecidas de organismo fotosintéticos oxigénicos (tales como algas) medios de cultivo usando agua (agua dulce para algas de agua dulce de diseño; agua de mar para algas marinas de diseño tolerantes a la sal) y una cantidad relativamente pequeña de fertilizantes y sales minerales de bajo costo tales como bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) (o nitrato de amonio, urea, cloruro de amonio), fosfatos de potasio (K_2HPO_4 y KH_2PO_4), sulfato de magnesio heptahidrato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), cloruro de calcio (CaCl_2), sulfato de zinc heptahidrato ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sulfato de hierro (II) heptahidrato ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), y ácido bórico (H_3BO_3), entre otros. Esto es, grandes cantidades del alga de diseño (uoxifotobacterias) pueden ser crecidas a bajo costo en un corto periodo de tiempo debido a que bajo condiciones aeróbicas tales como en un charco abierto, el alga de diseño puede crecer fotoautotróficamente por sí mismas usando el CO_2 atmosférico tan rápido como las cepas parentales tipo silvestre. Esta es una característica significativa (beneficio) de la invención que puede proveer una solución costo-efectiva en la generación de biocatalizador fotoactivos (los organismos fotosintéticos de diseño productores de biocombustibles tales como algas u oxifotobacterias de diseño) para la producción de energía solar renovable.

De acuerdo a una de varias representaciones, cuando un cultivo de un organismo fotosintético de diseño es crecido y está listo para la producción para la producción fotobiológica de butanol y/o alcoholes superiores relacionados, las células del organismo fotosintético de diseño son entonces inducidas para expresar las vías fotosintéticas mejoradas-dependientes de NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin para la producción fotobiológica de butanol y/o alcoholes superiores relacionados a partir de dióxido de carbono y agua. El método de inducción es específico para el gen (o genes) de diseño. Por ejemplo, si cuando un promotor *nirA* es usado para controlar el gen (o genes) de la vía canalizada con el ciclo de Calvin tales como los de las SEQ ID NOS: 58–69 y 72 (y/o 73) que representan un *Thermosynechococcus* transgénico de diseño que incluye los genes de diseño de las vías fotosintéticas dependientes de NADPH mejoradas, canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato (numeradas como **34**, **35**, **03–05**, **36–42**, y **12** en la Figura 4) para la producción fotobiológica de 1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua, el transgenic

Thermosynechococcus transgénico de diseño es crecido en un medio de cultivo líquido mínimo que contiene amonio (pero no nitrato) y otros nutrientes inorgánicos. Cuando el cultivo de *Thermosynechococcus* transgénico de diseño ha crecido y está listo para la producción del biocombustible butanol, se agrega el fertilizante nitrato al medio de cultivo para inducir la expresión de los genes de diseño controlados por el promotor *nirA* de las vías canalizadas con el ciclo de Calvin para la producción fotobiológica de 1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua.

Para el organismo (u organismos) fotosintético de diseño con vías controladas por promotores anaeróbicos tales como los *Nostoc* transgénicos de diseño que contienen los genes de diseño controlados por el promotor *hox* para vías fotosintéticas dependientes de NADPH mejoradas, canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato de SEQ ID NOS. 104–109, se pueden usar condiciones anaeróbicas para inducir la expresión del gen (o genes) de diseño para las vías de producción fotobiológica de 2-metil-1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua (Figura 5). Esto es, cuando un cultivo de *Nostoc* transgénicos de diseño es crecido y está listo para la producción fotobiológica de biocombustibles, sus células son luego colocadas (o selladas) bajo ciertas condiciones anaeróbicas para inducir la expresión de los genes de diseño controlados por *hox* para la producción fotobiológica de 2-metil-1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua.

Para aquellos organismos fotosintéticos de diseño que contienen un promotor de respuesta a la luz y calor y vías controladas por un promotor *nirA* tales como *Prochlorococcus* transgénicos de diseño que contienen un conjunto de vías fotosintéticas dependientes de NADPH mejoradas, canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato controladas por los promotores *groE* y *nirA* de las SEQ ID NOS. 110–118, se usa luz y calor en combinación con el uso de nitrato para inducir la expresión de los genes de las vías de producción fotobiológica de isobutanol a partir de dióxido de carbono y agua.

De acuerdo a otra representación, el uso de un alga marina de diseño o una oxifotobacteria marina permite el agua de mar (salada) para la producción fotobiológica de biocombustibles sin el requerimiento de agua dulce o un suelo agrícola. Por ejemplo, un *Prochlorococcus marinus* de diseño que contiene los genes de diseño de SEQ ID NOS: 110–117 y 119–122 puede usar agua de mar y/o aguas subterráneas

para el crecimiento fotoautotrófico y síntesis de 3-metil-1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua con las vías de diseño controladas por el promotor *groE* y canalizadas con el ciclo de Calvin (identificada como **34** (nativa), **35**, **03–05**, **53–55**, **38–40**, **42** y **57** en la Figura 6). Los organismos fotosintéticos de diseño pueden ser usados también en un fotobiorreactor sellado el que opera en un desierto para la producción de isobutanol con una alta eficiencia de uso del agua que la pérdida de agua por evaporación y/o transpiración será mínima o nula comparado con lo que sucedería en un sistema abierto. Esto significa que esta representación puede representar a nueva tecnología de generación de energía renovable (butanol y alcoholes superiores relacionados) sin el requerimiento de tierra arable o fuentes de agua dulce.

De acuerdo a ciertas representaciones, el uso de oxifotobacterias de diseño que fijan nitrógeno permite la producción fotobiológica de biocombustibles sin el requerimiento de un fertilizante de nitrato. Por ejemplo, las *Nostoc* transgénicas de diseño que contienen genes controlados por el promotor *hox* de SEQ ID NOS.104–109 es capaz de tanto fijar nitrógeno (N_2) y producir fotobiológicamente 2-metil-1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua (Figura 6). Por lo tanto, el uso de *Nostoc* transgénicas de diseño permite el crecimiento fotoautotrófico y la síntesis de 2-metil-1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua.

Algunas oxifotobacterias son diseñadas para realizar múltiples funciones. Por ejemplo, las *Cyanothece* transgénicas de diseño contienen genes de diseños controlados por el promotor *nirA* de SEQ ID NOS. 123–127 son capaces de (1) usar agua de mar, (2) fijar N_2 , y (3) producir fotobiológicamente 1-hexanol a partir de dióxido de carbono y agua (Figura 8). El uso de este tipo de oxifotobacterias de diseño permite la producción fotobiológica de biocombustibles avanzados tales como 1-hexanol usando agua de mar sin el requerimiento de un fertilizante de nitrato.

De acuerdo a una de varias representaciones, un método para la producción fotobiológica y recolección de butanol y alcoholes superiores relacionados incluye: a) introducir un organismo fotosintético de diseño a un sistema de biorreactor fotobiológico, el organismo fotosintético de diseño expresa un conjunto de enzimas configuradas para actuar en un producto intermediario del ciclo de Calvin y convertir este intermediario en butanol y alcoholes superiores relacionados; b) usar el poder reductor y la energía asociada al organismo fotosintético de diseño adquirido de

la división fotosintética del agua y el gradiente de protones acoplado al proceso de transporte de electrones en el fotobiorreactor para sintetizar butanol y alcoholes superiores relacionados a partir de dióxido de carbono y agua; yc) usar un proceso de separación de producto para recolectar el butanol y/o alcoholes superiores relacionados sintetizados en el biorreactor.

En resumen, existe un número de representaciones de como organismos de diseño pueden ser usados para la producción fotobiológica de butanol (y/o alcoholes superiores relacionados). Una de las representaciones preferidas es de organismos de diseño para la producción directa de butanol a partir de CO_2 y H_2O con un reactor fotobiológico y la recolección de butanol usando un sistema de filtración y/o destilación/evaporación, el que incluye un proceso operacional específico descrito en una serie de pasos: a) Crecer un organismo transgénico de diseño en un medio de cultivo mínimo usando CO_2 atmosférico como la fuente de carbono bajo condiciones aeróbicas (normales) antes de inducir la expresión de los genes de las vías de diseño productoras de butanol; b) Cuando el organismo de diseño es crecido y está listo para la producción de butanol, sellar o poner el organismo de diseño en una condición especial para la inducir la expresión de genes de diseño canalizados con el ciclo de Calvin; c) Cuando las enzimas de las vías de diseño se expresan, suministrar energía de luz visible tal como luz solar para que las células con los genes de diseño expresados operen como catalizadores para la producción fotosintética de butanol y/o alcoholes superiores relacionados a partir de CO_2 y H_2O ; d) Recolectar el producto butanol y/o alcoholes superiores relacionados por cualquier método conocido por aquellos con habilidades en el arte. Por ejemplo, recolectando el butanol y/o alcoholes superiores relacionados del reactor fotobiológico puede ser logrado por una combinación de técnicas filtración y destilación/evaporación.

El proceso anterior para usar organismos de diseño para la producción fotosintética y la recolección de butanol y/o alcoholes superiores relacionados puede ser repetido para una pluralidad de ciclos operacionales para lograr resultados más deseados. Cualquiera de los pasos a) hasta d) de este proceso descrito más arriba puede ser también ajustado de acuerdo a que la invención se ajuste a condiciones específicas. En la práctica, cualquiera de los pasos a) hasta d) del proceso puede ser aplicado totalmente o en parte, y/o puede ser ajustado en cualquier combinación para la

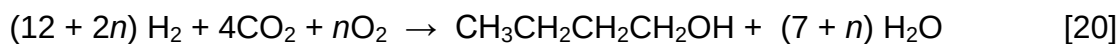
producción fotobiológica mejorada de de butanol y/o alcoholes superiores relacionados de acuerdo a esta invención.

Además de la producción de butanol y/o alcoholes superiores relacionados, también es posible usar un organismo de diseño con sus vías de producción de butanol de diseño para producir ciertos productos intermediarios de las vías de diseño canalizadas con el ciclo de Calvin (Figs. 1 y 4–10) incluyendo (pero no limitado a): butiraldehído, butiril-CoA, crotonil-CoA, 3-hidroxibutiril-CoA, acetoacetyl-CoA, acetyl-CoA, piruvato, fosfoenolpiruvato, 2-fosfoglicerato, 1,3-difosfoglicerato, gliceraldehído-3-fosfato, dihidroxiacetonafofosfato, fructosa-1,6-difosfato, fructosa-6-fosfato, glucosa-6-fosfato, glucosa, glucosa-1-fosfato, citromalato, citraconato, metil-D-malato, 2-cetobutirato, 2-cetovalerato, oxaloacetato, aspartato, homoserina, treonina, 2-ceto-3-metilvalerato, 2-metilbutiraldehído, 3-metilbutiraldehído, 4-metil-2-oxopentanoato, 3-isopropilmalato, 2-isopropilmalato, 2-oxoisovalerato, 2,3-dihidroxi-isovalerato, 2-acetolactato, isobutiraldehído, 3-ceto-C6-acil-CoA, 3-hidroxi-C6-acil-CoA, C6-enoil-CoA, C6-acil-CoA, 3-ceto-C8-acil-CoA, 3-hydroxy-C8-acyl-CoA, C8-enoil-CoA, C8-acil-CoA, octanal, 1-pentanol, 1-hexanal, 1-heptanal, 2-cetohexanoato, 2-cetoheptanoato, 2-cetooctanoato, 2-etilmalato, 3-etilmalato, 3-metil-1-pentanal, 4-metil-1-hexanal, 5-metil-1-heptanal, 2-hidroxi-2-etil-3-oxobutanoate, 2,3-dihidroxi-3-metil-pentanoati, 2-ceto-4-metil-hexanoato, 2-ceto-5-metil-heptanoato, 2-ceto-6-metil-octanoato, 4-metil-1-pentanal, 5-metil-1-hexanal, 6-metil-1-heptanal, 2-ceto-7-metil-octanoato, 2-ceto-6-metil-heptanoato, y 2-ceto-5-metil-hexanoato. De acuerdo a una de varias representaciones, por lo tanto, una representación adicional incluye un paso adicional de recolectar los productos intermediarios que pueden ser producidos también a partir de un organismo transgénico inducido. La producción de un producto intermediario puede ser selectivamente mejorada al apagar la actividad de la enzima de diseño que catalizan su consumo en las vías de diseño. La producción de dicho producto intermediario puede ser mejorada puede ser también mejorada mediante el uso de un organismo de diseño con algunas de las enzimas de diseño omitidas de las vías de producción de butanol. Por ejemplo, un organismo de diseño con labutanol Deshidrogenasa o la butiraldehído Deshidrogenasa omitida de la vía de diseño de la Figura 1 puede ser usada para producir butiraldehído o butiril-CoA, respectivamente.

Vías Hidrogenotróficas de Diseño Canalizadas con el Ciclo de Calvin para la Producción Aeróbica Hidrogenotrófica de Biocombustibles

De acuerdo a una de varias representaciones, una tecnología hidrogenotrófica canalizada con el ciclo de Calvin (Fig. 11) es creada de manera tal que toma hidrógeno (H_2), oxígeno (O_2) y dióxido de carbono (CO_2) para producir biocombustibles avanzados y alcoholes superiores relacionados a través de las de diseño canalizadas con el ciclo de Calvin (Fig. 1 y 4–10). Como se ilustra en la Fig. 11, una de varias representaciones acá es la expresión de hidrogenasas de diseño tolerantes al oxígeno (O_2) en una célula microbial de diseño tal como una cianobacteria para generar NAD(P)H y ATP a partir del consumo de hidrógeno. La expresión de una hidrogenasa unida a membrana (MBH, **70**) y sus proteínas accesorias **72** como se listan en la Tabla 1) permite la oxidación del H_2 a través de la cadena transportadora de electrones (ETC) para bombear protones (H^+) a través de la membrana citoplasmática para crear el potencial electromecánico transmembrana para la síntesis de ATP; mientras que el uso de una hidrogenasa soluble (SH, **71**) y sus proteínas accesorias **72**) permite la generación de NAD(P)H a través de la reducción de SH mediada por NAD(P) $^+$ por H_2 . El uso de ATP y NAD(P)H alimenta a las vías de diseño canalizadas con el ciclo de Calvin (Fig. 1 y 4-10) para la fijación de CO_2 y la producción del biocombustible butanol y alcoholes superiores relacionados. Por lo tanto, representa una aplicación innovativa de las vías de diseño. Por lo tanto, esto representa una aplicación innovativa de las vías de diseño canalizadas con el ciclo de Calvin.

Por ejemplo, la expresión de una hidrogenasa unida a membrana (MBH, **70** y sus proteínas accesorias **72**) y una hidrogenasa soluble (SH, **71** y sus proteínas accesorias **72**) en una cianobacteria transgénica de diseño que contiene los genes de diseño de producción de butanol de SEQ ID NOS: 58–69 y 72 (y/o 73) pueden crear una vía de producción de diseño canalizada con el ciclo de Calvin y derivada de 3-fosfoglicerato para la producción de butanol como en los números **34**, **35**, **03–05**, **36–42**, y **12** en La Figura 4. El resultado neto de la vía hidrogenotrófica de diseño es la producción de 1-butanol ($CH_3CH_2CH_2CH_2OH$) a partir (H_2), dióxido de carbono (CO_2) y oxígeno (O_2) de acuerdo a la siguiente reacción:



El número (n) de moléculas de oxígeno (O_2) usadas para oxidar hidrógeno (H_2) por la fosforilación acoplada al transporte respiratorio de electrones que permite la síntesis de 1-butanol fue estimado de ser alrededor de 5 en este ejemplo.

Nótese, antes que se activen los genes de diseño, la cianobacteria transgénica (Fig 11) puede crecer fotoautotróficamente usando CO_2 , H_2O y luz solar tal como las cepas parentales tipo silvestre. Cuando han crecido y están listas para uso, pueden ser colocadas en un biorreactor suplementado con H_2 (alrededor de un 85%) y CO_2 (alrededor de un 10%) con una cantidad limitante de O_2 (alrededor de un 5 %) para la síntesis hidrogenotrófica de alcoholes superiores tal como 1-butanol, por ejemplo, a través de la producción de butanol canalizada con el ciclo de Calvin de la Fig. 1 sin el requerimiento de fotosíntesis o luz solar. Debido a que el hidrógeno (H_2) puede ser hecho a partir de una cantidad de fuentes incluyendo la electrólisis de agua, la tecnología de diseño hidrogenotrófica canalizada con el ciclo de Calvin (Fig. 11) permite la utilización de CO_2 industrial de bajo costo y la electricidad de celdas fotovoltaicas solares, de viento o estaciones nucleares para combustible transportable líquido listo para su uso tal como butanol sin requerir ningún terreno arable o fotosíntesis.

Vías de Diseño Anaeróbicas Hidrogenotróficas Reductoras de Acetil-CoA para la Producción de Biocombustibles

De acuerdo a una de varias representaciones, una tecnología para vías de diseño anaeróbicas hidrogenotróficas reductoras de Acetil-CoA para la producción de biocombustibles (Fig. 12) es creada de manera tal que toma hidrógeno (H_2) y dióxido de carbono (CO_2) para producir biocombustibles avanzados tales butanol y alcoholes superiores relacionados bajo condiciones anaeróbicas. Como se ilustra en la Fig. 12, una de las varias representaciones aquí es la expresión de un conjunto de genes que confieren un sistema hidrogenotrófico anaeróbico y reductor de Acetil-CoA para una vía de producción de butanol (Fig. 13) en una célula huésped microbial tal como una cianobacteria. Los sistemas hidrogenotróficos anaeróbicos de diseño incluyen, por ejemplo, una hidrogenasa convertidora de energía (Ech, **91** en la Tabla1), [NiFe]-hidrogenasa Mvh (**95**), hidrogenasa reductora de Coenzima F_{420} (Frh, **96**), hidrogenasa soluble nativa (o heteróloga) (SH, **71**), ferredoxina reducida por NAD(P)H, (Fd_{red}^{2-}), HS-

CoM, HS-CoB, yheterodisulfuro reductasa (Hdr; **94**); mientras que las enzimas de la vía reductora de acetil-CoA butanol (como se muestra con las etiquetas numéricas **83–90** y **07–12/43** en la Fig. 13) incluyen formilmetanofurano Deshidrogenasa **83**, formil transferasa **84**, 10-metenil-tetrahidrometanopterina ciclohidrolasa**85**, 10-metilen-H₄ metanopterina Deshidrogenasa **86**, 10-metilen-H₄-metanopterina reductasa **87**, metil-H₄-metanopterina: proteína corrinoidehierro-sulfuometiltransferasa **88**, proteína corrinoidehierro-sulfuro **89**, CO Deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa **90**, tiolasa **07**, 3-hidroxibutiril-CoA Deshidrogenasa **08**, crotonasa **09**, butiril-CoA Deshidrogenasa **10**, butialdehído Deshidrogenasa **11**, butanol Deshidrogenasa **12**, y/o alcohol Deshidrogenasa **43**. En este ejemplo, el resultado neto de la vía de diseño anaeróbica hidrogenotrófica Acetil-CoA-reductora de producción de butanol (Figs. 12 y 13) es la producción de 1-butanol (CH₃CH₂CH₂CH₂OH) a partir de hidrogeno (H₂) ydióxido de carbono (CO₂) de acuerdo a la siguiente reacción:



El cambio en la energía libre estándar ($\Delta_r G^0$) en esta reacción es -244,7 kJ/mol 1-butanol, lo que demuestra que esta tecnología de producción de butanol dependiente de hidrógeno no rompe las leyes termodinámicas. Esta ecuación muestra que el uso de 12 moléculas (24 electrones) dehidrógeno (H₂) puede producir una molécula de 1-butanol a partir de 4 moléculas de dióxido de carbono (CO₂).Para producir 12 moléculas de H₂ por electrólisis de agua, se usan 24 electrones de electricidad. Por lo tanto, si la electrólisis del agua es usada como una fuente de hidrógeno, entonces los 24 electrones (de electricidad) son suficientes para generar una molécula de 1-butanol a partir de 4 moléculas de CO₂a través de la tecnología de vías de diseño anaeróbica hidrogenotrófica reductora-de-acetil-CoA para la producciónde butanol (Figs. 12 y 13). Por lo tanto, en una de varias representaciones, un organismo autotrófico de diseño incluye un conjunto de genes de diseño (p.ej., constructos de ADN de diseño) que expresan un conjunto de enzimas que confieren el sistema de vías anaeróbica hidrogenotróficas de producción de butanol (como se muestra en las Figs. 12 y 13)que incluyen: hidrogenasa convertidorade energía (Ech) **91**, [NiFe]-hidrogenasa (Mvh) **95**, hidrogenasa reductora Coenzima F₄₂₀ (Frh) **96**, hidrogenasa soluble nativa (o heteróloga) (SH) **71**, heterodisulfuro reductasa (Hdr) **94**, formilmetanofurano

Deshidrogenasa **83**, formil transferasa **84**, 10-metenil-tetrahidrometanopterin ciclohidrolasa **85**, 10-metilen- H_4 metanopterin Deshidrogenasa **86**, 10-metilen- H_4 -metanopterin reductasa **87**, metil- H_4 -metanopterin: proteína corrinoidehierro-sulfuro metiltransferasa **88** proteína corrinoidehierro-sulfuro **89**, CO Deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa **90**, tiolasa **07**, 3-hidroxibutiril-CoA Deshidrogenasa **08**, crotonasa **09**, butiril-CoA Deshidrogenasa **10**, butialdehído Deshidrogenasa **11**, butanol Deshidrogenasa **12**y/o alcohol Deshidrogenasa **43**.

Antes que se activen los genes de diseño, la cianobacteria transgénica (Fig 12) puede crecer fotoautotróficamente usando CO_2 , H_2O y luz solar tal como las cepas parentales tipo silvestre. Cuando han crecido y están listas para uso, pueden ser colocadas en un biorreactor para la producción de butanol a partir de H_2 y CO_2 bajo condiciones anaeróbicas sin requerir fotosíntesis o cualquier oxidación respiratoria de H_2 por oxígeno molecular (O_2). Una característica única de esta vía de diseño reductora de acetil-CoA productora de butanol (Fig. 13) es que no requiere ningún ATP; esta vía usa ferredoxina reducida (Fd_{red}^{2-}), $F_{420}H_2$ y NAD(P)H que el sistema anaeróbico hidrogenotrófico de diseño (Fig. 12) puede suministrar a partir de H_2 empleando ciertos mecanismos bifurcados de la bioenergética del acoplamiento protón-electrón. De acuerdo a una de varias representaciones, la vía de diseño (Fig 13) representa uno de los procesos de producción de butanol más eficientes identificados hasta ahora. El cambio en la energía libre estándar (ΔG^0) de este proceso anaeróbico hidrogenotrófico productor de butanol [Eq. 21] es -20,4 kJ/mol por H_2 usado. La eficiencia máxima de la conversión de energía hidrógeno (H_2)-a-butanol fue estimada de ser alrededor de un 91,4%.

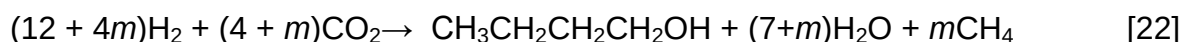
De acuerdo a una de varias representaciones, otra vía de diseño anaeróbica reductora de acetil-CoA de producción de butanol (como se muestra con las etiquetas numéricas **74–81** y **07– 12/43** en La Figura 14) es creada de manera tal que puede producir 1-butanol a partir de H_2 y CO_2 a través del uso de un conjunto de enzimas que incluye: formiato Deshidrogenasa **74**, 10-formil- H_4 folatosintetasa **75**, meteniltetrahidrofolato ciclohidrolasa **76**, 10-metilene- H_4 folato Deshidrogenasa **77**, 10-metilen- H_4 folato reductasa **78**, metil- H_4 folato: proteína corrinoidehierro-sulfuometiltransferasa **79**, proteína corrinoidehierro-sulfuro **80**, CO Deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa **81**, tiolasa **07**, 3-hidroxibutiril-CoA Deshidrogenasa **08**, Crotonasa **09**, butiril-CoA Deshidrogenasa

10, butialdehído Deshidrogenasa **11**, butanol Deshidrogenasa **12**, y/o alcohol Deshidrogenasa **43**.

Esta vía de diseño es similar a la de la Fig. 13, excepto que requiere el consumo de ATP en el paso de 10-formil-H₄ folatosintetasa **75** (Fig. 14). Por lo tanto, requiere un suministro de ATP de otros procesos celulares en orden de operar. De acuerdo a una de varias representaciones, esta vía (Fig. 14) puede ser sostenida por un sistema de diseño metanogénico hidrogenotrófico (Fig. 15) que produce ATP, Fd_{red}^{2-} , $F_{420}H_2$, y NAD(P)H. Este organismo autotrófico de diseño incluye un conjunto de genes de diseño (p.ej., constructos de ADN de diseño) que expresan el sistema de diseño metanogénico hidrogenotrófico de producción de butanol (como se muestra en las Figs. 14 y 16) incluyendo: metil-H₄ MPT: Coenzima-M metiltransferasa Mtr **92**, A₁A₀-ATP sintasa nativa (o heteróloga) **97**, metil-Coenzima M reductasa Mcr **93**, hidrogenasa convertidora de energía (Ech) **91**, [NiFe]-hidrogenasa (Mvh) **95**, hidrogenasa reductora Coenzima F₄₂₀ (Frh) **96**, hidrogenasa soluble nativa (o heteróloga) (SH) **71**, heterodisulfuroreductasa (Hdr) **94**, formilmetanofurano Deshidrogenasa **83**, formil transferasa **84**, 10-metenil-tetrahidrometanopterina ciclohidrolasa **85**, 10-metilen-H₄metanopterina Deshidrogenasa **86**, 10-metilen-H₄-metanopterina reductasa **87**, metil-H₄-metanopterina: proteína corrinoidehierro-sulfuro metiltransferasa **88**, proteína corrinoidehierro-sulfuro **89**, CO Deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa **90**, tiolasa **07**, 3-hidroxbutiril-CoA Deshidrogenasa **08**, Crotonasa **09**, butiril-CoA Deshidrogenasa **10**, butialdehído Deshidrogenasa **11**, butanol Deshidrogenasa **12** y/o alcohol Deshidrogenasa **43**.

Por ejemplo, el sistema metanogénico hidrogenotrófico de diseño (Fig. 15) incluye metil-H₄MPT: Coenzima-M metiltransferasa Mtr **92**, A₁A₀-ATP sintasa **97**, hidrogenasa convertidora de energía (Ech; **91** en Tabla1), [NiFe]-hidrogenasa Mvh (**95**), hidrogenasa reductora Coenzima F₄₂₀ (Frh, **96**), hidrogenasa soluble nativa (o heteróloga) (SH, **71**), ferredoxina reducida NAD(P)H, (Fd_{red}^{2-}), HS-CoM, HS-CoM, metil-Coenzima M reductasa Mcr **93**, yheterodisulfuroreductasa (Hdr, **94**). La Mtr **92** en este sistema puede tomar una fracción del intermediario CH₃-H₄MPT para producir metano y generar un potencial electroquímico transmembrana para la síntesis de ATP, el que puede sostener la vía anaeróbica reductora de acetil-CoA de producción de butanol y dependiente de ATP de la Fig. 14. Por lo tanto, la combinación del sistema

metanogénico hidrogenotrófico (Fig. 15) y la vía anaeróbica reductora de acetil-CoA de producción de butanol y dependiente de ATP (Fig. 14) resulta en una vía combinada (Fig. 16) para la producción de butanol y metano. El resultado neto es la producción de butanol y metano (CH₄) a partir de hidrógeno (H₂) y dióxido de carbono (CO₂) de acuerdo a la siguiente reacción de proceso en donde *m* es el número de moléculas de CH₄ co-generadas por 1-butanol producido:



La vía anaeróbica reductora acetil-CoA productora de butanol que no requiere (Fig. 13) puede, por supuesto, también operar con este sistema de diseño metanogénico hidrogenotrófico (Fig. 15), resultando en otra vía combinada para la producción de tanto butanol como metano (Fig. 17). Por lo tanto, en una de varias representaciones, un organismo autotrófico de diseño incluye un conjunto de genes de diseño (e.g., constructos de ADN de diseño) que expresa un sistema de diseño metanogénico hidrogenotrófico de producción de butanol (como se muestra en las Figs. 15, 13, y 17) que incluye: metil-H₄MPT: Coenzima-M metiltransferasa Mtr **92**, A₁A₀-ATP sintasa nativa (o heteróloga) **97**, metil-Coenzima M reductasa Mcr **93**, hidrogenasa convertidora de energía (Ech) **91**, [NiFe]-hidrogenasa (Mvh) **95**, hidrogenasa reductora Coenzima F₄₂₀ (Frh) (Frh) **96**, hidrogenasa soluble nativa (o heteróloga) (SH)**71**, heterodisulfuroreductasa (Hdr) **94**, formato Deshidrogenasa **74**, 10-formil-H₄ folatosintetasa **75**, meteniltetrahidrofolato ciclohidrolase **76**, 10-metilen-H₄folato Deshidrogenasa **77**, 10-metilen-H₄folato reductasa **78**, metil-H₄folato: proteína corrinoidehierro-sulfuro metiltransferasa **79**, proteína corrinoidehierro-sulfuro **80**, CO Deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa **81**, tiolasa **073**-hidroxibutiril-CoA Deshidrogenasa **08**, Crotonasa **09**, butiril-CoA Deshidrogenasa **10**, butialdehído Deshidrogenasa **11**, butanol Deshidrogenasa **12**, y/o alcohol Deshidrogenasa **43**.

Algunas de enzimas pueden existir naturalmente en algunos de los organismos huéspedes dependiendo de su contenido genético; algunas de estas enzimas pueden ser usadas en la construcción de parte de las vías de diseño (Figs. 12–17) junto con los genes de diseño. Por lo tanto, de acuerdo a una de varias representaciones, un organismo autotrófico de diseño para la producción de biocombustibles tal como butanol a través de vías de diseño anaeróbicas hidrogenotróficas reductoras de acetil-

CoA de producción de biocombustibles incluyen genes que pueden expresar al menos una de las enzimas seleccionadas del grupo consistente en: hidrogenasa convertidora de energía (Ech) **91**, metil-H₄MPT: Coenzima-M metiltransferasa Mtr **92**, metil-Coenzima M reductasa Mcr **93**, heterodisulfuroreductasa (Hdr) **94**, [NiFe]-hidrogenasa (Mvh) **95**, hidrogenasa reductora Coenzima F₄₂₀ (Frh) **96**, hidrogenasa soluble (SH) **71**, A₁A₀-ATP sintasa **97**, formatoDeshidrogenasa **74**, 10-formil-H₄ folatosintetasa **75**, meteniltetrahidrofolato ciclohidrolasa **76**, 10-metilene-H₄folato Deshidrogenasa **77**, 10-metilen-H₄folatoreductasa **78**, metil-H₄folato: proteína corrinoidehierro-sulfuro metiltransferasa **79**, proteína corrinoidehierro-sulfuro **80**, CO Deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa **81**, formilmetanofuranoDeshidrogenasa **83**, formil transferasa **84**, 10-metenil-tetrahidrometanopterina ciclohidrolasa **85**, 10-metilene-H₄metanopterina Deshidrogenasa **86**, 10-metilene-H₄-metanopterinareductasa **87**, 10-metilen-H₄metanopterina Deshidrogenasa **88**, proteína corrinoidehierro-sulfuro **89**, CO Deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa **90**, tiolasa **07**, 3-hidroxibutiril-CoA Deshidrogenasa **08**, crotonasa **09**, butiril-CoA Deshidrogenasa **10**, butialdehídoDeshidrogenasa **11**, butanol Deshidrogenasa **12** y/o alcohol Deshidrogenasa **43**.

La SEQ ID NOS. 166–198 presenta ejemplos de constructos de ADN de diseño de enzimas de diseño para la creación de organismos de diseño hidrogenotróficos productores de biocombustibles tales como cianobacterias de diseño con vías reductoras de acetil-CoA para la producción de biocombustibles. Brevemente, la SEQ ID NO: 166 presenta el ejemplo 166 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la FormilmetanofuranoDeshidrogenasa (Fmd; **83**) (6110 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–5659) seleccionada/modificada de las subunidades B, C, E de la formilmetanofurano Deshidrogenasa (GenBank: ADL58895, ADL58894, ADL58893) de *Methanothermobacter marburgensis* y de las subunidades A, D, y G de la formilmetanofurano Deshidrogenasa (GenBank: ABC56660, ABC56658, ABC56657) de *Methanosphaera stadtmanae*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* sp. cepa PCC 7120(5659–6090), y un partidor PCR RE (6091–6110) en el extremo 3'.

La SEQ ID NO: 167 presenta el ejemplo 167 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Formil transferasa (**84**) (1538 pb) que incluye un

partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1086) seleccionada/modificada de la secuencia de la formilmetanofurano-tetrahidrometanopterin formiltransferasa (GenBank: ADL59225) de *Methanothermobacter marburgensis*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (1087–1518), y un partidor PCR RE (1519–1538).

La SEQ ID NO: 168 presenta el ejemplo 168 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la 5,10-Metenil-tetrahidrometanopterin (H_4 metanopterin) ciclohidrolasa (**85**) (1631 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1179) seleccionada de la secuencia de la N(5),N(10)-meteniltetrahidrometanopterin ciclohidrolasa (GenBank: ABC57615) de *Methanosphaera stadtmanae*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (1180–1161), y un partidor PCR RE (1162–1631) .

La SEQ ID NO: 169 presenta el ejemplo 169 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la 5,10-Metilen- H_4 -metanopterin Deshidrogenasa (**86**) (1475 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1023) seleccionada de la secuencia de la metilen-5,6,7,8-tetrahidrometanopterin Deshidrogenasa dependiente de F_{420} (GenBank: ADL57660) de *Methanothermobacter marburgensis*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (1023–1455), y un partidor PCR RE (1456–1475).

La SEQ ID NO: 170 presenta el ejemplo 170 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Metilenetetrofolato reductasa y/o Metileno- H_4 -metanopterin reductasa (**78, 87**) (2594 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–2142) seleccionada/modificada de la secuencia de la metilenetetrofolato reductasa (GenBank: YP_430048) de *Moorella thermoacetica* y de N(5),N(10)-meteniltetrahidrometanopterin reductasa dependiente de Coenzima F_{420} (GenBank: ADN36752) de *Methanoplanus petrolearius*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (2143–2574), y un partidor PCR RE (2575–2594).

La SEQ ID NO: 171 presenta el ejemplo 171 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Metiltetrahidrofolato: proteína corrinoidehierro-sulfuro metiltransferasa (**79, 88**) (2819 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–2467) seleccionada/modificada de la secuencia de la Metiltetrahidrofolato: proteína corrinoidehierro-sulfuro metiltransferasa (GenBank: YP_430950) de *Moorella thermoacetica*, y la subunidad gama de la acetil-CoA decarboxilasa/sintas, (GenBank: ADL57900) de *Methanothermobacter marburgensis*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (2468–2899), y un partidor PCR RE(2900–2819).

La SEQ ID NO: 172 presenta el ejemplo 172 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la proteína corrinoidehierro-sulfuro (**80, 89**) (2771 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–2319) seleccionada/modificada de la secuencia de la subunidad pequeña de la proteína corrinoidehierro-sulfuro (GenBank: AAA23255) de *Moorella thermoacetica*, y la subunidad delta de la acetil-CoA decarboxilasa/sintasa (GenBank: ADL57899) de *Methanothermobacter marburgensis*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (2319–2751), y un partidor PCR RE(2752–2771).

La SEQ ID NO: 173 presenta el ejemplo 173 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la CO Deshidrogenasa /acetil-CoA sintasa (**81, 90**) (7061 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–6609) seleccionada/modificada de la secuencia de la subunidad beta de la of acetil-CoA decarboxilasa/sintasa y de la subunidad alfa de la acetil-CoA decarboxilasa/sintasa (GenBank: ABC19516) de *Moorella thermoacetica*, y las subunidades alfa, beta, épsilon de la acetil-CoA decarboxilasa/sintasa, (GenBank: ADL57895, ADL59006, ADL57897) de *Methanothermobacter marburgensis*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (6610–7041), y un partidor PCR RE(7042–7061).

La SEQ ID NO: 174 presenta el ejemplo 174 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Tiolasa (**07**) (1847 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC

7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1395) seleccionada/modificada de la secuencia de la Tiolasa (GenBank: AB190764) de *Butyrivibrio fibrisolvens*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (1396–1827), y un partidor PCR RE(1828–1847).

La SEQ ID NO: 175 presenta el ejemplo 175 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la 3-Hidroxibutiril-CoA Deshidrogenasa (**08**) (1514 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1062) seleccionada/modificada de la secuencia de la 3-Hidroxibutiril Coenzima A Deshidrogenasa (GenBank: Z92974) de *Thermoanaerobacterium*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc*(1063–1494), y un partidor PCR RE (1495–1514).

La SEQ ID NO: 176 presenta el ejemplo 176 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Crotonasa (**09**) (1430 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–978) seleccionada de la secuencia de la Crotonasa (GenBank: AF494018) de *Clostridium beijerinckii*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (979–1410), y un partidor PCR RE (1411–1430).

La SEQ ID NO: 177 presenta el ejemplo 177 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Butiril-CoA Deshidrogenasa (**10**) (1784 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1332) seleccionada/modificada de la secuencia de la Butiril-CoA Deshidrogenasa (GenBank: AF494018) de *Clostridium beijerinckii*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (1333–1764), y un partidor PCR RE (1765–1784).

La SEQ ID NO: 178 presenta el ejemplo 178 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Butiraldehído Deshidrogenasa (**11**) (2051 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1599) seleccionada/modificada de la secuencia de Butiraldehído Deshidrogenasa (GenBank: AY251646) de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (1600–2031) y un partidor PCR RE(2032–2051).

La SEQ ID NO: 179 presenta el ejemplo 179 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Butanol Deshidrogenasa dependiente de NADH (**12**) (1808 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1356) seleccionada/modificada de la secuencia de la butanol Deshidrogenasa dependiente de NADH (GenBank: YP_148778) de *Geobacillus kaustophilus*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (1367–1788), y un partidor PCR RE (1789–1808) en el extremo 3’.

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS. 166–179 en la transformación genética de un organismo huésped microbioal incluyendo (pero no limitado a) células bacteriales tales como las de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 puede crear cianobacterias de diseño tales como *Anabaena* de diseño con vías de diseño reductoras de acetil-CoA productoras de biocombustibles (numeradas como **83–90** y **07–12** en La Figura 13) para la producción de 1-butanol a partir de hidrógeno y dióxido de carbono sin el requerimiento de fotosíntesis o luz solar. Esto es, la expresión de las SEQ ID NOS. 166–179 en una bacteria tal como *Anabaena* PCC 7120 representa un organismo de diseño con las vías de diseño hidrogenotróficas reductoras de acetil-CoA para la producción de biocombustibles (**83–90** y **07–12** en La Figura 13) que pueden operar para la producción anaeróbica quimiolitotrófica de butanol a partir de hidrógeno y dióxido de carbono aunque se encuentre en completa oscuridad.

La SEQ ID NO: 180 presenta el ejemplo 180 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la hidrogenasa convertidora de energía (Ech) (**91**) (10538 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–10086) seleccionada/modificada de la secuencia de las subunidades de la hidrogenasa convertidora de energía (EchA, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q) (GenBank: ABC57807, y ABC57812–ABC57827) de *Methanospaera stadtmanae* DSM 3091, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (10087–10518), y un partidor PCR RE (10519–10538).

La SEQ ID NO: 181 presenta el ejemplo 181 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la [NiFe]-hidrogenasa MvhADG (**95**) (3416 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc*

(*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–2964) seleccionada/modificada de la secuencia de la [NiFe]-hidrogenasa MvhADG (GenBank: ADL59096, ADL59098, ADL59097) de *Methanothermobacter marburgensis*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (2965–3396), y un partidor PCR RE (3397–3416).

La SEQ ID NO: 182 presenta el ejemplo 182 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para las Heterodisulfuroreductasas (HdrABC, HdrDE) (**94**) (6695 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–6243), seleccionada/modificada de la secuencia de las Heterodisulfuro reductasas (HdrABC, HdrDE) (GenBank: AET63985, AET63982, AET63983, AET64166, AET64165) de *Methanosaeta harundinacea*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (6244–6675), y un partidor PCR RE(6676–6695).

La SEQ ID NO: 183 presenta el ejemplo 183 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la hidrogenasa reductora de Coenzima F₄₂₀(Frh) (**96**) (3407 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–2955) seleccionada/modificada de la secuencia de la hidrogenasa reductora de Coenzima F₄₂₀(FrhB1-3) (GenBank: YP_003357229, YP_003357467, YP_003357509) de *Methanocella paludicola* SANA E, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (2956–3387), y un partidor PCR RE (3388–3407) en el extremo 3'.

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS. 180–183 en la transformación genética de un organismo huésped microbial incluyendo (pero no limitado a) células bacteriales tales como las de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 puede conferir un sistema de utilización anaeróbica quimiolitioautotrófica del hidrógeno (H₂) [el que, como se muestra en la Figura 12, incluye la hidrogenasa convertidora de energía (Ech) (**91**), [NiFe]-hidrogenasa MvhADG (**95**), hidrogenasa reductora de Coenzima F₄₂₀(Frh) (**96**), e hidrogenasa reductora de Coenzima F₄₂₀(Frh) (**96**)] que puede producir el poder reductor (Fd_{red}²⁻ y F₄₂₀H₂) a partir de H₂ como soporte de las vías de diseño reductoras de acetil-CoA para la producción de butanol (**83–90** y **07–12** en la Figura 13). Por lo tanto, la expresión de las SEQ ID NOS. 180–183 junro con las SEQ ID NOS. 166–179 en una bacteria tal como *Anabaena* PCC 7120 representa un organismo de diseño (tal

como *Anabaena* de diseño) con un sistema completo de vías de diseño reductoras de acetil-CoA y productoras de biocombustibles (Figuras 12 y 13) que puede operar para la producción quimiolitotrófica anaeróbica de butanol a partir de hidrógeno y dióxido de carbono sin el requerimiento de fotosíntesis o de respiración aeróbica. El resultado neto de este ejemplo es la producción quimiolitotrófica anaeróbica de butanol a partir de hidrógeno y dióxido de carbono como se muestra en la ecuación de proceso [21].

También nótese, estos genes de diseño (SEQ ID NOS. 166–183) son controlados por un promotor anaeróbico *hox* de diseño. Por lo tanto, bajo condiciones aeróbicas tales como las de un charco abierto para el cultivo en masa, la *Anabaena* de diseño de este ejemplo puede crecer fotoautotróficamente de manera rápida usando el dióxido de carbono del aire y el agua como las fuentes de carbono y electrones tal como en las cepas parentales tipo silvestre. Cuando los cultivos celulares de *Anabaena* de diseño han crecido y están listo para su uso (como catalizadores en esta aplicación), pueden ser colocadas en un reactor anaeróbico suministrado con CO₂ y H₂ gaseoso industrial para la inducción de los genes de diseño para la producción anaeróbica quimiolitotrófica de butanol (como se muestra en las Figuras 12 y 13) en la oscuridad.

La SEQ ID NO: 184 presenta el ejemplo 184 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Metil-H4MPT: Coenzima M metiltransferasa (MtrA-H) (**92**) (5417 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–4965) seleccionada/modificada de la secuencia de la Metil-H4MPT: Coenzima M metiltransferasa (MtrA-H) (GenBank: ABC56714, ABC56713, YP_447360, YP_447354, YP_447359, YP_447355) de *Methanospaera stadtmanae*, y mtrEF (AET65445, NC_009051) de *Methanosaeta harundinacea* y *Methanoculleus marisnigri*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (4966–5397), y un partidor PCR RE(5398–5417) .

La SEQ ID NO: 185 presenta el ejemplo 185 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Metil-Coenzima M reductasa (Mcr) (**93**) (5042 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima

(193–4590) seleccionada/modificada de la secuencia de la metil Coenzima M reductasa subunidades A, B, C, G (GenBank: CAE48306, CAE48303, ABC56709, CAE48305) de *Methanosphaera stadtmanae*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (4591–5022), y un partidor PCR RE (5023–5042).

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS. 184 y 185 junto con las SEQ ID NOS. 180–183 en la transformación genética de un organismo huésped microbioal incluyendo (pero no limitado a) células bacteriales tales como las de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 puede conferir un sistema metanogénico hidrogenotrófico el cual, como se muestra en la Figura 15, incluye Metil-H4MPT: Coenzima M metiltransferasa (MtrA-H) (**92**), Metil-Coenzima M reductasa (Mcr) (**93**), hidrogenasa convertidora de energía (Ech) (**91**), [NiFe]-hidrogenasa MvhADG (**95**), hidrogenasa reductora de Coenzima F₄₂₀ (Frh) (**96**), hidrogenasa reductora de Coenzima F₄₂₀ (Frh) (**96**). Estas enzimas junto con una ATPasa nativa **97** pueden producir ATP y poder reductor (Fd_{red}²⁻ y F₄₂₀H₂) a partir de H₂ para respaldar la vía de diseño reductora de acetil-CoA metanogénica para la producción de butanol (Figuras 16 y 17). Por lo tanto, la expresión de las SEQ ID NOS. 180–185 junto con las SEQ ID NOS. 166–179 en una bacteria tal como *Anabaena* PCC 7120 representa un organismo de diseño (tal como *Anabaena* de diseño) con un sistema de vías de diseño hidrogenotróficas reductoras de acetil-CoA metanogénicas para la producción de biocombustibles (Figuras 15 y 17) que pueden operar para la producción anaeróbica de tanto butanol como metano a partir de hidrógeno y dióxido de carbono sin requerir de ninguna fotosíntesis. El resultado neto en este ejemplo es la producción anaeróbica quimiolitotrófica de butanol y metano a partir de hidrógeno y dióxido de carbono como se muestra en la ecuación de proceso [22].

La SEQ ID NO: 186 presenta el ejemplo 186 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Formiato Deshidrogenasa (**74**) (5450 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–4998) seleccionada/modificada de la secuencia de las subunidades alfa y beta de la Formiato Deshidrogenasa (GenBank: AAB18330, AAB18329) de *Moorella thermoacetica*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (4999–5430), y un partidor PCR RE (5431–5450).

La SEQ ID NO: 187 presenta el ejemplo 187 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la 10-Formil-H₄ folatosintetasa (**75**) (2324 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1872) seleccionada/modificada de la secuencia de la 10-formiltetrahidrofolatosintetasa (GenBank: YP_428991) de *Moorella thermoacetica*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (1873–2304), y un partidor PCR RE(2305–2324) .

La SEQ ID NO: 188 presenta el ejemplo 188 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la 10-Metenil-H₄ folato ciclohidrolasa (**76**) (1487 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1035) seleccionada/modificada de la secuencia de la meteniltetrahidrofolato ciclohidrolasa (GenBank: YP_430368) de *Moorella thermoacetica* ATCC 39073, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (1036–1467), y un partidor PCR RE(1468–1487).

La SEQ ID NO: 189 presenta el ejemplo 189 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la 10-Metilen-H₄ folato Deshidrogenasa (**77**) (1487 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1035) seleccionada/modificada de la secuencia de la meteniltetrahidrofolato ciclohidrolasa /5,10-metilenetetrahidrofolato Deshidrogenasa (GenBank: ABC19825) de *Moorella thermoacetica*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (1036–1467), y un partidor PCR RE(1468–1487) .

La SEQ ID NO: 190 presenta el ejemplo 190 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la 10-Metilen-H₄ folato reductasa (**78**) (1565 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1113) seleccionada/modificada de la secuencia de la metilentetrahidrofolato reductasa (GenBank: ABC19505) de *Moorella thermoacetica*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (1114–1545), y un partidor PCR RE(1546–1565).

La SEQ ID NO: 191 presenta el ejemplo 191 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Metiltetrahidrofolato: proteína corrinoi de hierro-sulfuro metiltransferasa (**79**) (1442 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–

20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–690) seleccionada/modificada de la secuencia de la Metiltetrahidrofolato: proteína corrinoidehierro-sulfuro metiltransferasa (GenBank: YP_430174) de *Moorella thermoacetica*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (691–1122), y un partidor PCR RE (1123–1442) .

La SEQ ID NO: 192 presenta el ejemplo 192 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Proteína corrinoidehierro-sulfuro (**80**) (2942 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–2490) seleccionada/modificada de la secuencia de las subunidades grande y pequeña de la Proteína corrinoidehierro-sulfuro (GenBank: AEI90745, AEI90746) de *Clostridium autoethanogenum*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (2491–2922), y un partidor PCR RE(2923–2942).

La SEQ ID NO: 193 presenta el ejemplo 193 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la CO Deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa (**81**) (4859 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–4407) seleccionada/modificada de la secuencia de las subunidades alfa y beta de la monóxido de carbono Deshidrogenasa (GenBank: AAA23229, AAA23228) de *Moorella thermoacetica*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (4408–4839), y un partidor PCR RE (4840–4859).

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS. 186–193 junto con las SEQ ID NOS. 174–179 en la transformación genética de un organismo huésped microbial tal como la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 confiere una vía dependiente de ATP reductora de acetil-CoA para la producción de butanol (**74–81** y **07– 12/42** en la Figura 14). Similarmente, la expresión de las SEQ ID NOS. 186–193 y SEQ ID NOS. 180–185 junto con las SEQ ID NOS. 174–179 en una bacteria tal como *Anabaena* PCC 7120 representa un organismo de diseño (tal como *Anabaena* de diseño) con una vía de diseño dependiente de ATP reductora de acetil-CoA y metanogénica para la producción de biocombustibles y un sistema generador hidrogenotrófico metanogénico acoplado a ATP (Figuras 15 y 16) que puede operar para la producción de tanto butanol como metano a partir de hidrógeno y dióxido de carbono. El resultado neto en este ejemplo es la producción

anaeróbica quimiolitotrófica de tanto butanol como metano a partir de hidrógeno y dióxido de carbono como se muestra en la ecuación de proceso [22].

La SEQ ID NO: 194 presenta el ejemplo 194 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para las enzimas de síntesis de F₄₂₀ (**99**) (6428 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–4976) seleccionada/modificada de la secuencia de la lactaldehído Deshidrogenasa CofA (GenBank: ADC46523) de *Methanobrevibacter ruminantium*, 2-fosfo-L-lactato guanililtransferasa (GenBank: ADL58588) de *Methanothermobacter Marburgensis*, 2-fosfo-L-lactato transferasa (GenBank: NP_987524) de *Methanococcus maripaludis*, Coenzima F420-0 gamma-glutamil ligasa (YP_001030766) de *Methanocorpusculum labreanum*, FO sintasa subunidades 1 y 2 (YP_003357513, YP_003357511) de *Methanocella paludicola*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc*(4977–6408), y un partidor PCR RE (6409–6428) .

La SEQ ID NO: 195 presenta el ejemplo 195 192 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Piridoxal fosfato-dependente L-tirosina decarboxilasa (*mfhA* para síntesis de metanofurano) (**100**) (1778 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–1326) seleccionada/modificada de la secuencia de la L-tirosina decarboxilasa (GenBank: YP_003355454) de *Methanocella paludicola*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc*(1327–1758), y un partidor PCR RE (1759–1778) .

La SEQ ID NO: 196 presenta el ejemplo 196 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para las enzimas de síntesis de Metanopterina (**101**) (3215 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–2763) seleccionada/modificada de la secuencia de la GTP ciclohidrolasa (GenBank: YP_447347) de *Methanosphaera stadtmanae* DSM 3091, fosfodiesterasa cíclica MptB (ABO35741) de *Methanococcus maripaludis* C5, beta-ribofuranosilaminobenceno 5'-fosfatosintasa (YP_003356610) de *Methanocella paludicola* SANA E, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (2764–3195), y un partidor PCR RE(3195–3215).

SEQ ID NO: 197 presenta el ejemplo 197 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para las enzimas de síntesis de la Coenzima M (**102**) (4226 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–3774) seleccionada/modificada de la secuencia de la fosfosulfolactatosintasa, 2-fosfosulfolactatofosfatasa y sulfolactato Deshidrogenasa (GenBank: ADL57861, YP_003850451, ADL59162) de *Methanothermobacter marburgensis*, y sulfopiruvato decarboxilasa (YP_003357048) de *Methanocella paludicola* SANA E, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (3775–4026), y un partidor PCR RE (4027–4226).

La SEQ ID NO: 198 presenta el ejemplo 198 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para las enzimas de síntesis de la Coenzima B (**103**) (5198 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc* (*Anabaena* PCC 7120) (21–192), una secuencia que codifica para la enzima (193–4746) seleccionada/modificada de la secuencia de la Isopropilmalato Sintasa, isopropilmalato Deshidrogenasa (GenBank: AAM01606, NP_614498) de *Methanopyrus kandleri*, isopropilmalatoisomerasa subunidades grande y pequeña (ADP98363, ADP98362) de *Marinobacter adhaerens*, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc* (4747–5178), y un partidor PCR RE (5179–5198) .

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS. 194–198 en una célula microbial huésped tal como la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 provee la habilidad de sintetizar alguno de los cofactores tales como F₄₂₀, metanofurano, metanopterina, Coenzima M, y Coenzima B que son requeridos para que las vías de diseño hidrogenotróficas reductoras de acetil-CoA para la producción de biocombustibles (de las Figuras 13, 14, 16 y 17) operen adecuadamente. Dependiendo del contenido genético de varias células huéspedes tales como cianobacterias, muchas de ellas pueden o no pueden poseer algunas de estas enzimas para sintetizar estos cofactores. Por lo tanto, en una de varias representaciones, es una práctica preferida expresar estas enzimas de síntesis de cofactores (p.ej., SEQ ID NOS. 194–198) junto con los genes para las vías de diseño hidrogenotróficas reductoras de acetil-CoA para la producción de biocombustibles (p.ej., SEQ ID NOS. 166–193) como se muestra en estos ejemplos.

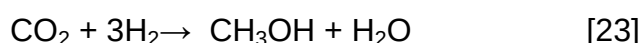
Nótese, muchas de las bacterias hidrogenotróficas y metanógenas tales como *Methanocella paludicola* SANA E poseen naturalmente algunas vías hidrogenotróficas y/o reductoras de acetil-CoA y la habilidad de sintetizar los cofactores asociados incluyendo F420, metanofurano, metanopterina, Coenzima M, y Coenzima B. Por lo tanto, en una de varias representaciones, es también una práctica preferida expresar ciertos genes de diseño para vías de producción de biocombustibles (Figs. 1, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, y 14) tal como las SEQ ID NOS. 174–179 en una célula huésped hidrogenotrófica y/o metanogénica para la producción quimiolitotrófica de biocombustibles tales como 1-butanol a partir de hidrógeno (H_2) y dióxido de carbono (CO_2). De acuerdo a una de varias representaciones, un organismo huésped hidrogenotrófico y/o fermentativo o metanogénico para esta aplicación específica es seleccionado del grupo consistente en: *Methanocella paludicola* SANA E, *Acinetobacter baumannii* ABNIH3, *Acinetobacter baumannii* ABNIH4, *Acinetobacter* sp. DR1, *Agrobacterium* sp. H13-3; *Agrobacterium vitis* S4, *Alcaligenes* sp., *Allochromatium vinosum* DSM 180, *Amycolatopsis mediterranei* S699, *Anoxybacillus flavithermus* WK1, *Aquifex aeolicus* VF5, *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304, *Archaeoglobus veneficus* SNP6, *Azospirillum* sp. B510, *Burkholderia cenocepacia* HI2424, *Caldicellulosiruptor bescii* DSM 6725, *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*, *Centipeda periodontii* DSM 2778, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium sticklandii* DSM 519, *Clostridium sticklandii*, *Corynebacterium glutamicum*, *Cupriavidus metallidurans* CH34, *Cupriavidus necator* N-1, *Desulfobacca acetoxidans* DSM 11109, *Exiguobacterium* sp. AT1b, *Ferrimonas balearica* DSM 9799, *Ferroglobus placidus* DSM 10642, *Geobacillus kaustophilus* HTA426, *Helicobacter bilis* ATCC 43879, *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6, *Hydrogenovibrio marinus*, *Klebsiella variicola* At-22, *Methanobacterium* sp. SWAN-1, *Methanobrevibacter ruminantium* M1, *Methanocaldococcus fervens* AG86, *Methanocaldococcus infernus* ME, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanocaldococcus* sp. FS406-22, *Methanocaldococcus vulcanius* M7, *Methanococcus aeolicus* Nankai-3, *Methanococcus maripaludis* C6, *Methanococcus maripaludis* S2, *Methanococcus voltae* A3, *Methanocorpusculum labreanum* Z, *Methanoculleus marisnigri* JR1, *Methanohalophilus mahii* DSM 5219, *Methanolinea tarda* NOBI-1, *Methanoplanus petrolearius* DSM 11571, *Methanoplanus petrolearius*,

Methanopyrus kandleri AV19, *Methanoregula boonei* 6A8, *Methanosaeta harundinacea* 6Ac, *Methanosalsum zhilinae* DSM 4017, *Methanosarcina acetivorans* C2A, *Methanosarcina barkeri* str. Fusaro, *Methanosarcina mazei* Go1, *Methanosphaera stadtmanae*, *Methanospirillum hungatei* JF-1, *Methanothermobacter marburgensis* str. Marburg, *Methanothermobacter marburgensis*, *Methanothermobacter thermautotrophicus*, *Methanothermococcus okinawensis* IH1, *Methanothermus fervidus* DSM 2088, *Metilobacillus flagellates*, *Metilobacterium organophilum*, *Metilococcus capsulatus*, *Metilomicrobium kenyense*, *Metilomonas methanica* MC09, *Metilomonas* sp. LW13, *Metilosinus* sp. LW2, *Metilosinus trichosporium* OB3b, *Metilotenera mobilis* JLW8, *Metilotenera versatilis* 301, *Metilovorus glucosetrophus* SIP3-4, *Moorella thermoacetica* ATCC 39073, *Moorella thermoacetica*, *Oligotropha carboxidovorans* OM5, *Paenibacillus terrae* HPL-003, *Pelotomaculum thermopropionicum* SI, *Planctomyces brasiliensis* DSM 5305, *Pyrococcus furiosus* DSM 3638, *Pyrococcus horikoshii* OT3, *Pyrococcus yayanosii* CH1, *Ralstonia eutropha* H16, *Rubrivivax* sp., *Selenomonas noxia* ATCC 43541, *Shewanella baltica* BA175, *Stenotrophomonas* sp. SKA14, *Synechococcus* sp. JA-2-3B'a (2-13), *Synechococcus* sp. JA-3-3Ab, *Thermococcus gammatolerans* EJ3, *Thermococcus kodakarensis* KOD1, *Thermococcus onnurineus* NA1, *Thermococcus* sp. 4557, *Thermodesulfatator indicus* DSM 15286, *Thermofilum pendens* Hrk 5, *Thermotoga lettingae* TMO, *Thermotoga petrophila* RKU-1, *Thiocapsa roseopersicina*, *Thiomonas intermedia* K12, *Xanthobacter autotrophicus*, *Yersinia pestis* Antiqua, *Phaeodactylum tricornutum*, *Methanosarcina barkeri*, y *Microcoleus vaginatus*, y combinaciones de estas.

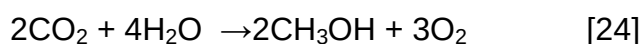
Vías de Producción de Metanol de Diseño

De acuerdo a una de varias representaciones, una vía de producción de metanol de diseño es creada en un organismo transgénico para convertir dióxido de carbono a metanol (Fig. 18). Esta vía de producción de metanol de diseño incluye tres diferentes Deshidrogenasas: a) Formiato Deshidrogenasa ($F_{ate}DH$) **109**, formaldehído Deshidrogenasa ($F_{ald}DH$) **110**, y una alcohol Deshidrogenasa (ADH) **43** (o **44**) como está numéricamente etiquetada en la Fig. 18. Las vías de producción de metanol consisten en tres pasos: 1) la reducción de CO_2 a Formiato catalizado por la Formiato Deshidrogenasa ($F_{ate}DH$), 2) la reducción de Formiato a formaldehído por

la formaldehído Deshidrogenasa ($F_{ald}DH$), y 3) la reducción de formaldehído a metanol por la alcohol Deshidrogenasa (ADH). El dinucleotido de nicotinamida adenina reducido (NADH), actúa como el dador final de electrones para cada una de estas reducciones catalizadas por Deshidrogenasa. Nótese, en un proceso hidrogenotrófico (Fig. 19), el dinucleotido de nicotinamida adenina reducido (NADH) puede ser regenerado a través de la reducción de NAD^+ mediante el uso de hidrógeno molecular (H_2) bajo la catálisis de una hidrogenasa. Por lo tanto, el uso de las vías de producción de metanol de diseño en un organismo anaeróbico hidrogenotrófico huésped puede producir metanol a partir de CO_2 y H_2 a través de la siguiente reacción hidrogenotrófica:



De acuerdo a una de varias representaciones, como se muestra en la Fig. 18, el suministro de dinucleotido de nicotinamida adenina reducido (NADH) para las vías de producción de metanol de diseño en un organismo fotosintético de diseño se logra a través del uso de un proceso de conversión NADPH/NADH que, como se revela en las ecuaciones 3 y 4 de arriba, se logra por un mecanismo de dos pasos: 1) Uso de una Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa dependiente de NADPH **34**, que reduce NADPH para reducir 1,3-difosfoglicerato a gliceraldehído-3-fosfato; y 2) uso de una Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa dependiente de NAD^+ **35**, que produce NADH para oxidar Gliceraldehído-3-Fosfato a 1,3-difosfoglicerato. El resultado neto de este mecanismo de dos pasos es la conversión del NADPH generado fotosintéticamente a NADH, el que puede alimentar la vía de diseño de producción de metanol para la síntesis de metanol a partir de dióxido de carbono y agua de acuerdo a la siguiente reacción de proceso:



La SEQ ID NO: 199 presenta el ejemplo 199 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *nirA* para la Formiato Deshidrogenasa NAD-dependiente (1636 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 89-pb de la nitrito reductasa *nirA* de *Synechocystis sp.* cepa PCC (21–109), una secuencia que codifica para la enzima (110–1207) seleccionada de la Formiato Deshidrogenasa NAD-

dependiente de *Komagataella pastoris* (GenBank: AB472090), un terminador de 409-pb *rbcS* de *Synechocystis sp.* PCC 6803 (1208–1616), y un partidor PCR RE (1617–1636). SEQ ID NO: 200 presenta el ejemplo 200 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *nirA* para la Formaldehído Deshidrogenasa (1567 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 89-pb de la nitrito reductasa *nirA* de *Synechocystis sp.* cepa PCC (21–109), una secuencia que codifica para la enzima (110–1138) seleccionada de la Formaldehído Deshidrogenasa de *Mycobacterium marinum* (GenBank: EPQ77120), un terminador de 409-pb *rbcS* de *Synechocystis sp.* PCC 6803 (1139–1547), y un partidor PCR RE (1548–1567).

La SEQ ID NO: 201 presenta el ejemplo 201 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *nirA* para la Alcohol Deshidrogenasa NAD(P)H-dependiente (1549 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 89-pb de la nitrito reductasa *nirA* de *Synechocystis sp.* cepa PCC (21–109), una secuencia que codifica para la enzima (110–1120) seleccionada de la Alcohol Deshidrogenasa de *Metilophaga thiooxydans* (GenBank: KGM07167) para metanol, un terminador de 409-pb *rbcS* de *Synechocystis sp.* PCC 6803 (1121–1529), y un partidor PCR RE (1530–1549).

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS. 199–201 en la transformación genética de un organismo huésped microbial tal como la cianobacteria *Synechocystis sp.* cepa PCC 6803 confiere una vía de producción de metanol de diseño (**109**, **110**, **43** o **44** en La Figura 18). Como se describió antes, el uso de una hidrogenasa soluble (SH, **71** y sus proteínas accesorias **72**) permite la generación de NAD(P)H a través de la reducción mediada por SH de NAD(P)^+ por H_2 . Por lo tanto, la expresión de las SEQ ID NOS. 199–201 en combinación con la hidrogenasa soluble (SH, **71** y sus proteínas accesorias **72**) puede producir metanol a partir de CO_2 y H_2 de acuerdo a la reacción de proceso hidrogenotrófica [23].

La SEQ ID NO: 202 presenta el ejemplo 202 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *nirA* para la Formiato Deshidrogenasa (1180pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb *nirA* de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21–251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1040) seleccionada /modificada de la secuencia de la Formiato

Deshidrogenasa de *Bacillus subtilis* (KFC29810), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1041–1160), y un partidor PCR RE (1161–1180) en el extremo 3’.

La SEQ ID NO: 203 presenta el ejemplo 203 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *nirA* para la formaldehído Deshidrogenasa (1432pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb *nirA* de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1292) seleccionada/modificada de la secuencia de la formaldehído Deshidrogenasa de *Geobacillus thermoglucosidans* (EID43710), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1293–1412), y un partidor PCR RE (1413–1432) en el extremo 3’.

La SEQ ID NO: 204 presenta el ejemplo 204 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *nirA* para la Alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH termo tolerante (1579 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb *nirA* de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1439) seleccionada/modificada de la secuencia de la Alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH de *Pelotomaculum thermopropionicum* (BAF58669) la que puede ser usada para la producción de metanol un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1440–1559), y un partidor PCR RE (1560–1579) en el extremo 3’.

Nótese, el uso de las NOS. 202–204, 58 y 59 en la transformación genética de un organismo huésped microbioal que incluye (pero no se limita a) células bacteriales tal como la cianobacteria *Thermosynechococcus elongatus* puede crear una cianobacteria de diseño tal como una *Thermosynechococcus* con vías de diseño para la producción de metanol (numéricamente etiquetadas como **109**, **110**, **44**, **34** y **35** en la Figura 18) para la producción de metanol a partir de agua y dióxido de carbono. El uso de una Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa dependiente de NADPH 34 y Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa dependiente de NAD 35 (codificadas por las SEQ ID NOS. 58 y 59) provee el mecanismo de conversión de dos pasos para el NADPH generado fotosintéticamente a NADH, el que alimenta las vías de producción de metanol de diseño a partir de dióxido de carbono y agua de acuerdo a la reacción fotoautotrófica de proceso [24].

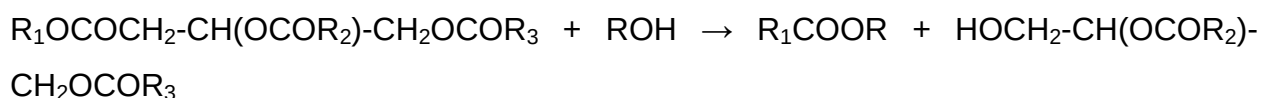
Vías de Producción de Alcohol-Biodiesel de Diseño

De acuerdo a una de varias representaciones, un gen para una lipasa de diseño **106** es expresado en combinación con una vía de producción de alcohol (ROH) (Figs. 18, 19, y 20), lo que resulta en la producción de biodiesel (R_1COOR) a través de la siguiente reacción catalizada por lipasa:

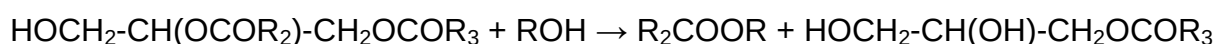


En donde el ácido graso (R_1COOH) proviene de las vías de síntesis de ácidos grasos naturales de la célula mientras que el alcohol (ROH) proviene de las vías de diseño de producción de alcohol que son expresadas en conjunto con la expresión de genes de diseño de la lipasa. Aquí, el grupo " R_1 " representa a la cadena hidrocarbonada de un ácido graso. El grupo " R " representa la parte hidrocarbonada de un alcohol tal como una molécula de metanol, etanol, propanol, 1-butanol, isobutanol o pentanol.

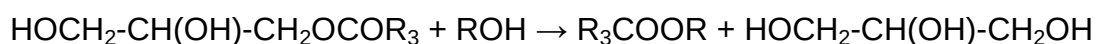
De acuerdo a una de varias representaciones, las células huésped tienen típicamente vías de síntesis de lípidos nativos que pueden producir triglicéridos ($R_1OCOCH_2-CH(OCOR_2)-CH_2OCOR_3$) en los cuales " R_1 ", " R_2 " y " R_3 " representan las tres cadenas hidrocarbonadas de los grupos acilo. Por lo tanto, la expresión de la lipasa **106** en combinación con las vías de producción de alcohol en las células huésped (Figs. 19 y 20) puede resultar en la producción de moléculas de biodiesel (R_1COOR , R_2COOR , y R_3COOR) a través de las siguientes reacciones de transesterificación de triglicéridos catalizadas por lipasa. Primero, un triglicérido es transesterificado con alcohol (ROH) a un biodiesel (R_1COOR) y un diglicérido ($HOCH_2-CH(OCOR_2)-CH_2OCOR_3$):



Luego, el diglicérido ($HOCH_2-CH(OCOR_2)-CH_2OCOR_3$) del proceso anterior es transesterificado de nuevo a otra molécula de biodiesel (R_2COOR) y una monoglicérido ($HOCH_2-CH(OH)-CH_2OCOR_3$):



Finalmente, el monoglicérido ($\text{HOCH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{OCOR}_3$) es transesterificado para producir otra molécula de biodiesel (R_3COOR) con glicerol ($\text{HOCH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{OH}$) como subproducto:



Por lo tanto, el uso innovativo de una lipasa y un alcohol *in vivo* y/o *in vitro* permite la conversión de lípidos incluyendo ácidos grasos y triglicéridos en biodiesel. De acuerdo a una de varias representaciones, el alcohol (ROH) que es utilizado en estas reacciones de producción de biodiesel catalizadas por lipasa es seleccionado del grupo consistente en metanol, etanol, propanol, 1-butanol, isobutanol, 2-metil-1-butanol, isobutanol, 3-metil-1-butanol, 1-hexanol, 1-octanol, 1-pentanol, 1-heptanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, 5-metil-1-heptanol, 4-metil-1-pentanol, 5-metil-1-hexanol, 6-metil-1-heptanol, y/o combinaciones de estos.

De acuerdo a una de varias representaciones, como se ilustra en la Fig. 18, una vía de producción de metanol- biocombustibles de diseño en un organismo fotosintético transgénico incluye: Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NADPH-dependiente **34**, Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NAD^+ -dependiente **35**, Formiato Deshidrogenasa ($\text{F}_{\text{ate}}\text{DH}$) **109**, formaldehído Deshidrogenasa ($\text{F}_{\text{ald}}\text{DH}$) **110**, alcohol Deshidrogenasa (ADH) **43** (o **44**), y lipasa **106**.

De acuerdo a otra representación, una vía de producción hidrogenotrófica de metanol- biocombustibles de diseño en un organismo transgénico de diseño incluye: hidrogenasa soluble reductora de NAD- **71** (Fig 12), Formiato Deshidrogenasa ($\text{F}_{\text{ate}}\text{DH}$) **109**, formaldehído Deshidrogenasa ($\text{F}_{\text{ald}}\text{DH}$) **110**, alcohol Deshidrogenasa (ADH) **43** (o **44**), y lipasa **106** (Fig. 18).

De acuerdo a una de varias representaciones, como se ilustra en las Figs. 3C y 20, una vía de producción de etanol- biocombustibles de diseño en un organismo fotosintético transgénico incluye: Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NADPH-dependiente **34**, Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NAD^+ -dependiente **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvato quinasa **05**, piruvato decarboxilasa **108**, alcohol Deshidrogenasa **44**, y lipasa **106**.

De acuerdo a una de varias representaciones, como se ilustra en las Figs. 1 y 20, una vía de producción de butanol- biocombustibles de diseño en un organismo fotosintético transgénico incluye: Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NAD⁺-dependiente **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvato quinasa **05**, piruvato-ferredoxina oxidoreductasa **06**, acetil-CoA acetiltransferasa (o, Tiolasa **07**), 3-Hidroxibutiril-CoA Deshidrogenasa **08**, Crotonasa **09**, trans-enoil-CoA reductasa (o Butiril-CoA Deshidrogenasa **10**), Butiraldehído Deshidrogenasa (o aldehído/alcohol Deshidrogenasa (AdhE2)) **11**, butanol Deshidrogenasa **12**, y lipasa **106**.

De acuerdo a una de varias representaciones, como se ilustra en las Figs. 4 y 20, una vía de producción de butanol- biocombustibles de diseño en un organismo fotosintético transgénico incluye: Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NADPH-dependiente **34**, Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NAD⁺-dependiente **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, fosfoenolpiruvatocarboxilasa **45**, aspartato Aminotransferasa **46**, aspartoquinasa **47**, aspartato-Semialdehído Deshidrogenasa **48**, homoserina Deshidrogenasa **49**, homoserinaquinasa **50**, treonina sintasa **51**, treonina amonio- liasa **52**, 2-Isopropilmalato Sintasa **40**, isopropilmalato isomerasa **41**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, 2-cetoácido decarboxilasa **42**, Alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD **43** (y/o Alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH **44**, o butanol Deshidrogenasa **12**), y lipasa **106**.

De acuerdo a una de varias representaciones, como se ilustra en las Figs. 6 y 20 una vía de producción de isobutanol- biocombustibles de diseño en un organismo fotosintético transgénico incluye: Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NADPH-dependiente **34**, Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NAD⁺-dependiente **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvato quinasa **05**, acetolactato sintasa **53**, cetoácido reductoisomerasa **54**, dihidroxi ácido deshidratasa **55**, 2-cetoácido decarboxilasa **42**, Alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD **43** (o Alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH **44**), y lipasa **106**.

De acuerdo a una de varias representaciones, como se ilustra en las Figs. 6 y 20, una vía de producción de 3-metil-1-butanol - biocombustibles de diseño en un organismo fotosintético transgénico incluye: Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NADPH-dependiente **34**, Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NAD⁺-dependiente **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvato quinasa **05**, acetolactato sintasa **53**,

cetoácido reductoisomerasa **54**, dihidroxi ácido deshidratasa **55**, 2-Isopropilmalato Sintasa **40**, 3-isopropilmalato deshidratasa **38**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, 2-cetoácido decarboxilasa **42**, Alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD **43** (o Alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH **44**; o más preferentemente, 3-metilbutanal reductasa **57**), y lipasa **106**.

De acuerdo a otra representación, como se ilustra en las Figs. 7 y 20, una vía de producción de hexanol- biocombustibles de diseño en un organismo fotosintético transgénico incluye: Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NADPH-dependiente **34**, Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NAD⁺-dependiente **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvato quinasa **05**, piruvato-ferredoxina oxidoreductasa **06**, Tiolasa **07**, 3-Hidroxibutiril-CoA Deshidrogenasa **08**, Crotonasa **09**, Butiril-CoA Deshidrogenasa **10**, 3-cetotiolasa de diseño **07'**, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de diseño **08'**, enoil-CoA deshidratasa de diseño **09'**, 2-enoil-CoA reductasa de diseño **10'**, acil-CoA reductasa de diseño **11'**, hexanol Deshidrogenasa **12'** y lipasa **106**.

De acuerdo a otra representación, como se ilustra en las Figs. 8, 18 y 20, un organismo transgénico productor de alcohol (metanol, 1-pentanol, 1-hexanol, y/o 1-heptanol)- biodiesel- incluye un conjunto de enzimas que incluyen al menos una de las enzimas seleccionadas del grupo consistente en lipasa **106**, Formiato Deshidrogenasa (F_{ate}DH) **109**, formaldehído Deshidrogenasa (F_{ald}DH) **110**, alcohol Deshidrogenasa (ADH) **43** (o **44**) Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NADPH-dependiente **34**, Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NAD⁺-dependiente **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvato quinasa **05**, citramalato sintasa **36**, 2-metilmalato deshidratasa **37**, 3-isopropilmalato deshidratasa **38**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, 2-Isopropilmalato Sintasa **40**, isopropilmalatoisomerasa **41**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, designer Isopropilmalato Sintasa **40'**, isopropilmalatoisomerasa de diseño **41'**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39'**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42'**, deshidrogenasa de alcohol de cadena corta **43'**, hexanol Deshidrogenasa **12'**, Isopropilmalato Sintasa de diseño **40''**, isopropilmalatoisomerasa de diseño **41''**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39''**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42''**, y deshidrogenasa de alcohol de acuerdo a otra representación, como se ilustra en las Figs. 9 y 20, una vía de producción de diseño de alcoholes superiores (3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, y/o 5-metil-1-

heptanol)–biodieselen un organismo transgénico de diseño incluye: Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NADPH-dependiente **34**, Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NAD⁺-dependiente **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvato quinasa **05**, citramalato sintasa **36**, 2-metilmalato deshidratasa **37**, 3-isopropilmalato deshidratasa **38**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, acetolactato sintasa **53**, cetoácido reductoisomerasa **54**, dihidroxi ácido deshidratasa **55**, Isopropilmalato Sintasa de diseño **40'**, isopropilmalato isomerasa de diseño **41'**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39'**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42'**, deshidrogenasa de alcohol de cadena corta **43'**, Isopropilmalato Sintasa de diseño **40''**, isopropilmalato isomerasa de diseño **41''**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39''**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42''**, deshidrogenasa de alcohol de cadena corta de diseño **43''**, y lipasa **106**.

De acuerdo a otra representación, como se ilustra en las Figs. 10 y 20, una vía de producción de diseño de alcoholes superiores ramificados (4-metil-1-pentanol, 5-metil-1-hexanol, y 6-metil-1-heptanol) –biodiesel en un organismo transgénico de diseño incluye: Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NADPH-dependiente **34**, Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NAD⁺-dependiente **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvato quinasa **05**, acetolactato sintasa **53**, cetoácido reductoisomerasa **54**, dihidroxi ácido deshidratasa **55**, Isopropilmalato Sintasa **40**, deshidratasa **38**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa **39**, Isopropilmalato Sintasa de diseño **40'**, isopropilmalato isomerasa de diseño **41'**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39'**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42'**, deshidrogenasa de alcohol de cadena corta **43'**, Isopropilmalato Sintasa de diseño **40''**, isopropilmalato isomerasa de diseño **41''**, 3-isopropilmalato deshidrogenasa de diseño **39''**, 2-cetoácido decarboxilasa de diseño **42''**, deshidrogenasa de alcohol de cadena corta de diseño **43''**, y lipasa **106**.

De acuerdo a una de varias representaciones, como se ilustra en las Figs. 12, 13 y 19, una vía de producción anaeróbica hidrogenotrófica de diseño de 1-butanol –biodiesel en un organismo transgénico incluye: hidrogenasa convertidora de energía (Ech) **91**, [NiFe]-hidrogenasa (Mvh) **95**, hidrogenasa reductora de Coenzima F₄₂₀ (Frh) **96**, hidrogenasa soluble nativa (o heteróloga) (SH) **71**, heterodisulfuroreductasa (Hdr) **94**, formilmetanofurano Deshidrogenasa **83**, formil transferasa **84**, 10-metenil-

tetrahidrometanopterina ciclohidrolasa **85**, 10-metilen-H₄metanopterina Deshidrogenasa **86**, 10-metilen-H₄-metanopterinareductasa **87**, metil-H₄-metanopterina: proteína corrinoidehierro-sulfuometiltransferasa **88**: proteína corrinoidehierro-sulfuro **89**, CO Deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa **90**, Tiolasa **07**, 3-Hidroxibutiril-CoA Deshidrogenasa **08**, Crotonasa **09**, Butiril-CoA Deshidrogenasa **10**, butialdehídoDeshidrogenasa **11**, butanol Deshidrogenasa **12**y/o alcohol Deshidrogenasa **43**, y lipasa **106**.

De acuerdo a una de varias representaciones, como se ilustra en las Figs. 14 y 19, otravía de producción anaeróbica hidrogenotróficade diseño de 1-butanol –biodiesel en un organismo transgénico incluye: Formiato Deshidrogenasa **74**, 10-formil-H₄folatosintetasa **75**, metheniltetrahidrofolato ciclohidrolasa **76**, 10-metilen-H₄folato Deshidrogenasa **77**, 10-metilen-H₄folatoreductasa **78**, metil-H₄folato: proteína corrinoidehierro-sulfuro metiltransferasa **79**, proteína corrinoidehierro-sulfuro **80**, CO Deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa **81**, Tiolasa **07**, 3-Hidroxibutiril-CoA Deshidrogenasa **08**, Crotonasa **09**, Butiril-CoA Deshidrogenasa **10**, butialdehído Deshidrogenasa **11**, butanol Deshidrogenasa **12**, y/o alcohol Deshidrogenasa **43**, y lipasa **106**.

La SEQ ID NO: 205 presenta el ejemplo 205 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor nirA para la lipasa (1822 pb) que incluye u partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1682) seleccionada/modificada de la secuencia de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (AAA25882) la que puede usar butanol, un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1683–1802), y un partidor PCR RE (1803–1822) en el extremo 3’.

La SEQ ID NO: 206 presenta el ejemplo 206 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor nirA para la lipasa (1486 pb) que incluye u partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1346) seleccionada/modificada de la secuencia de la lipasa de *Burkholderia cepacia* (M58494) la que puede usar etanol, un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1347–1466), y un partidor PCR RE (1467–1486) en el extremo 3’.

La SEQ ID NO: 207 presenta el ejemplo 207 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor nirA para la Piruvato Decarboxilasa (2098 pb) que incluye u partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de

Thermosynechococcus elongatus BP1 (21-251), una secuencia que codifica para la enzima (252–1958) seleccionada/modificada de la secuencia de la Piruvato Decarboxilasa de *Zymomonas mobilis* (AFN57569), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1959–2078), y un partidor PCR RE (2079–2098) en el extremo 3'.

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS. 205 y 58–70 en la transformación genética de una célula microbial huésped incluyendo (pero no limitado a) células bacteriales tales como la cianobacteria *Thermosynechococcus elongatus* crea una cianobacteria de diseño tal como *Thermosynechococcus* de diseño que incluye lipasa y vías de producción de diseño controladas por el promotor *nirA* canalizadas con el ciclo de Calvin para la producción de 1-butanol (como se muestra en la etiquetas numéricas **34**, **35**, **03–05**, y **36–43** en La Figura 4) para la producción de biodiesel a partir de agua y dióxido de carbono (Fig. 20).

Similarmente, el uso de las SEQ ID NOS. 206, 207, 204, y 58–62 en una célula microbial huésped incluyendo (pero no limitado a) células bacteriales tales como la cianobacteria *Thermosynechococcus elongatus* representa una cianobacteria de diseño tal como *Thermosynechococcus* de diseño que incluye lipasa y vías de producción de diseño controladas por el promotor *nirA* canalizadas con el ciclo de Calvin para la producción de biodiesel a partir de agua y dióxido de carbono (Fig. 20). La vía de producción fotoautotrófica de etanol-biodiesel incluye lipasa **106**, Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NADPH-dependiente **34**, Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa NAD-dependiente **35**, fosfoglicerato mutasa **03**, enolasa **04**, piruvato quinasa **05**, piruvato decarboxilasa **108**, y alcohol Deshidrogenasa **44**.

La SEQ ID NO: 208 presenta el ejemplo 208 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *nirA* para la Lipasa (1567 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 89-pb de la nitrito reductasa *nirA* fr *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803 (21–109), una secuencia que codifica para la enzima (110–1138) seleccionada de la lipasa de *Candida antarctica* (GenBank: CAA83122) la que puede usar metanol como sustrato, un terminador de 409-pb *rbcS* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (1139–1547), y un partidor PCR RE (1548–1567).

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS. 208 y 199–201 en la transformación genética de una célula microbial huésped tal como la cianobacteria *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803 confiere una vía de diseño de producción de metanol-biodiesel (**109**, **110**, **43/44**, y

106 como se etiquetan en la Figura 18). Esto también representa un ejemplo de una *Synechocystis* de diseño para la producción fotoautotrófica de alcohol (metanol) y biodiesel a partir de CO_2 y H_2O como se ilustra en las Figs. 18 y 20.

La SEQ ID NO: 209 presenta el ejemplo 209 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *hox* para la Lipasa (2075 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 172-pb *hox* de *Nostoc sp.* cepa PCC 7120 (*Anabaena* PCC 7120) (21–192 una secuencia que codifica para la enzima (193–1623) seleccionada /modificada de la secuencia de Lipasa (GenBank: AAA25882) de *Pseudomonas fluorescens*, un promotor de 432-pb *gor* de *Nostoc sp.* cepa PCC 7120 (1624–2055), y un partidor PCR RE (2056–2075) en el extremo 3'.

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS. 209 y 166–179 en la transformación genética de una célula microbial huésped incluyendo (pero no limitado a) células tales como la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 puede crear una cianobacteria de diseño tal como *Anabaena* de diseño con una lipasa y una vía de diseño reductora de acetil-CoA para la producción de 1-butanol (numéricamente etiquetados como **83–90** y **07–12** en la Figura 13) para la producción de biodiesel a partir de hidrógeno molecular (H_2) y dióxido de carbono (CO_2) sin el requerimiento de fotosíntesis o luz solar. Esto también representa un ejemplo de una vía de diseño hidrogenotrófica para la producción celular hidrogenotrófica de alcohol (butanol) y biodiesel a partir de H_2 y CO_2 como se ilustra en la Fig. 19.

La SEQ ID NO: 210 presenta el ejemplo 210 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *nirA* para la Lipasa en *Synechococcus sp.* cepa PCC 7942 (2290 pares de bases (pb)) que incluye un partidor PCR FD (secuencia pb 1–20), un promotor de 88-pb *nirA* (21–108) seleccionado de la secuencia de la nitrito reductasa de *Synechococcus sp.* cepa PCC 7942 (cianobacteria de agua dulce), una secuencia que codifica para la enzima (109–1962) seleccionada y modificada de la Lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (GenBank número de acceso: BAC98499), un terminador de 308-pb *rbcS* de *Synechococcus sp.* cepa PCC 7942 (1963–2270), y un partidor PCR RE (2271–2290) en el extremo 3'.

Nótese, en los *Synechococcus* transgénicos de diseño representados por las SEQ ID NOS: 210 y 95–98 (y/o 99), las enzimas nativas de *Synechococcus* **03–05**, **36–41** y **45–52** son usadas en combinación con las enzimas de diseño controladas por el

promotor *irA* **34**, **35**, **42** y **12** [codificadas por las SEQ ID NOS: 95–98 (y/o 99)] para conferir una lipasa de diseño y las vías mejoradas canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato para la producción fotobiológica de 1-butanol a partir de dióxido de carbono y agua (Figura 4). El 1-butanol producido a partir de dióxido de carbono y agua (Figura 4) es usado por la lipasa (codificada por la SEQ ID NO: 210) en la transesterificación de triglicéridos y/o ácidos grasos para la producción de biodiesel (Fig. 20).

La SEQ ID NO:211 presenta el ejemplo 211 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *groE* para la Lipasa (1231 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 137-pb *groE* de respuesta a luz y calor de *Prochlorococcus marinus* (21–157), una secuencia que codifica para la enzima (158–1090) seleccionada de la Lipasa de *Brachy bacterium tyrofermentans* (GenBank: ACD89058), un terminador de 121-pb *rbcS* de *Prochlorococcus marinus* MIT9313(1091–1213), y un partidor PCR RE (1214–1231).

El uso de *Prochlorococcus marinus* MIT 9313 como organismo huésped para la transformación genética con las SEQ ID NOS: 211 y 110–122 puede crear *Prochlorococcus marinus* transgénicos de diseño para la producción fotobiológica de isobutanol y/o 3-metil-1-butanol (Figura 6), en donde el alcohol(es) producido es simultáneamente y/o subsecuentemente usado por la lipasa (codificada por la SEQ ID NO: 211) en la transesterificación de un triglicérido y/o ácidos grasos para la producción de biodiesel (Fig. 20). Por lo tanto, esto también representa un ejemplo de un *Prochlorococcus* de diseño para la producción fotoautotrófica de alcoholes (isobutanol y/o 3-metil-1-butanol) y biodiesel a partir de CO₂ y H₂O como se ilustra en la Fig. 20.

SEQ ID NO: 212 presenta el ejemplo 212 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor *nirA* para la Lipasa (1386 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 203-pb *nirA* de *Cyanothece sp. ATCC 51142* (21–223), una secuencia que codifica para la enzima (224–1165) seleccionada de la secuencia de la Lipasa de *Rhodococcus erythropolis* (GenBank: ACD89059), un terminador de 201-pb *rbcS* de *Cyanothece sp. ATCC 51142* (1166–1376), y un partidor PCR RE (1377–1386).

El uso de *Cyanothece* sp. ATCC 51142 como organismo huésped para la transformación genética con las SEQ ID NOS: 212 y 123–128 puede crear *Cyanothece* transgénicos de diseño para la producción fotobiológica de 1-pentanol, 1-hexanol, y/o 1-heptanol (Figura 8), en donde el alcohol(es) producido es simultáneamente y/o subsecuentemente usado por la lipasa (codificada por la SEQ ID NO: 212) en la transesterificación de un triglicérido y/o ácidos grasos para la producción de biodiesel (Fig. 20).

SEQ ID NO. 213 presenta el ejemplo 213 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor Nial y con destinación a cloroplasto para la Lipasa (2420 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb Nial (nitrato reductasa) de *Chlamydomonas reinhardtii* promoter (21–188), un péptido señal de 135-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas reinhardtii* (189–323), una secuencia que codifica para la Lipasa (324–2177) seleccionada /modificada de la Lipasa (CAJ76166) de *Pseudomonas* sp. 7323, un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas reinhardtii* (2178–2400), y un partidor PCR RE (2401–2420).

Nótese, el uso de las SEQ ID NOS. 213, 129–133, 151–153, 140 y 141 (o 142) en la transformación genética de un organismo fotosintético eucariota tal como *Chlamydomonas* puede crear un organismo fotosintético eucariota de diseño tal como *Chlamydomonas* de diseño con una vía mejorada de diseño canalizada con el ciclo de Calvin, derivada de 3-fosfoglicerato y dependiente de NADPH (**03–05, 34, 35, 53–55, 42, y 43 (44)** en la Figura 6) para la producción fotobiológica de isobutanol a partir de dióxido de carbono y agua, en donde el isobutanol producido es simultáneamente y/o subsecuentemente usado por la lipasa (codificada por la SEQ ID NO: 213) en la transesterificación de un triglicérido y/o ácidos grasos para la producción de biodiesel (Fig. 20). en la transformación genética de un organismo fotosintético eucariota tal como *Chlamydomonas* puede crear un organismo fotosintético eucariota de diseño tal como *Chlamydomonas* de diseño convía derivada de gliceraldehídos-3-fosfato para la producción de butanol (**01–12** en La Figura 1), en donde el butanol producido es simultáneamente y/o subsecuentemente usado por la lipasa (codificada por la SEQ ID NO: 213) en la transesterificación de un triglicérido y/o ácidos grasos para la producción de biodiesel (Fig. 20).

Evolución y Selección mejorada de las Cepas Productoras de Biodiesel Alcohol

De acuerdo a una de varias representaciones el uso de un sistema regulador sensible a biocombustible alcohol en combinación con un marcador selectivo que mejora la búsqueda y recolección de las células transgénicas con producción aumentada de los biocombustibles deseados tales como butanol y alcoholes superiores relacionados. Por ejemplo, el activador transcripcional σ^{54} (BmoR) y el promotor regulado por alcohol y dependiente de σ^{54} (P_{BMO}) previamente identificado de *Thauera butanivorans* puede ser usado como un ejemplo de dicho sistema de regulación controlado por promotor y sensitivo a alcohol. Ha sido experimentalmente demostrado que esta herramienta genética BmoR- P_{BMO} puede detectar un amplio rango de concentraciones de butanol y alcoholes superiores relacionados y puede por lo tanto ser usado como un interruptor genético para controlar la expresión de un marcador selectivo (o gen de diseño) de acuerdo a los niveles de concentración de los biocombustibles de alcohol en bacterias tales como *E. coli*. Por lo tanto, en una de varias representaciones, esta herramienta genética BmoR- P_{BMO} es usada como un ejemplo para controlar la expresión de un marcador selectivo del grupo consistente en el gen marcador de resistencia a tetraciclina *tetA*, el gen marcador de resistencia a kanamicina (*kan^r*), el gen marcador de resistencia a gentamicina, el gen marcador de resistencia a espectinomicina *Spcr*, el gen marcador de resistencia a estreptomicina *aadA*, el gen marcador de resistencia a ampicilina *amp^r*, el gen marcador de resistencia a cloramfenicol *CmR*, el gen marcador de resistencia a higromicina (*hph*), el gen marcador de resistencia a glifosato *epsps*, el gen de argininosuccinato liasa (*arg7*), los genes de la nitrato reductasa (*narG y napA*), y combinaciones de estos.

Con el uso del interruptor genético BmoR- P_{BMO} para controlar los niveles de expresión de un marcador selectivo tal como el gen marcador de la tetraciclina *tetA* para responder a las concentraciones de los productos biocombustibles de alcohol, solo las células más productivas que producen una cantidad suficiente del biocombustible de alcohol las que pueden activar el interruptor BmoR- P_{BMO} para expresar el gen marcador selectivo *tetA* podrán sobrevivir en la presencia del antibiótico tetraciclina en el medio de cultivo. Por lo tanto, este proceso de selección guiado a través del uso de un sistema de detección de alcohol acoplado con un regulador de la transcripción para marcaje selectivo puede seleccionar mejores células transgénicas que poseen vías de

producción de biocombustibles más efectivas. El marcador selectivo en este caso no tiene que ser un gen de resistencia a antibiótico o herbicida. Algunos genes relacionados con nutrientes tales como el gen de la argininosuccinato liasa (*arg7*) o los genes de la nitrato reductasa (*narG* y *napA*) pueden ser usados como marcadores selectivos para este proceso de selección guiado por biocombustibles de alcohol, cuando algunos auxotrofos que carecen del gen de la argininosuccinato liasa (*arg7*) o los genes de la nitrato reductasa (*narG* y *napA*) son usados como organismo huésped. Una ventaja significativa del proceso de selección guiado por biocombustibles es que puede eliminar las células que sobreviven sin producir la molécula de biocombustible deseada tal como butanol y puede seleccionar positivamente a las células que realmente producen el biocombustible (butanol) de una manera efectiva.

De acuerdo a una de varias representaciones, este proceso de selección guiado por biocombustible (alcohol) es usado en combinación con un proceso de mutagénesis incluyendo cambios en el genoma dirigido por oligonucleótidos para acelerar el proceso de evolución genética molecular para crear cepas productoras de biocombustibles optimizadas. Se ha demostrado experimentalmente que la introducción de ciertas hebras simples de ADN (en inglés, ssDNA) cortas (con rango de longitud entre 80 y 100 pb) u oligonucleótidos (oligos) en algunas células huésped tales como células bacteriales, mediante electroporación, puede crear efectivamente muchas mutaciones en muchos lugares blanco en el ADN de la célula huésped. En esta aproximación, los oligos son dirigidos a la hélice retardada de la horquilla de replicación durante la replicación del ADN. Típicamente, estos oligos son especialmente hechos de manera tal que las dos regiones finales (30-40 pb) de cada oligo son homólogas a algunos puntos del cromosoma huésped, permitiéndoles unirse con la hélice retardada de la horquilla de replicación del ADN en los puntos blancos del ADN cromosomal para reemplazos alélicos. La región central de cada oligo contiene una mutación de diseño seleccionada del grupo consistente en desajuste, inserción y/o delección. Es una práctica preferida para cada oligonucleótido de diseño contener dos bases fosforotioteadas en sus extremos 3' y 5' para aumentar la inestabilidad del oligonucleótido transformante para una mayor eficiencia de reemplazo alélico. Es también una práctica preferida el emplear la proteína λ -Roja de unión β , que se une ADN de hebra simple (ssDNA) y promueve el *annealing* de la hebra, para mediar el

proceso de recombinación en la célula huésped para una mayor eficiencia de reemplazo alélico.

De acuerdo a una de varias representaciones, el uso de los oligonucleótidos de diseño puede simultáneamente estar destinado a muchas regiones alélicas diferentes incluyendo las regiones regulatorias de la transcripción, secuencias de Shine-Dalgarno, y las secuencias que codifican para proteínas en el genoma huésped para generar grandes números (billones) de variantes genéticas para el proceso de selección guiada por biocombustibles para obtener células transgénicas con producción de biocombustibles optimizada. Por ejemplo, la productividad de alcohol puede ser dramáticamente optimizada al destinar simultáneamente la región regulatoria traduccional tal como las secuencias de Shine-Dalgarno de los genes de vías de producción de biocombustibles para aumentar la actividad de la vía mientras que de los genes de vías que compiten y/o sus secuencias de Shine-Dalgarno pueden ser reguladas para disminuir sus actividad. Típicamente, en orden que un ARNm sea traducido adecuadamente, su secuencia de codones debe ser colocado de manera apropiada con el aparato traduccional el que está compuesto por los ribosomas. Por ejemplo, en algunas bacterias tal como *E. coli*, el registro correcto del ARNm en el ribosoma requiere el alineamiento de una secuencia rica en pirimidinas en el extremo 3' del ARN 16S con una parte rica en purinas en el extremo 5' del ARNm. El segmento rico en purinas del ARNm es el sitio de unión al ribosoma también conocido como la secuencia de Shine-Dalgarno la que está típicamente localizada dentro de las primeras 18-pb río arriba del codón de inicio. En muchos casos donde el la unión del ribosoma en la secuencia Shine-Dalgarno regula positivamente la eficiencia de la traducción, la mutación de diseño en la secuencia Shine-Dalgarno debe ser diseñada para la complementación canónica con la secuencia rica en pirimidinas en el extremo 3' del ARN 16S para así mejorar la eficiencia de traducción de un ARNm dado. Es también conocido que ciertas células huésped tales como cianobacteria, la unión del ribosoma en la secuencia Shine-Dalgarno regula negativamente la eficiencia de la traducción. En ese caso, es una práctica preferida mutar la secuencia Shine-Dalgarno para evitar la complementación canónica con el extremo 3' del ARN 16S rico en pirimidinas para aumentar la eficiencia de traducción de un ARNm dado. Otras herramientas de control

genéticas tales como *riboswitches* (ribo-interruptores) pueden ser empleados con aptámeros de ARN de diseño para regular la expresión de transgenes de diseño.

La SEQ ID NO: 214 presenta el ejemplo 214 de un constructo de ADN con un factor de transcripción basado en arginina y alcohol-inducible de *Synechocystis sp.* PCC 6803 (6498 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), una secuencia regulatoria de un promotor transcripcional alcohol-inducible σ^{54} (20–4683) seleccionada/modificada del factor BmoR y sus secuencias promotoras asociadas (AY093933) de *Thauera butanivorans*, una secuencia que codifica para un marcador de selección (4684–6069) seleccionada de la argininosuccinato liasa de *Synechocystis sp.* PCC 6803 (GenBank: NP_440604), un terminador de 409-pb *rbcS* de *Synechocystis sp.* PCC 6803 (6070–6478), y un partidor PCR RE (6479–6498). El uso de este constructo de ADN (SEQ ID NO: 214) permite la evolución y selección aumentada para células de *Synechocystis* de diseño productoras de biocombustibles de alcohol basado en una complementación con arginina sin requerir el uso de un gen de resistencia a antibióticos.

La SEQ ID NO: 215 presenta el ejemplo 215 de un constructo de ADN con un factor de transcripción seleccionable nitrato reductasa y alcohol-inducible de *Thermosynechococcus elongatus* (7034 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), una secuencia regulatoria de un promotor transcripcional alcohol-inducible σ^{54} (20–4683) seleccionada/modificada del factor BmoR y sus secuencias promotoras asociadas (AY093933) de *Thauera butanivorans*, una secuencia que codifica para un marcador de selección (4684–6884) seleccionada de la nitrato reductasa de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (NP_682145), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (6885–7014), y un partidor PCR RE (7015–7034) en el extremo 3'. El uso de este constructo de ADN (SEQ ID NO: 214) permite la evolución y selección aumentada para células de *Thermosynechococcus* a través del uso de complementación con nitrato sin requerir el uso de un gen de resistencia a antibióticos.

La SEQ ID NO: 216 presenta el ejemplo 216 de un constructo de ADN con un factor de transcripción seleccionable con resistencia a tetraciclina y alcohol-inducible para la Lipasa de *Synechococcus sp.* cepa PCC 7942 (7006 pares de bases (pb)) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), una secuencia regulatoria de un promotor transcripcional alcohol-inducible σ^{54} (20–4047) seleccionada/modificada del factor BmoR y sus secuencias promotoras asociadas (AY093933) de *Thauera butanivorans*,

una secuencia que codifica para un marcador de selección (4048–5247) seleccionada de la proteína de resistencia a tetraciclina (AGF38340), una secuencia que codifica para lipasa (5248–6678) seleccionada/modificada de la secuencia de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (AAU10321) la que puede usar butanol y etanol, un terminador de 308-pb *rbcS* de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (6679–6986), y un partidor PCR RE (6987–7006) en el extremo 3'. El uso de este constructo de ADN (SEQ ID NO: 216) permite la evolución y selección aumentada para células de *Synechococcus* productoras de alcohol-biodiesel con la proteína de resistencia a tetraciclina.

La SEQ ID NO:217 presenta el ejemplo 217 de un constructo de ADN con un factor de transcripción y proteína tolerante a glifosato alcohol-inducible de *Prochlorococcus marinus* MIT9313 (5556 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), una secuencia regulatoria de un promotor transcripcional alcohol-inducible σ^{54} (20–4047) seleccionada/modificada del factor BmoR y sus secuencias promotoras asociadas (AY093933) de *Thauera butanivorans*, una secuencia que codifica para un marcador de selección (4048–5415) seleccionada de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa tolerante a Glifosato (GenBank: AEM75108), un terminador de 121-pb *rbcS* de *Prochlorococcus marinus* MIT9313(5416–5536), y un partidor PCR RE (5537–5556).El uso de este constructo de ADN (SEQ ID NO: 217) permite la evolución y selección aumentada para células de *Prochlorococcus* con una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa tolerante a Glifosato.

La SEQ ID NO: 218 presenta el ejemplo 218 de un constructo de ADN con un factor de transcripción seleccionable nitrato reductasa y alcohol-inducible de *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (6500 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20) una secuencia regulatoria de un promotor transcripcional alcohol-inducible σ^{54} (20–4047) seleccionada/modificada del factor BmoR y sus secuencias promotoras asociadas (AY093933) de *Thauera butanivorans*, una secuencia que codifica para un marcador de selección (4048–6279) seleccionada de la secuencia de la nitrato reductasa de *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (GenBank: ACB50564), un terminador de 201-pb *rbcS* de *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (6278–6480), y un partidor PCR RE (6481–6500). El uso de este constructo de ADN (SEQ ID NO: 218) permite la evolución y selección

aumentada para células de *Cyanothecea* través del uso de complementación con nitrato sin requerir el uso de un gen de resistencia a antibióticos.

La SEQ ID NO: 219 presenta el ejemplo 219 de un constructo de ADN con un factor de transcripción y alcohol-inducible para cetoácido reductoisomerasa/dihidroxi ácido deshidratasa de *Anabaena* PCC (7187 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), una secuencia regulatoria de un promotor transcripcional alcohol-inducible σ^{54} (20–4047) seleccionada/modificada del factor BmoR y sus secuencias promotoras asociadas (AY093933) de *Thauera butanivorans*, una secuencia que codifica para un marcador de selección (4048–6735) seleccionada/modificada de la Cetoácido reductoisomerasa (GenBank: BAB74014) de *Anabaena* PCC 7120 y la dihidroxi ácido deshidratasa (NP_486811) de *Anabaena* PCC 7120, un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc sp.* cepa PCC 7120(6736–7167), y un partidor PCR RE (7168–7187) en el extremo 3'. El uso de este constructo de ADN (SEQ ID NO: 219) permite la evolución y selección aumentada para células de *Anabaena* basado en la complementación con nutrientes (valina, leucina e isoleucina) sin requerir el uso de genes de resistencia a antibióticos.

La SEQ ID NO: 220 presenta el ejemplo 220 de un constructo de ADN con un factor de transcripción, alcohol y argininosuccinato liasa-inducible para Lipasa de *Anabaena* PCC 7120 (5885 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), una secuencia regulatoria de un promotor transcripcional alcohol-inducible σ^{54} (20–4047) seleccionada/modificada del factor BmoR y sus secuencias promotoras asociadas (AY093933) de *Thauera butanivorans*, una secuencia que codifica para un marcador de selección(4048–5433) seleccionado de la argininosuccinato liasa de *Anabaena* PCC 7120 (NP_487927), un terminador de 432-pb *gor* de *Nostoc sp.* cepa PCC 7120 (5434–5865), y un partidor PCR RE (5866–5885) en el extremo 3'. El uso de este constructo de ADN (SEQ ID NO: 220) permite la evolución y selección aumentada para células productoras de alcohol de *Anabaena* basado en la complementación con el nutriente arginina sin requerir el uso de genes de resistencia a antibióticos.

Creación de Autótrofos para Generar Transformantes sin Marcadores de Selección Antibióticos

De acuerdo a una de varias representaciones, autótrofos basados en nutrientes son creados por la eliminación de un “gen de nutriente” esencial tal como un gen esencial para la síntesis de arginina (argininosuccinato liasa (*arg7*)) el que es requerido para sintetizar arginina, o cetoácido reductoisomerasa (54) y dihidroxi ácido deshidratasa (55) los que son requeridos para fabricar los precursores para sintetizar valina, leucinae isoleucina, o el gen de la nitrato reductasa el que es esencial para utilizar el nutriente nitrato en el organismo huésped. La eliminación de un gen nutricional esencial se logra poniendo un marcador de selección por antibiótico en el lugar del gen del nutriente esencial o cortando el gen. Por ejemplo, el autótrofo creado por eliminación de la cetoácido reductoisomerasa (54) y dihidroxi ácido deshidratasa (55) puede crecer solamente en un medio que está suplementado con valina, leucinae isoleucina. Similarmente, el autótrofo de arginina puede crecer solamente en un medio que está suplementado con arginina mientras que el autótrofo de nitrato que no puede reducir el nitrato para hacer el amonio requerido puede crecer en un medio suplementado con amonio pero no en un medio suplementado con nitrato como única fuente de nitrógeno. Por lo tanto, los genes de la cognato argininosuccinato liasa (*arg7*) (*narG* y *napA*) o los genes de la cetoácido reductoisomerasa (54) y dihidroxi ácido deshidratasa (55) pueden ser usados como marcador de selección basados en la complementación con nutrientes usando sus correspondientes autótrofos como organismos huéspedes para la transformación genética.

De acuerdo a una de varias representaciones, cuando el constructo de ADN de los genes de diseño para las vías de producción de biocombustibles están completamente optimizados y listos para aplicaciones comerciales, el constructo de ADN es luego fusionado con el gen de la cognato argininosuccinato liasa (*arg7*) o los genes de la nitrato reductasa (*narG* y *napA*) como el marcador de selección. El marcador de selección antibiótico del autótrofo puede ser entonces completamente removido a través de recombinación homóloga con el constructo de ADN de diseño fusionado con el gen de la cognato argininosuccinato liasa (*arg7*) o los genes de la nitrato reductasa (*narG* y *napA*) como marcador de selección. En este ejemplo, cuando el marcador de selección antibiótico es removido, el gen de la cognato argininosuccinato liasa (*arg7*) o los genes de la nitrato reductasa (*narG* y *napA*) es restaurado por la incorporación del constructo de ADN de diseño en el huésped autótrofo. Este proceso resulta en una

nueva cepa transgénica que contiene el constructo de ADN deseado con los genes para las vías totalmente optimizadas de producción de biocombustibles sin ningún marcador selectivo de resistencia a antibióticos para una mejor bioseguridad.

Expresión de Polipéptidos con Carga Positiva de Diseño en la superficie Celular que Permite la Auto-Floculación para Aumentar la Recolección de Células Microbiales

La recolección de células microalgales desde un cultivo líquido es un desafío técnico significativo para lograr una recolección de bajo costo de la biomasa algal productora de biodiesel y otros productos algales de valor. Las dificultades técnicas provienen del hecho que microbios como las algas y cianobacterias tienen tamaños de micrómetros y sus membranas celulares típicamente contienen cargas negativas tales como las cabezas con carga negativa de los fosfolípidos de membrana plasmática. Las cargas negativas de la superficie de las células microbiales generalmente las mantienen alejadas unas de las otras, lo que representa un problema serio al tratar de recolectarlas desde un cultivo líquido. De acuerdo a una de varias representaciones, y como se muestra en la Fig. 20, este desafío técnico se puede superar al expresar algunos polipéptidos con carga positiva tales como polilisina en la superficie externa de las células microbiales para neutralizar las cargas de la superficie celular de manera tal que las células se pueden agregar juntar resultando en una auto-floculación que aumenta dramáticamente la recolección de células microbiales tales como algas desde un cultivo líquido. Los polipéptidos de diseño con carga positiva para expresión en la superficie de células microbiales son seleccionadas del grupo consistente en polipéptidos ricos en residuos de lisina, polipéptidos ricos en residuos de arginina, polipéptidos ricos en residuos de histidina, polipéptidos ricos en residuos de lisina y arginina, polipéptidos ricos en residuos de lisina e histidina, polipéptidos ricos en residuos de lisina, arginina e histidina, polilisina fusionada con lipasa, polilisina fusionada con lipasa y poliamina, polipéptidos con carga positiva fusionados con lipasa, polilisina fusionada con lipasa y proteína fluorescente, y polipéptidos con carga positiva fusionados con lipasa y proteína fluorescente, y/o combinaciones de estos.

De acuerdo a una de varias representaciones, la secuencia de ADN de diseño de un polipéptido con carga positiva es fusionado con el gen de una proteína de superficie celular mediante biología sintética. Las células de microalga tipo silvestre con superficie

celulares con carga negativa se repelen unas a otras formando una suspensión estable. La expresión de diseño de polipéptidos con carga positiva en las superficies celulares es usada para desestabilizar esta suspensión mediante neutralización de la carga. Las células de alga electrostáticamente desestabilizadas en el medio de cultivo líquido se juntan entre ellas debido a la atracción mediada por fuerzas de Van der Waals. En el caso de polipéptidos del tipo poliamina tales como polilisina, las moléculas de cadena larga facilitan la agregación por un mecanismo de *bridging*, a través del cual las cadenas de polilisina establecen enlaces con las células vecinas por atracción de carga electrostática y neutralización.

De acuerdo a una de varias representaciones, el péptido con carga positiva de diseño es fusionado con una lipasa de diseño y/o a una proteína fluorescente verde para la expresión inducible en la superficie celular microbial. Por ejemplo, cuando un cultivo celular microbial tal como un cultivo líquido de microalgas es crecido y está listo para la producción de biodiesel, el gen de diseño que codifica para un polipéptido con carga positiva fusionado con la lipasa y/o proteína fluorescente verde es expresado en la superficie de la célula huésped. La proteína fluorescente verde sirve como un reportero que puede ser fácilmente visualizado bajo un microscopio de fluorescencia. La expresión inducida de los polipéptidos con carga positiva de diseño en la superficie celular lleva a la auto-floculación para la recolección aumentada de la biomasa algal. La lipasa expresada en la superficie celular es perfecta para su uso como biocatalizador para la transesterificación de los lípidos algales y/o otros aceites vegetales, grasas animales, aceites de cocina de desecho para producir biodiesel.

La SEQ ID NO. 221 presenta el ejemplo 221 de un constructo de ADN controlado por el promotor Nial para proteína tipo ZYS1 de superficie celular-poliamina-polilisina (1479 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb Nial (nitrato reductasa) de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), proteína tipo ZYS1 de superficie celular (XP_001700395) de 418-pb de *Chlamydomonas reinhardtii* (189–627), una secuencia que codifica para poliamina de 481-pb (628–1153) seleccionada/modificada de la proteína tipo poliamina (CAJ76166) de *Streptococcus salivarius*, una secuencia que codifica para polilisina sintética de 90-pb más un codón de detención (1154–1246), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas reinhardtii*(1247–1459), y un partidor PCR RE (1460–1479).

La SEQ ID NO. 222 presenta el ejemplo 222 de un constructo de ADN controlado por el promotor Nial para proteína tipo ZYS1 de superficie celular-poliamina-lipasa-polilisina (2717 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb Nial (nitrato reductasa) de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), una proteína de superficie tipo fascilina (XP_001698887) de 598-pb de *Chlamydomonas reinhardtii* (189–839), una secuencia que codifica para poliamina de 478-pb (840–1355) seleccionada/modificada de la proteína tipo poliamina (CAJ76166) de *Streptococcus salivarius*, una secuencia de Lipasa (1356–2381) seleccionada/modificada de la Lipasa de *Candida antarctica* (CAA83122), una secuencia que codifica para polilisina sintética de 90-pb más un codón de detención (2382–2474), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas reinhardtii* (2475–2697), y un partidor PCR RE (2698–2717).

La SEQ ID NO. 223 presenta el ejemplo 223 de un constructo de ADN controlado por el promotor Nial para proteína tipo ZYS1 de superficie celular-poliamina-lipasa-poliamina-polilisina (3617 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 2 x 84-pb Nial (nitrato reductasa) de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), una proteína de superficie tipo fascilina (XP_001698887) de 598-pb de *Chlamydomonas reinhardtii*, una secuencia que codifica para poliamina de 478-pb (840–1355) seleccionada/modificada de la proteína tipo poliamina (CAJ76166) de *Streptococcus salivarius*, una secuencia de Lipasa (1356–2447) seleccionada/modificada de la Lipasa (M58494) de *Burkholderia cepacia* una secuencia que codifica para poliamina (2448–3281) seleccionada/modificada de la proteína poliamina ABC (ADR25157) de *Mycoplasma bovis*, una secuencia que codifica para polilisina sintética de 90-pb más un codón de detención (3282–3374), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas reinhardtii* (3375–3597), y un partidor PCR RE (3598–3617).

La SEQ ID NO. 224 presenta el ejemplo 224 de un constructo de ADN controlado por el promotor Nial para proteína tipo ZYS1 de superficie celularlipasa -poliamina –polilisina (2687 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20 un promotor de 2 x 84-pb Nial (nitrato reductasa) de *Chlamydomonas reinhardtii* (21–188), una proteína de superficie tipo fascilina (XP_001698887) de 601-pb de *Chlamydomonas reinhardtii* (189–839), una secuencia de Lipasa (840–1931) seleccionada/modificada de la Lipasa (M58494) de *Burkholderia cepacia*, una secuencia tipo polilisina (1932–2351) seleccionada/modificada de la proteína polilisina de *Rhodnius prolixus* (AAQ20830),

una secuencia que codifica para polilisina sintética de 90-pb más un codón de detención (2352–2454), un terminador de 223-pb *RbcS2* de *Chlamydomonas reinhardtii* (2455–2667), y un partidor PCR RE (2668–2687).

Nótese, el uso de la SEQ ID NO. 221 en la transformación genética de un organismo fotosintético eucariota tal *Chlamydomonas* puede crear un alga eucariota de diseño tal como *Chlamydomonas* de diseño, en donde las células algales en su masa de cultivo líquido pueden auto-flocular de manera inducible para aumentar la recolección de la biomasa algal luego de la inducción de proteína de superficie celular tipo ZYS1-poliamina-polilisina- controlado por el promotor Nia1 (codificado por la SEQ ID NO: 221). Por ejemplo, en un medio mínimo basado en amonio, este *Chlamydomonas* de diseño puede crecer fotoautotróficamente tal como un organismo tipo silvestre usando el CO₂ atmosférica como única fuente de carbono. Cuando el cultivo de *Chlamydomonas* de diseño está crecido y listo para la recolección de la biomasa algal, se induce la expresión de la proteína de superficie celular tipo ZYS1-poliamina-polilisina- controlado por el promotor Nia1 (codificado por la SEQ ID NO: 221) es inducido por la adición de nitrato en el medio de cultivo líquido (debido a la expresión del gen controlado por el promotor Nia1). La expresión inducida de la proteína de superficie celular tipo ZYS1-poliamina-polilisina- controlado por el promotor Nia1 (codificado por la SEQ ID NO: 221) pronto lleva a la auto-floculación la que aumenta considerablemente la recolección de la biomasa algal desde un cultivo líquido.

Similarmente, el uso de las SEQ ID NOS. 222, 223 o 224 en la transformación genética de un organismo fotosintético eucariota tal *Chlamydomonas* puede crear un alga eucariota de diseño tal como *Chlamydomonas* de diseño, en donde las células algales en su cultivo líquido pueden auto-flocular de manera inducible para aumentar la recolección de la biomasa algal luego de la expresión de la Lipasa-polilisina de diseño en la superficie celular (codificado por las SEQ ID NO: 222, 223 o 224). En este ejemplo, la lipasa es fusionada con una proteína de superficie celular y una polilisina para la expresión en la superficie celular junto con la cola de polilisina larga como se muestra en la Fig. 20. La enzima lipasa expresada de esta manera en la superficie de las células algales es perfecta para su uso como catalizador para la transesterificación no solo de lípidos algales, pero también de otros aceites vegetales, aceites de cocina de desecho, y/o grasas animales para producir biodiesel como se reveló más arriba.

Por lo tanto, la co-expresión de lipasa-polilisina en la superficie celular de las algas produce un gran valor para la recolección mejorada de la biomasa y la producción catalítica de biodiesel.

Consecuentemente, el uso de las SEQ ID NOS. 221, 129–133, 151–153, 140 y 141 (o 142) en un organismo eucariota huésped algal tal como *Chlamydomonas* constituye un alga eucariota transgénica de diseño tal como *Chlamydomonas* de diseño con vías mejoradas canalizadas con el ciclo de Calvin, derivadas de 3-fosfoglicerato y dependientes de NADPH (**03–05, 34, 35, 53–55, 42, y 43 (44)** en la Figura 6) para la producción fotobiológica de isobutanol a partir de dióxido de carbono y agua, en donde las células algales en su masa de cultivo líquido pueden auto-flocular para la recolección aumentada de la biomasa de algas luego de la inducción la proteína de superficie celular tipo ZYS1-poliamina-polilisina- controlado por el promotor Nia1(codificado por la SEQ ID NO: 221). Similarmente, el uso de las SEQ ID NO: 222 (y/o 223 o 204), 213 y 1–12 en un organismo eucariota fotosintético huésped tal como *Chlamydomonas* constituye otra alga eucariota de diseño tal como *Chlamydomonas* de diseño con vías de diseño derivadas de gliceraldehídos-3-fosfato de producción de butanol (**01-12** en La Figura 1), en donde el butanol producido es simultáneamente y/o subsecuentemente usado por una lipasa (codificado por la SEQ ID NO: 213) en la transesterificación de triglicéridos y/oácidos grasos para la producción de biodiesel. Aún más, las células algales en su masa de cultivo líquido pueden auto-flocular de manera inducible para una recolección mejorada de la biomasa luego de la inducción la proteína de superficie celular tipo ZYS1-poliamina-lipasa- polilisina- controlado por el promotor Nia1 (codificado por la SEQ ID NO: 222 (y/o 223 o 204) como se ilustra en la Fig. 20. La enzimalipasaexpresada de esta manera en la superficie de las células algales es perfecta para su uso como catalizador de la transesterificación de lípidos de algas, otros aceites vegetales, aceites de cocina de desecho, y/o grasa animal para producir biodiesel tal como se reveló más arriba.

Similarmente, la expresión la proteína de superficie celular tipo ZYS1-poliamina-lipasa-polilisina- controlado por el promotor Nia1 (codificada por las SEQ ID NO: 222 (y/o 223 o 204)) en otras algas eucariotas tal como *Botryococcus braunii*, o*Scenedesmus obliquus* representa un alga eucariota de diseño tal como *Botryococcus* de diseño, o *Scenedesmus* de diseño, en donde las células algales en su masa de cultivo líquida

puede auto-flocular de manera inducible para la recolección aumentada de la biomasa algal luego de la expresión de la Lipasa unida a superficie celular-polilisina (codificada por las SEQ ID NO: 222, 223 o 224). Aún más, la expresión de la proteína de superficie celular tipo ZYS1-poliamina-lipasa- polilisina- controlado por el promotor Nia1 (codificada por las SEQ ID NO: 222 (y/o 223 o 204)) en combinación con vías de diseño de producción de alcohol-biodiesel tal como la vía de diseño de producción de metanol-biodiesel (**109**, **110**, **43/44**, y **106** numéricamente etiquetados en la Figura 18) en un alga eucariota huésped tal como *Botryococcus braunii*, o *Scenedesmus obliquus* representa otra alga productora de alcohol-biodiesel con la capacidad de auto-flocular. De acuerdo a una de varias representaciones, el alga eucariota para su uso como organismo huésped en la transformación genética con constructo de ADN de diseño para permitir la auto-floculación y la producción de biodiesel son seleccionados del grupo consistente en: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Platymonas subcordiformis*, *Chlorella fusca*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, '*Chlorella*' *ellipsoidea*, *Chlorella* spp., *Dunaliella salina*, *Dunaliella viridis*, *Dunaliella bardowil*, *Haematococcus pluvialis*; *Parachlorella kessleri*, *Betaphycus gelatinum*, *Chondrus crispus*, *Cyanidioschyzon merolae*, *Cyanidium caldarium*, *Galdieria sulphuraria*, *Gelidiella acerosa*, *Gracilaria changii*, *Kappaphycus alvarezii*, *Porphyra miniata*, *Ostreococcus tauri*, *Porphyra yezoensis*, *Porphyridium* sp., *Palmaria palmata*, *Gracilaria* spp., *Isochrysis galbana*, *Kappaphycus* spp., *Laminaria japonica*, *Laminaria* spp., *Monostroma* spp., *Nannochloris bacillaris*, *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis oculata*, *Porphyra* spp., *Porphyridium* spp., *Undaria pinnatifida*, *Ulva lactuca*, *Ulva* spp., *Undaria* spp., *Phaeodactylum Tricornutum*, *Navicula saprophila*, *Cryptothecodinium cohnii*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Cyclotella cryptica*, *Euglena gracilis*, *Amphidinium* sp., *Symbiodinium microadriaticum*, *Macrocystis pyrifera*, *Ankistrodesmus braunii*, *Ankistrodesmus convolutus*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Ankistrodesmus stipitatus*, *Botryococcus braunii*, *Pavlova salina*, *Pavlova lutheri*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus rotundus*, *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus* sp. Ki4, *Scenedesmus* sp. LU4, *Scenedesmus quadricaudus*, y *Scenedesmus obliquus*.

SEQ ID NO: 225 presenta el ejemplo 225 de un constructo de ADN de diseño controlado por el promotor nirA para proteína fluorescente verde unido superficie

celular-lipasa-polilisina (3205 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 89-pb de la nitrito-reductasa nirA de *Synechocystis sp.* cepa PCC 6803 (21–109), una secuencia de proteína de superficie (110–508) seleccionada de la secuencia de la proteína secretada MPB70 (BAA17432) de *Synechocystis sp.* PCC 6803, una secuencia de 714-pb (509–1222) de la proteína fluorescente verde (ACY56286); una secuencia que codifica para la enzima (1223–2398) seleccionada de la Lipasa de *Rhizopus oryzae* (GenBank: ACW84344) que puede usar metanol, una secuencia tipo polilisina (2399–2683) seleccionada de la secuencia de la polilisina (XP_001291750) de *Trichomonas vaginalis* G3, una secuencia de 90-pb para polilisina sintética más un codón de detención (2684–2776), un terminador de 409-pb rbcS de *Synechocystis sp.* PCC 6803 (2778–3185), y un partidor PCR RE (3186–3205).

Nótese, el uso de La SEQ ID NO. 225 en la transformación genética de un organismo fotosintético tal como *Synechocystis sp.* cepa PCC 6803 puede crear una cianobacteria de diseño tal como *Synechocystis* de diseño, en donde las células cianobacteriales en su masa de cultivo líquido pueden auto-flocular de manera inducible para aumentar la recolección de su biomasa luego de la inducción de la proteína de superficie celular unida proteína fluorescente verde -lipasa- polilisina- controlado por el promotor nirA (codificado por la SEQ ID NO: 225). La proteína fluorescente verde permite la visualización conveniente de la proteína de fusión expresada en la superficie celular bajo un microscopio de fluorescencia. La enzima lipasa expresada de esta manera en la superficie de las células cianobacteriales es perfecta para su uso como catalizador para la transesterificación no solo de lípidos cianobacteriales, sino que además de aceites de otras algas, aceites vegetales, aceites de cocina de desecho, y/o grasas animales para producir biodiesel como se reveló más arriba. Consecuentemente, el uso de las SEQ ID NOS. 225, 208 y 199–201 en una célula microbial huésped tal como la cianobacteria *Synechocystis sp.* cepa PCC 6803 constituye un *Synechocystis* de diseño con vías de producción de metanol-biodiesel **109**, **110**, **43/44** y **106** en la Figura 18), en donde las células cianobacteriales en su cultivo líquido pueden auto-flocular para una recolección aumentada de su biomasa luego de la inducción de la de la proteína de superficie celular unida proteína fluorescente verde -lipasa- polilisina- controlado por el promotor nirA (codificado por la SEQ ID NO: 225).

La SEQ ID NO: 226 presenta el ejemplo 226 de un constructo de ADN de diseño para la proteína de superficie celular-unida-a-lipasa-polilisina controlada por el promotor nirA (2062 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), un promotor de 231-pb nirA de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (21-251), una secuencia para la proteína de superficie celular (252-551) seleccionada de las primeras 300-pb de la glicosiltransferasa (NP_681159) de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, una secuencia que codifica para la enzima (552–1424) seleccionada/modificada de la lipasa (ABV69592) de *Thermomyces lanuginosus* la que puede usar metanol y etanol, una secuencia tipo polilisina (1425–1709) seleccionada de la secuencia de la proteína polilisina (XP_001291750) de *Trichomonas vaginalis* G3, una secuencia de un péptido con carga positiva (1710–1829) seleccionada de la proteína cargada (NP_597749) de *Tobacco mosaic virus*, una secuencia de 90-pb para polilisina sintética más un codón de detención (1830–1922), un terminador de 120-pb *rbcS* de BP1 (1923–2042), y un partidor PCR RE (2043–2062) en el extremo 3’.

Nótese, el uso de La SEQ ID NO. 226 en la transformación genética de un organismo fotosintético tal como *Thermosynechococcus elongatus* puede crear una cianobacteria de diseño tal como *Thermosynechococcus* de diseño, en donde las células cianobacteriales en su masa de cultivo líquido pueden auto-flocular de manera inducible para aumentar la recolección de su biomasa luego de la expresión de la proteína de superficie celular-unida-a-lipasa-polilisina controlada por el promotor nirA (codificado por La SEQ ID NO: 226). La lipasa termotolerante es expresada de esta manera en la superficie de las células cianobacteriales es perfecta para su uso como catalizador para la transesterificación no solo de lípidos cianobacteriales, sino que además de aceites de otras algas, aceites vegetales, aceites de cocina de desecho, y/o grasas animales para producir biodiesel como se reveló más arriba. Consecuentemente, el uso de las SEQ ID NOS. 226, 206, 207, 204, y 58–62 en una célula microbial huésped incluye (pero no se limita a) células bacteriales tal como una cianobacteria *Thermosynechococcus elongatus* la que representa una cianobacteria de diseño tal como *Thermosynechococcus* de diseño con una vía fotoautotrófica de producción de etanol-biodiesel (Fig. 20), en donde las células termofílicas cianobacteriales en su masa de cultivo líquida pueden auto-flocular de manera inducible para la recolección aumentada de su biomasa luego de la expresión de la

proteína de superficie celular-unida-a-lipasa-polilisina controlada por el promotor nirA (codificado por La SEQ ID NO: 226)

La SEQ ID NO: 227 presenta el ejemplo 227 de un constructo de ADN de diseño para la proteína de superficie celular-unida-a-lipasa-polilisina controlada por el promotor nirA de *Arthrospira platensis* (2053 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), una secuencia de proteína de superficie celular (21–662) seleccionada del dominio de proteína fascilina NIES-39 (YP_005067833) de *Arthrospira platensis*, una secuencia que codifica para la enzima (663–1545) seleccionada/modificada de la secuencia de lalipasa (ABV69592) de *Thermomyces lanuginosus* que puede usar metanol y etanol, una secuencia tipo polilisina (1546–1820) seleccionada de la secuencia de la proteína polilisina (XP_001291750) de *Trichomonas vaginalis* G3 polylysine, una secuencia de péptido con carga positiva (1821–1940) seleccionada de la proteína cargada (NP_597749) de *Tobacco mosaic virus*, una secuencia de 90-pb para polilisina sintética más un codón de detención (1941–2033), y un partidor PCR RE (2034–2053) en el extremo 3’.

La SEQ ID NO: 228 presenta el ejemplo 228 de un constructo de ADN de diseño unido a una lipasa-GFP-polilisina de superficie de *Arthrospira platensis* (2971 pb) que contiene un partidor PCR FD (secuencia 1–20), una secuencia de proteína de superficie (21–419) seleccionada de la beta-Ig-fascilina (EKD10810) de *Arthrospira platensis* (420–1319) selecciona/modificada de las secuencias de la lipasa de *Enterobacter aerogenes* (KHM31672) la que puede usar metanol, una secuencia de una proteína fluorescente verde (1320–2033) seleccionada de una secuenciade GFP (AGT40311), una secuencia tipo polilisina (2034–2453) seleccionada de la secuencia tipo polilisina de *Rhodnius prolixus* (AAQ20830), una secuencia tipo polilisina (2454–2738) seleccionada de la secuencia de polilisina de *Trichomonas vaginalis* G3 (XP_001291750), una secuencia de un péptido con carga positiva (2739–2858) seleccionada de la proteína cargada del virus *Tobacco mosaic* (NP_597749), una secuencia de 90-pb que codifica para polilisina más un codón de detención (2859–2951), y un partidor PCR RE (2952–2971) en el extremo 3’.

Nótese, el uso de las SEQ ID NO. 227 en la transformación genética de un organismo fotosintético tal como *Arthrospira platensis* puede crear una cianobacteria de diseño tal como *Arthrospira platensis* de diseño en donde las células cianobacteriales en su masa

de cultivo líquida pueden auto-flocular de manera inducible para la recolección aumentada de su biomasa luego de la expresión de la lipasa unida con polilisina en la superficie celular de *Arthrospira platensis* de diseño (codificado por SEQ ID NO: 227). La enzima lipasa expresada de esta manera en la superficie de las cianobacterias es perfecta para su uso como catalizador en la transesterificación no solo de los lípidos de las cianobacterias, sino que también de los aceites de algas, aceites vegetales, aceites de cocina de desecho, y/o grasas animales para producir el biocombustible revelado más arriba. Similarmente, el uso de la SEQ ID NO. 228 en una célula huésped microbial incluyendo (pero no limitado a) una célula bacteriana de la cianobacteria *Arthrospira platensis* representa una cianobacteria de diseño, en donde las células cianobacteriales en su masa líquida de cultivo puede auto-flocular de manera inducible para la recolección mejorada de su biomasa luego de la expresión de la lipasa unida con polilisina-GFP en la superficie celular de *Arthrospira platensis* de diseño (codificado por SEQ ID NO: 228).

La SEQ ID NO: 229 presenta el ejemplo 229 de un constructo de ADN de diseño unido a una lipasa-polilisina de superficie de *Phaeodactylum tricornutum* (2524 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), una secuencia de proteína de superficie (21–806) seleccionada de la proteína de superficie de *Phaeodactylum tricornutum* (EEC44540), una secuencia que codifica para la enzima (807–1706) seleccionada/modificada de la secuencia de la lipasa de *Enterobacter aerogenes* (KHM31672) que puede usar metanol, una secuencia tipo polilisina (1708–2126) seleccionada de la secuencia de la polilisina de *Rhodnius prolixus* (AAQ20830), una secuencia tipo polilisina (2127–2411) seleccionada de la secuencia de polilisina de *Trichomonas vaginalis* G3(XP_001291750), una secuencia de 90-pb que codifica para polilisina más un codón de detención (2412–2504), y un partidor PCR RE (2505–2524) en el extremo 3'.

Nótese, el uso de la SEQ ID NO. 229 en un organismo fotosintético huésped como la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* representa una diatomea de diseño, en donde las células cianobacteriales en su masa líquida de cultivo pueden auto-flocular de manera inducible para la recolección mejorada de su biomasa luego de la expresión de la lipasa unida con polilisina en la superficie celular de *Phaeodactylum tricornutum* de diseño (codificada por La SEQ ID NO: 229). La enzima lipasa expresada de esta

manera en la superficie de las cianobacterias es perfecta para su uso como catalizador en la transesterificación no solo de los lípidos de las diatomeas, sino que también de los aceites de algas, aceites vegetales, aceites de cocina de desecho, y/o grasas animales para producir el biocombustible revelado más arriba.

La SEQ ID NO: 230 presenta el ejemplo 230 de un constructo de ADN de diseño unido a una lipasa-polilisina de superficie de la cianobacteria desértica *Microcoleus vaginatus* (2317 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), una secuencia de proteína de superficie (21–599) seleccionada de la beta-Ig-H3/fasciclina (EGK87709) de la cianobacteria desértica *Microcoleus vaginatus*, una secuencia que codifica para la enzima (600–1499) seleccionada/modificada de la secuencia de la lipasa de *Enterobacter aerogenes* (KHM31672) que puede usar metanol, una secuencia tipo polilisina (1500–1919) seleccionada de la secuencia de la polilisina de *Rhodnius prolixus* (AAQ20830), una secuencia tipo polilisina (1920–2204) seleccionada de la secuencia de la polilisina de *Trichomonas vaginalis* G3 (XP_001291750), una secuencia de 90-pb que codifica para polilisina más un codón de detención (2205–2297), y un partidor PCR RE (2298–2317) en el extremo 3’.

Nótese, el uso de La SEQ ID NO. 230 en un organismo fotosintético huésped como *Microcoleus vaginatus* representa una cianobacteria de diseño, en donde las células cianobacteriales en su masa líquida de cultivo pueden auto-flocular de manera inducible para la recolección mejorada de su biomasa luego de la expresión de la lipasa unida con polilisina en la superficie celular de *Microcoleus vaginatus* de diseño (codificada por la SEQ ID NO: 230). La enzima lipasa expresada de esta manera en la superficie celular es perfecta para su uso como catalizador en la transesterificación no solo de los lípidos de las algas verde-azules, sino que también de los aceites de algas, aceites vegetales, aceites de cocina de desecho, y/o grasas animales para producir el biocombustible revelado más arriba.

SEQ ID NO: 231 presenta el ejemplo 231 de un constructo de ADN de diseño unido a una lipasa-polilisina de superficie de *Methanosarcina barkeri* (4552 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuencia 1–20), una secuencia de proteína de superficie (21–2834) seleccionada de la proteína de superficie celular de *Methanosarcina barkeri* (YP_306783), una secuencia que codifica para la enzima (2835–3734) seleccionada/modificada de la secuencia de la lipasa (KHM31672) de *Enterobacter*

aerogenes la que puede usar metanol, una secuencia tipo polilisina (3735–4154) seleccionada de la secuencia de la polilisina de *Rhodnius prolixus* (AAQ20830), a una secuencia tipo polilisina (4152–4439) seleccionada de la secuencia de la polilisina de *Trichomonas vaginalis* G3 (XP_001291750), una secuencia de 90-pb que codifica para polilisina más un codón de detención (4440–4532), y un partidor PCR RE (4533–4552) en el extremo 3'.

Nótese, el uso de la SEQ ID NO. 231 en un organismo fotosintético huésped metanógeno como *Methanosarcina barkeri* que puede crecer hidrogenotróficamente usando H₂ y CO₂ representa una bacteria hidrogenotrófica de diseño tal como *Methanosarcina* de diseño, en donde las células hidrogenotróficas bacteriales en su masa líquida de cultivo pueden auto-flocular de manera inducible para la recolección mejorada de su biomasa luego de la expresión de la lipasa unida con polilisina en la superficie celular de *Methanosarcina barkeri* (codificado por SEQ ID NO: 231). Ya que *Methanosarcina* puede crecer de manera hidrogenotrófica usando H₂ y CO₂ como fuentes de energía y carbono, las SEQ ID NO. 231 (lipasa) en combinación con formiato Deshidrogenasa (F_{ate}DH) **109**, formaldehído Deshidrogenasa (F_{ald}DH) **110**, y alcohol Deshidrogenasa (ADH) **43** (o **44**) (codificadas por genes de diseño tales como SEQ ID NOS. 199–201 o 202–204) constituyen un organismo hidrogenotrófico de diseño para la producción de biodiesel a partir de H₂ y CO₂ a través de vías de producción de metanol-biodiesel (Figs. 18 y 19). Aún más, la enzima lipasa expresada de esta manera en la superficie celular es perfecta para su uso como catalizador en la transesterificación no solo de los lípidos bacteriales hidrogenotróficos, sino sino que también de los aceites de algas, aceites vegetales, aceites de cocina de desecho, y/o grasas animales para producir el biocombustible revelado más arriba.

SEQ ID NO: 232 presenta el ejemplo 232 of de un constructo de ADN de diseño unido a una lipasa-polilisina de superficie y controlado por el promotor *nirA* de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (2533 pb) que incluye un partidor PCR FD (secuenciado pb 1–20), un promotor de 88-pb *nirA* (21–108) seleccionado de la secuencia del gen del promotor de la nitrito reductasa de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (cianobacteria de agua dulce), una secuencia de proteína de superficie (109–507) seleccionada de la Beta-Ig-H3/fasciclina (ABB58124) de *Synechococcus elongatus* PCC 7942, una secuencia que codifica para lipasa (508–1407) seleccionada/modificada de la secuencia de la lipasa

(KHM31672) de *Enterobacter aerogenes* la que puede usar metanol, una secuencia tipo polilisina (1408–1827) seleccionada de la secuencia de la polilisina de *Rhodnius prolixus* (AAQ20830), una secuencia tipo polilisina (1828–2112) seleccionada de la secuencia de la polilisina de *Trichomonas vaginalis* G3 (XP_001291750), una secuencia de 90-pb que codifica para polilisina más un codón de detención (2113–2205), un terminador de 308-pb *rbcS* de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (2206–2513), y un partidor PCR RE (2514–2533) en el extremo 3’.

Nótese, el uso de la SEQ ID NO. 232 en un organismo fotosintético huésped tal como *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 representa una cianobacteria de diseño, en donde las células cianobacteriales en su masa líquida de cultivo pueden auto-flocular de manera inducible para la recolección mejorada de su biomasa luego de la expresión de de la lipasa unida con polilisina y controlada por el promotor *nirA* en la superficie celular de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (codificada por la SEQ ID NO: 232). La enzima lipasa expresada de esta manera en la superficie celular es perfecta para su uso como catalizador en la transesterificación no solo de los lípidos de las algas verde-azules, sino que también de los aceites de algas, aceites vegetales, aceites de cocina de desecho, y/o grasas animales para producir el biocombustible revelado más arriba. Consecuentemente, el uso de la SEQ ID NO. 232 en combinación con SEQ ID NOS: 210 y 95–98 (y/o 99) en un organismo huésped fotosintético tal como *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 representa otra cianobacteria de diseño como *Synechococcus* con vías de diseño fotosintéticas y dependientes de NADPH canalizadas con el ciclo de Calvin y derivadas de 3-fosfoglicerato para la producción mejorada de butanol-biodiesel como se ilustra en las Figuras 4 y 20, en donde las células cianobacteriales en su masa líquida de cultivo pueden auto-flocular de manera inducible para la recolección mejorada de su biomasa luego de la expresión de de la lipasa unida con polilisina y controlada por el promotor *nirA* en la superficie celular de *Synechococcus* sp. cepa PCC 7942 (codificada por la SEQ ID NO: 232).

Aunque la presente invención ha sido ilustrada por la descripción de varias representaciones y aunque las representaciones ilustrativas han sido descritas en considerable detalle, o es la intención del solicitante el restringir de ninguna manera el objetivo de las reivindicaciones que se expresan a continuación en dicho detalle. Ventajas adicionales y modificaciones aparecerán fácilmente para aquellos con

habilidades en el arte. La invención es sus aspectos más amplios no está por lo tanto limitada a los detalles específicos, aparatos representativos y métodos, y los ejemplos ilustrativos mostrados y descritos. Concordantemente, se puede haber alguna discrepancia con estos detalles sin alejarse del espíritu o del objetivo del concepto innovativo del solicitante.