

Biología de  
macromoléculas



# **Producción de proteínas recombinantes en microalgas**

## **Production of recombinant proteins in microalgae**

Trabajo de Fin de Grado

ANTONIA CIONFRINI

Tutorizado por José Manuel Pérez de la Lastra  
Pérez de la Lastra (Instituto de Productos Naturales  
y Agrobiología- CSIC) y Ricardo Guillermo Álvarez  
(Química Orgánica)

Grado en Biología. Septiembre 2017

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Péptidos antimicrobianos .....	5
1.2 Producción de AMPs.....	7
1.3 Cianobacterias como biofactorías .....	8
2. OBJETIVOS .....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1 Microorganismos .....	12
3.2 Condiciones de crecimiento de cianobacteria .....	12
3.3 Secuencias de péptidos antimicrobianos.....	12
3.4 Vectores .....	13
3.5 Kits utilizados y otros métodos.....	15
4. RESULTADOS .....	17
4.1 Amplificación de insertos por PCR y electroforesis en gel de agarosa.....	17
4.2 Purificación de las muestras y cuantificación de DNA.....	18
4.3 Digestión de insertos con enzimas de restricción EcoRI y KpnI .....	19
4.4 Ligación de insertos a vector pSyn_6 y transformación de células competentes E.coli (TOP10) .....	20
4.5 PCR- screening de colonias .....	21
4.6 Miniprep de colonias transformadas aisladas y stock de glicerol .....	22
4.7 Transformación de <i>Synechococcus elongatus</i> con #19.2 .....	23
5. DISCUSIÓN.....	25
6. CONCLUSIONES.....	25
7. BIBLIOGRAFÍA.....	28

## **Lista de abreviaturas**

AMPs (Péptidos antimicrobianos= antimicrobial peptides)

*S. elongatus* (*Synechococcus elongatus*)

*E. coli* (*Escherichia coli*)

TFG (Trabajo de Fin de Grado)

## RESUMEN

El incremento de la resistencia que muestran los microorganismos a los antibióticos convencionales en la actualidad ha llevado a la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos. Los péptidos antimicrobianos (AMPs) se han convertido en alternativa idónea para este fenómeno debido a que son activos a bajas concentraciones, su amplio espectro de acción, presencia en diversos organismos y que su mecanismo de acción inespecífico dificulta al microorganismo desarrollar resistencia al péptido. Las cianobacterias representan una prometedora plataforma para la producción de diversas sustancias tales como AMPs. En este trabajo, se llevan a cabo técnicas de biología sintética y ADN recombinante para introducir en el genoma de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 secuencias que codifiquen péptidos antimicrobianos de interés.

## ABSTRACT

The increase of resistance shown nowadays by microorganisms to conventional antibiotics has led to the research of new antimicrobial agents. Because of this phenomenon, antimicrobial peptides (AMPs) have become a suitable alternative due to their activeness in low concentrations, broad spectrum, their presence in diverse organisms and their inespecific action mechanisms preventing the development of resistance to the peptide. Cyanobacteria represent a hopeful platform for the production of diverse substances such as AMPs. In this project, synthetic biology and recombinant DNA techniques will be performed in order to introduce sequences in the *Synechococcus elongatus* PCC 7942 genome to codify antimicrobial peptides of interest.

**Keywords:** antimicrobial peptides, *Synechococcus elongatus*, cyanobacteria, recombinant DNA, synthetic biology.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Péptidos antimicrobianos

Durante los últimos años, las investigaciones enfocadas en el desarrollo de nuevas moléculas antimicrobianas han ido en aumento debido a la aparición de bacterias resistentes a antibióticos. Esta resistencia se ha visto intensificada en ámbitos hospitalarios, comunidades humanas, animales en entornos naturales y notablemente en suelos (Josephson, 2006; Tavares et al., 2013).

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son moléculas que se han convertido en candidatas idóneas para combatir este fenómeno, ya que están presentes tanto en organismos pluricelulares como en bacterias, son activos a concentraciones muy bajas (desde micro a nanomolar), su espectro de acción es amplio (incluyendo bacterias Gram + y Gram -, hongos, virus y bacterias multirresistentes) y su mecanismo de acción permite que el desarrollo de resistencia al péptido sea muy bajo (Seo, Won, Kim, Mishig-Ochir, & Lee, 2012; Tavares et al., 2013).

El mecanismo principal de acción de los AMPs consiste en dañar la membrana celular del organismo, pero no es el único: también son capaces de modificar las funciones de componentes celulares y actuar como inhibidores del metabolismo de procesos celulares, tales como biosíntesis de la pared celular, ácidos nucleicos y proteínas, siendo la suma de varias inhibiciones la causa de la muerte celular (Brogden, 2005).

Estas proteínas de pequeño tamaño (20-50 aminoácidos) se clasifican en diferentes grupos dependiendo de su secuencia de aminoácidos, conformación y tamaño, pero generalmente comparten propiedades anfipáticas e iónicas. Existen 4 grupos de AMPs: el primer grupo comprende péptidos antimicrobianos aniónicos, requieren zinc como cofactor para la actividad antimicrobiana y son activos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Brogden, Ackermann, & Huttner, 1998). El segundo grupo está compuesto por péptidos catiónicos que carecen de residuos de cisteína y algunas veces tienen una bisagra en el centro. En solución acuosa muchos de estos péptidos no

tienen estructura definida, pero en presencia de trifeniletanol, SDS, micelas, vesículas fosfolipídicas, liposomas o lípido A, toda la molécula o una parte de ésta adopta estructura de  $\alpha$ -hélice (Gennaro & Zanetti, 2000). El tercer grupo está formado por péptidos catiónicos ricos en ciertos aminoácidos como prolina o arginina, pero que carecen de residuos de cisteína (Otvos, 2002). El cuarto grupo está conformado por péptidos catiónicos y aniónicos, los cuales sí contienen residuos de cisteína, que forman enlaces disulfuro y estructuras  $\beta$ -plegadas estables (Otvos, 2002). Las catelicidinas son un ejemplo de péptidos del segundo grupo, los cuales engloban una familia de proteínas de origen mamífero con el mayor espectro de actividad antimicrobiana; estos AMPs atraviesan de forma rápida la célula sin causar daño alguno en su membrana, bloqueando la síntesis bacteriana de ADN y proteínas (Guilhelmelli et al., 2013). El hecho de que este tipo de péptidos, al carecer de una estructura definida en medio acuoso (Gennaro & Zanetti, 2000), y que el cambio de condiciones del medio le confiera conformación de  $\alpha$ -hélice está correlacionada directamente con la actividad bactericida contra Gram + y Gram -; ya que al incrementarse el contenido en  $\alpha$ -hélice, también lo hace su actividad antimicrobiana (Park, Yi, Matsuzaki, Kim, & Kim, 2000).

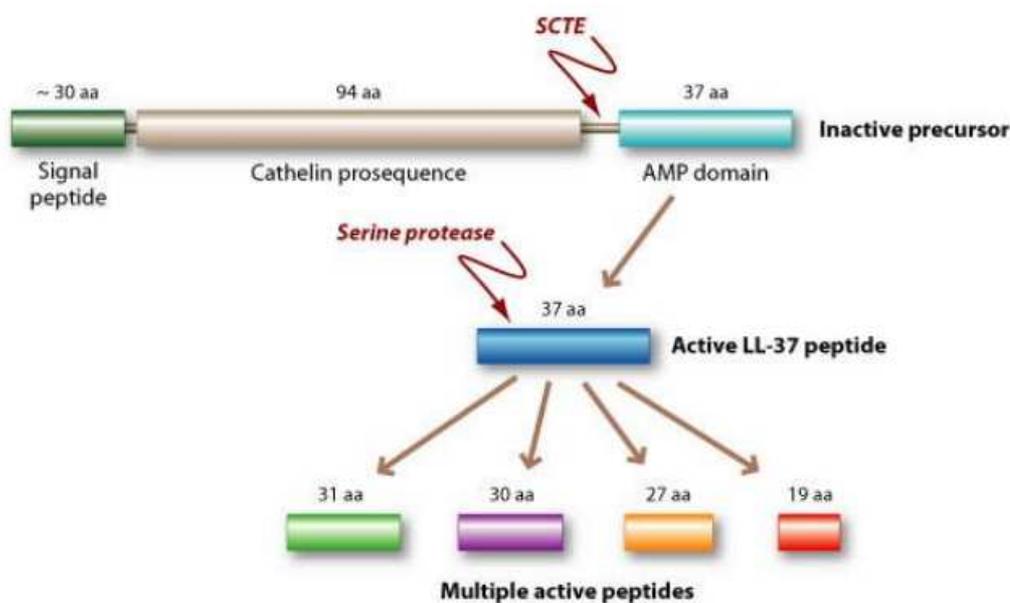


Figura 1: ejemplo de catelicidina.

## 1.2 Producción de AMPs

Los AMPs son producidos de manera natural por plantas, animales y bacterias, formando parte del sistema inmune innato de los mismos. Además de su actividad antimicrobiana, los AMPs poseen actividad antifúngica y antitumoral (Guilhelmelli et al., 2013).

La producción de péptidos antimicrobianos es innata en el propio organismo, pero su síntesis a través de herramientas informáticas es una realidad cada vez más cercana, las cuales se han convertido en una estrategia en la búsqueda de péptidos bioactivos en organismos a partir de bases de datos, en las que se puede obtener información sobre su secuencia, actividad, organismo en los que se encuentra y en los cuales tiene efecto antimicrobiano (Thomas, Karnik, Barai, Jayaraman, & Idicula-Thomas, 2009). Estos datos pueden aportar información para el diseño o modificación de un péptido para usos farmacéuticos (Seo et al., 2012).

Hasta la fecha, se han identificado 2824 AMPs, según la base de Antimicrobial Peptide Database. A pesar de que se hayan conseguido avances significativos para su uso como antibióticos humanos, como estabilidad proteásica, avances en farmacocinética y perfiles terapéuticos (Diehnelt, 2013), aún no se ha conseguido superar los procesos de prueba para su uso terapéutico (Vila-Farres, Giralt, & Vila, 2012).

Propiedad	Antibióticos convencionales	Péptidos antimicrobianos
<b>Espectro de actividad</b>	Bacterias (selectividad)	Bacterias, hongos, virus; tumores
<b>Objetivo</b>	Usualmente uno específico de clase (PBP, topoisomerasa, ribosomas)	Relativamente no específicos, múltiples objetivos
<b>Resistencia</b>	Después de pocos pases a concentraciones sub concentraciones sub MIC (concentración inhibitoria mínima)	Generalmente, no se puede seleccionar directamente, se requieren múltiples pases a concentraciones sub MIC (concentración inhibitoria mínima), proteasas específicas.
<b>Actividades relacionadas</b>	Generalmente pocas	Incluyen mecanismos anti-endotóxicos y de incremento de la respuesta inmune innata.
<b>Farmacocinética</b>	Varía.	Vida media corta por degradación proteolítica
<b>Toxicología</b>	Tienden a ser seguros.	No se conocen toxicidades del uso tópico,
<b>Costo de producción</b>	Pueden ser baratos.	Generalmente caros, por procesos de síntesis química

Figura 2. Tabla comparativa de antibióticos convencionales con los péptidos antimicrobianos (Télez, Castaño, & Peptides, 2010).

La obtención de AMPs puede llevarse a cabo de 3 formas: aislamiento directo a partir del organismo productor, síntesis química o por expresión de recombinantes (Li, Blencke, Paulsen, Haug, & Stensvag, 2010). En este último caso, el aprovechamiento del metabolismo de un organismo para la producción de sustancias químicas, en este caso AMPs, sería una alternativa viable económicamente. Recientemente la ingeniería metabólica en cianobacterias ha mostrado un gran potencial en proyectos relacionados con la emisión de gases efecto invernadero y puede abastecer la demanda de energías y sustancias químicas renovables (Woo, 2017).

### 1.3 Cianobacterias como biofactorías

Una de las ventajas de la utilización de cianobacterias en la producción biotecnológica es la mayor facilidad de su manipulación genética (Ruffing, 2011) comparado con eucariotas. Su crecimiento autotrófico les permite sintetizar sustancias químicas a partir de luz solar, dióxido de carbono y algunos minerales (Yu et al., 2013), lo cual las convierte en candidatas idóneas para su modificación y producción de sustancias (Hirokawa, Maki, & Hanai, 2017; Kim, Lee, Um, Sim, & Woo, 2017; Xue & He, 2015). Las cianobacterias,

al igual que otros microorganismos son modificados para producir biofuels, bioplásticos y compuestos químicos de interés industrial. La bioingeniería y biología sintética permiten la modificación en puntos específicos de rutas metabólicas intermediarias, pudiendo sintetizar un producto de forma más efectiva y mediante utilización de cofactores (Angermayr, Gorchs Rovira, & Hellingwerf, 2015).

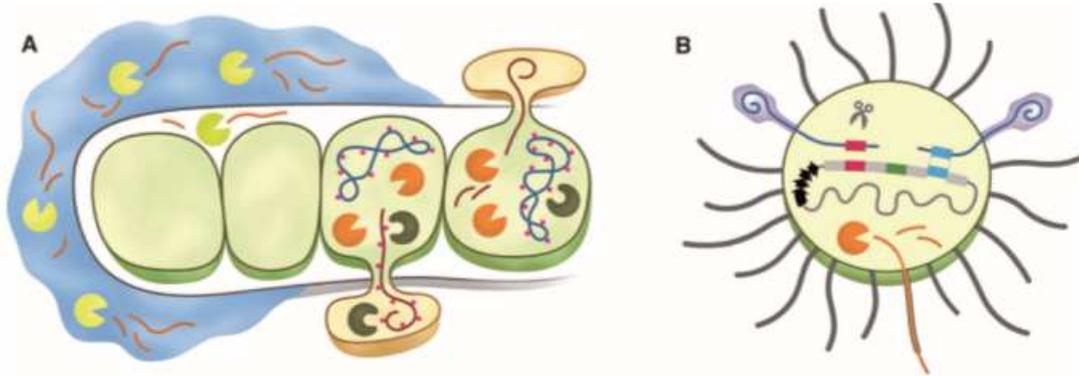


Figura 3: Barreras que pueden impedir la introducción de ADN exógeno: (A) Barrera física, como la existencia de una capa o matriz exopolisacáridica (azul) y presencia de endonucleasas (amarillo) recubriendo la cianobacteria y en su interior, sistemas que diferencian ADN foráneo (invaginaciones celulares y puntos rosas) y endonucleasas (naranja). (B) Sistema de defensa ante infección de fago (Stucken, Koch, & Dagan, 2013).

Uno de los inconvenientes de la obtención de sustancias químicas a partir de cianobacterias es que su producción no llega a niveles viables para la industria, de ahí radica la importancia de uso de modelos modificados de manera que aumenten su eficiencia en diferentes aspectos, como por ejemplo el aumento de fijación de dióxido de carbono (Angermayr et al., 2015); todo depende del tipo de investigación que se lleve a cabo. Algunos ejemplos de modelos de cianobacteria *Synechococcus* modificadas son *Synechococcus elongatus* PCC 7942, organismo en el que se centra el presente estudio, o *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Ruffing, Jensen, & Strickland, 2016).

En la última década, se han conseguido logros significativos con el objetivo de convertir cianobacterias en biofactorías eficientes; existen casos en los que realmente se han conseguido estas metas (Zhou, Zhu, Cai, & Li, 2016),

aunque aún quedan muchos desafíos que afrontar para conseguir que sean viables a una escala industrial. Actualmente las cianobacterias se están utilizando como biofactorías para la producción de compuestos tales como 1,3-PDO (1,3- propanodiol) directamente a partir de dióxido de carbono utilizando *S. elongatus* PCC 7942 (Hirokawa et al., 2017), producción de escualeno a partir de dióxido de carbono (Choi et al., 2017), producción de etanol (Gao, Zhao, Li, Tan, & Lu, 2012), 2,3-butanodiol (Oliver, Machado, Yoneda, & Atsumi, 2014), glicerol (Wang, Tao, Ni, Li, & Xu, 2015) o producción de metabolitos secundarios, aunque este último no haya conseguido aún ser viable económicamente (Xue & He, 2015).

## 2. OBJETIVOS

Los catelicidinas desarrolladas para este estudio a partir del genoma de diversos animales, tales como mamíferos, reptiles y aves poseen un gran espectro de actividad antimicrobiana y resultan fácilmente manipulables debido a su pequeño tamaño, pero su poca estabilidad y gastos de producción impiden que puedan ser utilizados para la fabricación de fármacos a gran escala. Por ello, las modificaciones de la composición y estructura de estos AMPs son interesantes para su aprovechamiento máximo. Además, la exposición de estos animales a sus propios ambientes naturales permite que desarrollen péptidos antimicrobianos bioactivos en respuesta a microorganismos patógenos que puedan aparecer en su entorno.

El objetivo principal de este trabajo consiste en el clonaje de proteínas de fusión derivadas de estos AMPs, a través de vectores adecuados para la transformación de *S. elongatus*.

Para poder alcanzar el objetivo principal de este trabajo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Clonaje molecular de genes que codifican para la expresión de péptidos antimicrobianos en vector pSyn\_6 de cianobacteria.
2. Transformación de *S. elongatus* con las construcciones sintéticas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Microorganismos

Los microorganismos utilizados para el estudio fueron: las células competentes *E. coli* TOP10 (Invitrogen), las cuales permiten la replicación estable de plásmidos de alto número de copias; y la cianobacteria *S. elongatus*, cepa PCC 7942, que contiene un genoma de pequeño tamaño que permite que sea fácil su manipulación genética para distintos fines.

#### 3.2 Condiciones de crecimiento de cianobacteria

La cepa de cianobacteria *S. elongatus* se encontraba congeladas a -80 °C, por lo que se procedió a su descongelación en 50 ml de medio BG11, e incubada a 26 °C en agitación y luz para el correcto crecimiento de las mismas. Debido a que *S. elongatus* necesita un aporte de CO<sub>2</sub> continuo, su crecimiento fue relativamente lento. En cuanto al crecimiento de *E. coli* TOP10 tras su transformación, se incubaron las muestras a 37 °C durante una hora en agitación.

#### 3.3 Secuencias de péptidos antimicrobianos

La elección de los insertos de trabajo fue influida por los resultados previos obtenidos en otras repeticiones del experimento, en las que mejores respuestas se obtuvieron.

Todas las secuencias corresponden a catelicidinas obtenidas de diversos animales. Para el diseño de los péptidos antimicrobianos, se tomó la secuencia del cuarto exón, que es el que codifica para el péptido antimicrobiano.

Péptido	Secuencia	Especie
Cp_SP-37	SPRRSRWPRRWYLPGSYTLIAHGGGKKGKGSRLQMA	<i>Crysemys picta bellii</i>
M1_LN-35	LNPLIKAGIFILKHRRPIGRGIEITGRGIKKFFSK	<i>Myotis lucifugus</i>
Od_QR-42	QRSRKEGLGKLLRKVVQKLKEKFKKISQKIKDFIYNLKRSE	<i>Ostodon degus</i>
Mp_SK-38	SKYGGLRDLLGRARRGIRRIGRRIRGLFTKYQLPQEES	<i>Mustela putoris furo</i>

Figura 4. Tabla de secuencias de péptidos antimicrobianos seleccionados para este trabajo

Péptido	Especie	Carga neta	Hidrof	Índice de Boman	Estructura
Tt_FR-28	Delfín ( <i>Tursiops truncatus</i> )	+7	25%	2'67 kcal/mol	P-rich
Am_TR-26	Caimán ( <i>Alligator mississippiensis</i> )	+5	46%	1'75 kcal/mol	$\alpha$ -helix
Cp_Sp-37	Tortuga pintada ( <i>Chrysemys picta bellii</i> )	+9	24%	2'59 kcal/mol	$\alpha$ -helix
Cp_RR-33	Tortuga pintada ( <i>Chrysemys picta bellii</i> )	+13	33%	3'9 kcal/mol	$\alpha$ -helix
MI_LN-35	Murciélago ( <i>Myotis lucifugus</i> )	+8	40%	1'33 kcal/mol	$\alpha$ -helix
MI_RF-32	Murciélago ( <i>Myotis lucifugus</i> )	+4	31%	2'38 kcal/mol	$\alpha$ -helix
Cc_PT-33	Topo de nariz estrellada ( <i>Condylura cristata</i> )	+2	24%	2'34 kcal/mol	$\alpha$ -helix
Cc_KL-41	Topo de nariz estrellada ( <i>Condylura cristata</i> )	+6	31%	2'42 kcal/mol	$\alpha$ -helix
Tm_KR-41	Manatí ( <i>Ttrichechus manatus latirostris</i> )	+7	26%	2'92 kcal/mol	$\alpha$ -helix
Od_QR-42	Degú ( <i>Octodon degus</i> )	+11	28%	3'05 kcal/mol	$\alpha$ -helix
Vp_GF-35	Alpaca ( <i>Vicugna pacos</i> )	+3	37%	1'88 kcal/mol	$\alpha$ -helix
Pv_KS-16	Zorro volador ( <i>Pteropus vampyrus</i> )	+2	43%	2'26 kcal/mol	$\alpha$ -helix
Et_KR-42	Erizo ( <i>Echinops Telfairi</i> )	+4	30%	3'17 kcal/mol	$\alpha$ -helix
Ef_KF-43	Murciélago ( <i>Eptesicus fuscus</i> )	+7	30%	3'46 kcal/mol	$\alpha$ -helix
Mp_SK-38	Hurón ( <i>Mustela putoris furo</i> )	+8	26%	3'64 kcal/mol	$\alpha$ -helix
Ca_KR-38	Topo dorado del Cabo ( <i>Chrysochloris asiática</i> )	+8	31%	2'99 kcal/mol	$\alpha$ -helix
Mm_LV-34	Periquito ( <i>Melopsittacus mudulatus</i> )	+10	38%	3'16 kcal/mol	$\alpha$ -helix
Mm_KR-26	Periquito ( <i>Melopsittacus mudulatus</i> )	+5	50%	0'65 kcal/mol	$\alpha$ -helix

Figura 5. Tabla de secuencias de péptidos antimicrobianos original, diseñados por equipo de Biotecnología de Macromoléculas (IPNA)

### 3.4 Vectores

El vector pSyn\_6 (4461 pb) diseñado por la casa Invitrogen, fue utilizado para el clonaje de péptidos antimicrobianos en *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Este vector posee varias características que facilitan el clonaje de genes de interés.

- **Promotor psbA**, promotor constitutivo del gen psbA que permite una expresión fuerte del gen de interés en *Synechococcus elongatus*.
- Dos sitios de clonaje múltiple con 6 secuencias únicas genes de reconocimiento de enzimas de restricción (**Bgl II**, **NdeI**, **HindIII**, **EcoRI**, **BamHI**, **KpnI**). Permiten la inserción del gen de interés en el vector pSyn\_6 con la posibilidad de incluir colas de N-terminales o C-terminales.
- **NS1a y NS1b** (*neutral sites*), son regiones presentes también en el genoma de *Synechococcus elongatus* el cual sirve de guía para la doble

recombinación homóloga del ADN contenido entre el *neutral site* y el vector en sí.

- **Promotor de Espectomicina** ( $P_{sp}$ ), permite la expresión del gen de resistencia a espectomicina en plásmido tanto en *E.coli* como en *Synechococcus elongatus*.
- **Gen de resistencia de Espectomicina** (*add A1*), permite la selección del plásmido en *E. coli* y *Synechococcus elongatus*.
- **Sitio de reconocimiento de la proteasa TEV**, que permite la escisión de la TEV de la cola de histidinas y la proteína recombinante purificada.
- **Origen pUC**, permite una replicación con alto número de copias y crecimiento en *E. coli*.
- **Epítomos V5** (**Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr**), permiten la detección de proteínas de fusión con anticuerpos Anti-V5 o Anti-V5-HRP.
- **Región terminadora de transcripción *rrnB*** región de terminación de transcripción.
- **Regiones PR4/ RK2** región *boom*, permite la conjugación bacteriana.
- Colas de histidina (6 x His) en extremos N-terminal y C-terminal, los cuales permiten la purificación de la proteína de fusión.

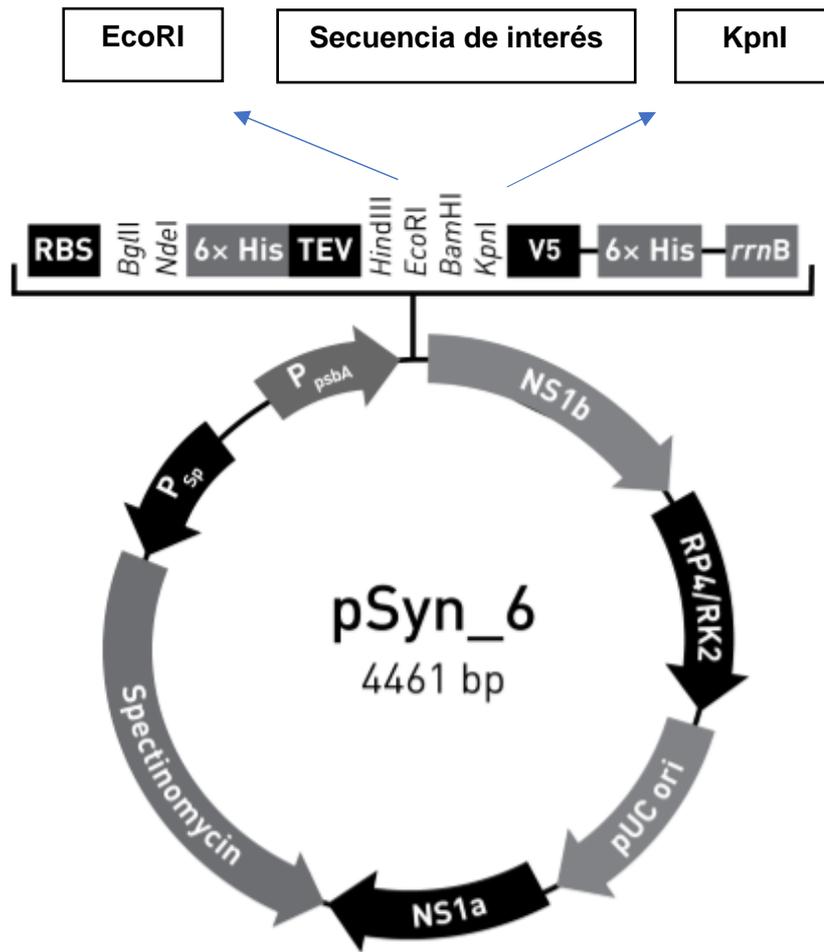


Figura 6: Mapa del vector pSyn\_6 representando las enzimas de restricción utilizadas para introducir secuencias de interés.

```

3301 CAAGAGTTT TAAC TAAGAC TCTT GCCCTT TACAACCTCG AAGGAGCGTC AGATCTCATA TG CACCACCA CCATCACCAC
      psbA1 promoter RBS BglIII NdeI 6x His
                        start

3381 GAAAACCTGT ACTTTCAGGG CAAGCTTCGA ATTCCCGGAT CCGCGGTACC AGGC AAACCC ATCCCAACC CCCTGCTGGG
      TEV HindIII EcoRI BamHI KpnI V5 epitope

3461 CCTGGATAGC ACCGGTGGTG GTCACCACCA CCATCACCAC TAGAGTACTG TATGCATCGA GTGCCTGGCG GCAGTAGCGC
      V5 epitope 6x His Scal rrnB
                        stop
  
```

Figura 7: secuencia del vector pSyn\_6 con todas las enzimas de restricción.

### 3.5 Kits utilizados y otros métodos

Para la verificación de una correcta PCR, se llevaron a cabo electroforesis en gel de agarosa y visualización de dichos geles con lámpara de

luz ultravioleta. El espectrofotómetro Micro-Volumen MaestroNano fue requerido para la cuantificación de ADN siempre que fue necesario.

La clonación de genes de interés se llevó a cabo siguiendo el protocolo GeneArt® *Synechococcus* Protein Expression Kit, de la casa Invitrogen, el cual incluye kits de células competentes One Shot® TOP10 Chemically Competent Cells, junto con recomendaciones de su manipulación. También se incluye el PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen), cuyo protocolo fue seguido para la purificación de muestras de secuencias de insertos tras su amplificación. Para el proceso de digestión del material genético con enzimas de restricción se utilizó el protocolo de Fast Digestion of Different DNA (Thermo Scientific), el cual incluye información de utilización y condiciones del termociclador de las enzimas de restricción utilizadas.

El protocolo Gene Clean se precisó para la purificación de productos de digestión en gel de agarosa. En cuanto al GeneJET Plasmid kit, este fue utilizado para Miniprep, con la finalidad de aislar el ADN plasmídico.

Placas de LB con espectomicina 50 µg/ml de concentración para promover el crecimiento de células competentes durante el proceso de transformación y durante PCR-screening de colonias para el crecimiento de colonias transformantes.

## 4. RESULTADOS

A continuación, se describen los diferentes experimentos que se han realizado para la consecución de los objetivos, la metodología empleada, y los resultados obtenidos en cada una de las etapas de ejecución.

### 4.1 Amplificación de insertos por PCR y electroforesis en gel de agarosa

Para comenzar la transformación de *S. elongatus*, se amplificaron los insertos elegidos por PCR y posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa para verificar, por su tamaño, su correcta amplificación. Los primers de cada insertos fueron diluidos 10 veces en agua destilada.

	Mix PCR
ADN en vector	1 $\mu$ L
Buffer 10X	5 $\mu$ L
dNTPs	4 $\mu$ L
Primer Fw	1 $\mu$ L
Primer Rv	1 $\mu$ L
Taq polimerasa	0'25 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	40'75 $\mu$ L
	54 $\mu$ L

Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes:  
94 °C durante 3 minutos y a continuación 30 ciclos de a 94 °C durante 30 segundos; 58 °C durante 30 segundos; 72 °C durante 30 segundos y terminados los ciclos, 72 °C durante 10 minutos y 4 °C para mantener la muestra.

Una vez amplificados los insertos, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para confirmar la correcta amplificación. Todos los geles de agarosa realizados se hicieron siguiendo el mismo procedimiento: para el gel, se utilizaron 2'25 g de agarosa mezclándolo con 150 ml de tampón TAE 1X, y homogeneizando la mezcla en un microondas. Luego se introdujo la mezcla en una cubeta de electroforesis de 50 ml de capacidad con el peine correspondiente junto con 5  $\mu$ L de Gel Green, y se dejó solidificar. Además de las muestras, se introducen en la cubeta un control negativo (agua destilada) y

otro positivo (marcador de peso molecular). A continuación, se cargaron en los pocillos 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra (siempre por duplicado) con 2  $\mu\text{L}$  aproximadamente de DNA loading 6X y se inició la electroforesis con un voltaje de 60V durante 25 minutos. Tras verificar los correctos tamaños de los insertos amplificados comparándolos con el marcador de peso molecular, podemos pasar al siguiente paso.

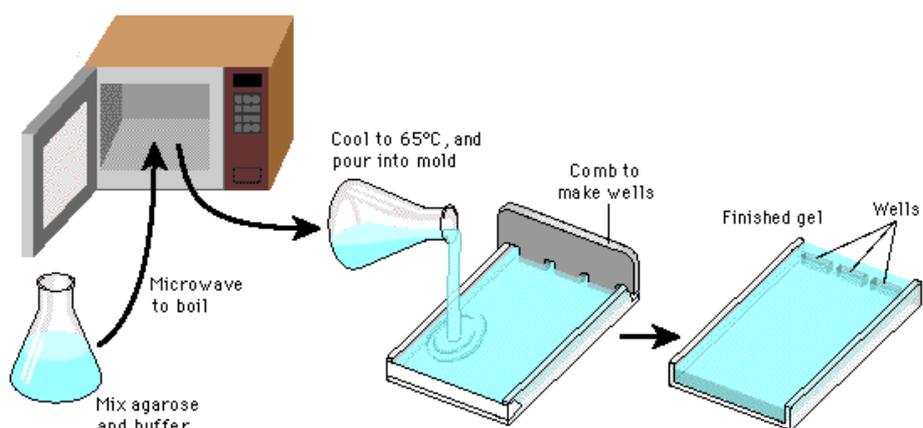


Figura 8: preparación del gel de agarosa para electroforesis.

#### 4.2 Purificación de las muestras y cuantificación de ADN

Siguiendo el protocolo de purificación PureLink® Purification Kit (Invitrogen), se eliminaron residuos de sales, dNTPs incorporados erróneamente y productos no deseados que pudiesen aparecer durante la PCR, para proceder correctamente a la Digestión.

Se realizó una cuantificación de ADN a través del espectrofotómetro Maestronano (Maestrogen), utilizando 2  $\mu\text{L}$  de la muestra

Inserto	Concentración	$A_{260}/A_{280}$
# 7	67'81 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1' 69
# 9	46'08 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	2'35
# 14	26'21 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	3'58
# 19	4'76 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1'54

Figura 9: Tabla de cuantificación de ADN.

### 4.3 Digestión de insertos con enzimas de restricción EcoRI y KpnI

Para la doble digestión, las enzimas de restricción utilizadas fueron EcoRI y KpnI, provocando la apertura del vector en 2 zonas.

	<b>PSyn_6#16</b>	<b>Insertos en pUc57</b>
ADN	1 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Buffer 10X	3 $\mu$ L	6 $\mu$ L
EcoRI	1 $\mu$ L	2 $\mu$ L
KpnI	1 $\mu$ L	2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	38 $\mu$ L	-
	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L

Las condiciones de la digestión fueron las siguientes: 37 °C durante 1 hora; 80 °C durante 5 minutos y 4 °C hasta la retirada de las muestras.

Tras la digestión, el vector pSyn\_6 tendrá dos extremos "pegajosos", que pueden llegar a unirse con cualquier secuencia complementaria a las mismas, por lo que deben ser eliminadas para evitar la reagrupación de los productos de digestión. Para ello, se realiza una electroforesis preparativa en gel de agarosa, tanto para eliminar las "secuencias pegajosas" del plásmido, como para separarlo del inserto que contenía (#16), ya que este tiene menor tamaño que el plásmido abierto. Para la digestión se utilizó el vector unido al inserto 16 para una mejor verificación de la separación del vector.

Los insertos se separaron del vector pUc57 tras correr el gel. Se cortaron las bandas correspondientes al vector pSyn\_6 e insertos con un bisturí estéril y se introdujeron en un tubo Eppendorf. Se realizó una purificación de ADN contenido en el gel de agarosa, siguiendo el protocolo de Gene Clean, para su posterior ligación. Tras la purificación se obtuvo un pellet y sobrenadante con ADN purificado.



Figura 10: Bandas correspondientes al vector pSyn\_6 (círculo naranja), inserto #16 (círculo verde) y en orden, inserto #7, #9 y #14 tras la digestión.

#### 4.4 Ligación de insertos a vector pSyn\_6 y transformación de células competentes *E.coli* (TOP10)

Consiste en la inserción de nuestro gen de interés al vector, antes de la etapa de transformación del proceso de clonación.

	Mix PCR
Vector pSyn_6	1 $\mu$ L
Inserto	2'5 $\mu$ L
Buffer 10X	1 $\mu$ L
T4 DNA Ligase	0'5 $\mu$ L
	5 $\mu$ L

Se le dio un pulso en la centrífuga (30 segundos a máximas r.p.m) y se introducen los tubos en el termociclador a 22 °C durante 30 minutos.

A continuación, se llevó a cabo el proceso de transformación añadiendo 25  $\mu$ L de células competentes TOP10, las cuales deben mantenerse en hielo (al igual que todos los primers utilizados en el trabajo) en todo momento, a los tubos correspondientes de PCR y se estableció el siguiente programa de termociclador: 4 °C durante 30 minutos; 42 °C durante 30 segundos y 4 °C durante 2 minutos.

Mientras se llevaba a cabo el proceso de transformación, se prepararon tubos eppendorf con 950  $\mu\text{L}$  de medio LB para cada muestra, y al terminar el programa del termociclador se añadieron éstas a los nuevos tubos, los cuales se incubaron a 37 °C durante 1 hora en agitación para promover la expresión del gen de resistencia para una posterior selección con el antibiótico.

Por último, se añadieron a placas de LB con espectomicina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de concentración, 300  $\mu\text{L}$  de cada muestra en su placa correspondiente y se procedió a su incubación en estufa a 37 °C durante 24 horas. Al día siguiente, el resto de muestra se sembró en su placa correspondiente, esperando el crecimiento de células transformadas.

#### 4.5 PCR- screening de colonias

Tras observar crecimiento de células transformadas en las placas de LB con espectomicina, se realizó un screening de colonias para la obtención de colonias aisladas transformadas. Para ello se introdujo, con un asa de siembra, cada colonia diferenciada, en un tubo eppendorf de PCR con 12  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, dejando que se homogeneice y a continuación, se introduce de forma ordenada 2  $\mu\text{L}$  de cada colonia resuspendida en una nueva placa, de medio LB con espectomicina, cuadrículada. Una vez rotulada cada colonia aislada en la placa, ésta se incubó a 37 °C durante 24 horas esperando crecimiento. El resto de colonia resuspendida (10  $\mu\text{L}$ ) es utilizado para realizar una PCR para verificar la existencia del inserto de trabajo en el vector. También se añadió un control negativo (sustituyendo ADN por agua destilada).

<b>Mix PCR</b>	
<b>H<sub>2</sub>O</b>	31'75 $\mu\text{L}$
<b>Buffer 10X</b>	5 $\mu\text{L}$
<b>dNTPs</b>	1 $\mu\text{L}$
<b>Pimer Fw</b>	1 $\mu\text{L}$
<b>Primer Rv</b>	1 $\mu\text{L}$
<b>ADN</b>	10 $\mu\text{L}$
<b>Taq polimerasa</b>	0'25 $\mu\text{L}$
	50 $\mu\text{L}$

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 94 °C durante 3 minutos y a continuación 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos; 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto. Luego, 72 °C durante 10 minutos.

Se observaron los resultados de la PCR a través de electroforesis en gel de agarosa y luz ultravioleta, verificando la existencia de bandas que correspondan al tamaño esperado del inserto.

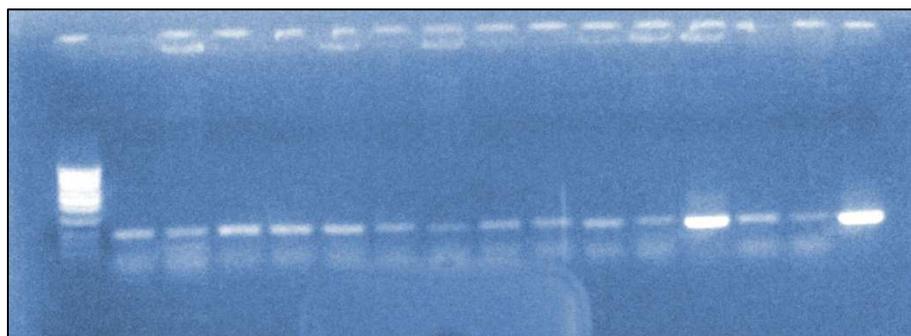


Figura 11. Bandas correspondientes al producto de PCR-screening de colonias del inserto #14.

#### **4.6 Miniprep de colonias transformadas aisladas y stock de glicerol**

Para aislar el ADN plasmídico, se siguió el protocolo de Miniprep GeneJET plasmid kit, comenzando con la resuspensión de la colonia, crecida en la placa de screening de colonias, en 3 ml de medio LB líquido con espectomicina. Una vez terminada la miniprep, se realizó una cuantificación de ADN (MaestroNano), utilizando 2  $\mu$ L sobre el espectrofotómetro. Las colonias elegidas fueron aquellas positivas del PCR-screening.

Colonia de insertos	Concentración	$A_{260}/A_{280}$
#7	23'09 $\mu$ g/ $\mu$ L	1'27
#9	78'71 $\mu$ g/ $\mu$ L	1'4
#9.2	180'60 $\mu$ g/ $\mu$ L	1'2

#14	100'39 µg/ µL	1'38
#19	43'29 µg/ µL	1'53
#19.2	65'15 µg/ µL	2'05

Figura 12. Tabla de cuantificación de ADN.

Para mantener las colonias transformadas a largo plazo se preparó un stock de glicerol, tomando 500 µL de las colonias crecidas durante la noche en medio LB líquido con espectomicina, y se añadió 225 µL de stock glicerol. Se conservaron congelados a -80 °C.

Seguidamente, se procedió a la secuenciación del ADN plasmídico de los insertos clonados en el vector pSyn\_6 mediante el servicio de secuenciación Secugen (Madrid). Para ello, se prepararon 10 µL de ADN plasmídico (miniprep) junto con 0'5 µL de primer FW de pSyn\_6, previamente diluído 100X. Tras agitar y etiquetar correctamente, se mandaron los tubos al servicio. Tras el análisis de la secuencia, se comprobó que los plásmidos de las colonias seleccionadas no contenían las secuencias de los insertos. En otros casos, la secuencia de ADN no era legible. Seguramente debido a la preparación del plásmido, que no estaba en óptimas condiciones: bien por el propio proceso de su purificación, o porque las colonias se incubaron a 37 °C toda la noche, agotándose así todos los nutrientes del medio y promoviendo la lisis de las bacterias y la liberación de proteasas y DNasas.

#### 4.7 Transformación de *Synechococcus elongatus* con #19.2

La transformación de *Synechococcus* se lleva a cabo con gran eficiencia cuando el cultivo se encuentra en la fase logarítmica de crecimiento, que corresponde a una DO<sub>600</sub> de 1 y 2 o en escala MF entre 3 y 4. Para ello, se transfirió el cultivo de *Synechococcus* a un tubo de cristal y se comprobó que se corresponden a esas medidas de densidad.

A continuación, siguiendo el protocolo GeneArt® Synechococcus Protein Expression Kit, Transforming Synechococcus elongatus PCC 7942, se centrifugó a 14000 r.p.m, durante 3 minutos el cultivo (el cual previamente se depositó en un falcon de 50 mL) y se desechó el sobrenadante. A continuación, se añadieron 100 µL de medio BG11 para resuspender el pellet y se agregaron distintas cantidades de ADN plasmídico en diferentes tubos para distintas concentraciones del mismo (100 ng, 500 ng y 1 µg de DNA plasmídico). Los tubos se incubaron a 34 °C durante toda la noche en oscuridad. Tras 24 horas, se inocularon en placas de BG11 con espectomicina a 10 µg/ml, (previamente atemperadas a temperatura ambiente), de todo el contenido de la transformación y se incubaron las placas boca abajo y sin apilar a temperatura ambiente, iluminándolas con una lámpara y recubriéndolas con papel de aluminio para obtener la mayor luz posible durante una semana. No se observó crecimiento en ninguna de las placas.

## 5. DISCUSIÓN

Las cianobacterias son organismos procariotas fotosintéticos, que evolucionaron con el oxígeno, presentes en la Tierra por aproximadamente 3,5 billones de años. Son los organismos fotosintéticos oxigenados originales y son morfológicamente diversos, variando de unicelulares a multicelulares (en forma de cocos a filamentos ramificados, casi incoloros o pigmentados). Hay más de 150 géneros y más de 2000 especies descritas hasta la fecha. Las cianobacterias son en su mayoría autotróficas en su modo de nutrición, pero también hay formas heterotróficas. Crecen como flotantes, formando colonias, así como endosimbiontes con plantas superiores. Las cianobacterias habitan diversas condiciones ecológicas desde psicófilas a termófilas, acidófilas a alcalófilas, epilíticas a endolíticas y de agua dulce a halófilas. Las cianobacterias se encuentran en una amplia variedad de hábitats que van desde el agua dulce hasta los océanos, el suelo hasta las rocas desnudas, los desiertos, los estantes de hielo y las aguas termales, hasta los lagos árticos y antárticos. Prosperan en condiciones ambientales severas: radiación ultravioleta (UV), fotooxidación, sequía y desecación, inanición de nitrógeno, choques calor-frío, anaerobiosis, tensiones osmóticas y de salinidad debido a sus estrategias únicas de supervivencia.

En el presente trabajo se han realizado diferentes técnicas de biología molecular para la producción biotecnológica de PAMs en la cianobacteria *S. elongatus*. Este trabajo resulta muy prometedor para la posible explotación industrial de estas cianobacterias en la obtención de nuevos compuestos antimicrobianos. Una de las ventajas del uso de las cianobacterias *S. elongatus* para la modificación genética es que éstas son naturalmente competentes, capaces de ser transformadas fácilmente.

Ciertas cianobacterias, como *Spirulina platensis*, *Arthrospira maxima* y *Aphanizomenon flos-aquae* se han venido cultivando fotoautotróficamente como cultivos al aire libre para la obtención de productos suplementos alimentarios. Sin embargo, su producción no se basa en el concepto de bio-refinería. Por lo tanto, no se explora su potencial completo, lo que requiere de proyectos integrados de investigación y desarrollo para reducir los costos de producción. El cultivo de cianobacterias en estanques abiertos es muy efectivo

para la recolección libre de energía solar, pero existen varias amenazas biológicas de contaminación con otras algas, algas, herbívoros, hongos y amebas, rotíferos, etc. que pueden influir en la eficiencia del cultivo. Por lo tanto, el cultivo en fotobiorreactores cerrados podría ser la mejor alternativa para la producción de biomasa de calidad nutricional o de biomasa de valor añadido a lo largo del año independientemente del clima local. El cultivo a gran escala en placas tubulares, placas planas u otros diseños de fotobiorreactores cerrados son costosos. El sobrecalentamiento y el ensuciamiento en fotobiorreactores cerrados son también grandes desafíos. Las tecnologías de recolección actuales, tales como la filtración, la centrifugación o la cinta de laminación, son caras para la cosecha a gran escala de biomasa de cianobacterias, que necesita de la optimización y tecnología más barata. La bio-floculación es el proceso usado para la concentración de varios pliegues de la biomasa cultivada antes del procesamiento aguas abajo (downstream). Este proceso podría ser el método más simple y rentable. Sin embargo, la bio-floculación para todas las cianobacterias no es universal y necesita optimización posiblemente mediante el uso mínimo de floculantes químicos.

## 6. CONCLUSIONES

A partir del vector comercial pSyn\_6, y mediante herramientas de ingeniería genética, se han introducido en la cianobacteria *S. elongatus* PCC 7942 secuencias de ADN sintético codificante para péptidos de acción antimicrobiana procedentes del genoma de diversos animales: Cp-SP-37 (tortuga pintada), M1\_LN-35 (murciélago), Od\_QR-42 (degú) y Mp\_SK-38 (hurón). A través de la secuenciación de los insertos no se pudo verificar que el posicionamiento de las secuencias fuera exitoso. A pesar de ello, se llevó a cabo el proceso de transformación de *S. elongatus* PCC 7942, cuyo resultado fue el mismo.

## CONCLUSIONS

From the commercial vector pSyn\_6, and through the use of genetic engineering tools, sequences of synthetic codificant DNA for antimicrobial action peptides have been introduced into *S. elongatus* PCC 7942 genoma, obtained from the genoma of different animals Cp-SP-37 (*Crysemys picta bellii*), M1\_LN-35 (*Myotis lucifugus*), Od\_QR-42 (*Ostodon degus*) y Mp\_SK-38 (*Mustela putoris furo*). The verification by sequencing couldn't determinate the success of the sequences position. However, the process of transformation of *S. elongatus* PCC 7942 was executed as well, with the same outcome.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Angermayr, S. A., Gorchs Rovira, A., & Hellingwerf, K. J. (2015). Metabolic engineering of cyanobacteria for the synthesis of commodity products. *Trends in Biotechnology*, 33(6), 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.009>
- Angermayr, S. A., & Hellingwerf, K. J. (2013). On the use of metabolic control analysis in the optimization of cyanobacterial biosolar cell factories. *Journal of Physical Chemistry B*, 117(38), 11169–11175. <https://doi.org/10.1021/jp4013152>
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Brogden, K. A., Ackermann, M., & Huttner, K. M. (1998). Detection of anionic antimicrobial peptides in ovine bronchoalveolar lavage fluid and respiratory epithelium. *Infection and Immunity*, 66(12), 5948–5954. <https://doi.org/#>
- Choi, S. Y., Wang, J. Y., Kwak, H. S., Lee, S. M., Um, Y., Kim, Y., ... Woo, H. M. (2017). Improvement of Squalene Production from CO<sub>2</sub> in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 by Metabolic Engineering and Scalable Production in a Photobioreactor. *ACS Synthetic Biology*, 6(7), 1289–1295. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00083>
- Diehnelt, C. W. (2013). Peptide array based discovery of synthetic antimicrobial peptides. *Frontiers in Microbiology*, 4(DEC), 402. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00402>
- Gao, Z., Zhao, H., Li, Z., Tan, X., & Lu, X. (2012). Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria. *Energy Environ. Sci.*, 5(12), 9857–9865. <https://doi.org/10.1039/C2EE22675H>
- Gennaro, R., & Zanetti, M. (2000). Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 55(1), 31–49. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:1<31::AID-BIP40>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:1<31::AID-BIP40>3.0.CO;2-9)
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L. da S., Silva-Pereira, I., & Kyaw, C. M. (2013). Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 4(DEC), 353. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00353>
- Hirokawa, Y., Maki, Y., & Hanai, T. (2017). Improvement of 1,3-propanediol production using an engineered cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* by optimization of the gene expression level of a synthetic metabolic pathway and production conditions. *Metabolic Engineering*, 39, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.12.001>
- Josephson, J. (2006). The microbial “Resistome.” *Environmental Science and Technology*, 40(21), 6531–6534. <https://doi.org/10.1021/es063006i>
- Kim, W. J., Lee, S.-M., Um, Y., Sim, S. J., & Woo, H. M. (2017). Development of SyneBrick Vectors As a Synthetic Biology Platform for Gene Expression in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Frontiers in Plant Science*, 8, 293. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00293>
- Li, C., Blencke, H. M., Paulsen, V., Haug, T., & Stensvag, K. (2010). Powerful workhorses for antimicrobial peptide expression and characterization. *Bioeng*

- Bugs*, 1(3), 217–220. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.3.11721>
- Oliver, J. W. K., Machado, I. M. P., Yoneda, H., & Atsumi, S. (2014). Combinatorial optimization of cyanobacterial 2,3-butanediol production. *Metabolic Engineering*, 22, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.01.001>
- Otvos, L. (2002). The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(7), 1138–1150. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8493-8>
- Park, C. B., Yi, K. S., Matsuzaki, K., Kim, M. S., & Kim, S. C. (2000). Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Pnas*, 97(15), 8245–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.150518097>
- Ruffing, A. M. (2011). Engineered cyanobacteria: Teaching an old bug new tricks. *Bioengineered Bugs*, 2(3), 136–149. <https://doi.org/10.4161/bbug.2.3.15285>
- Ruffing, A. M., Jensen, T. J., & Strickland, L. M. (2016). Genetic tools for advancement of *Synechococcus* sp. PCC 7002 as a cyanobacterial chassis. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 190. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0584-6>
- Seo, M.-D., Won, H.-S., Kim, J.-H., Mishig-Ochir, T., & Lee, B.-J. (2012). Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. *Molecules*, 17(10), 12276–12286. <https://doi.org/10.3390/molecules171012276>
- Stucken, K., Koch, R., & Dagan, T. (2013). Cyanobacterial defense mechanisms against foreign DNA transfer and their impact on genetic engineering. *Biological Research*, 46(4), 373–382. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602013000400009>
- Tavares, L. S., Silva, C. S. F., de Souza, V. C., da Silva, V. L., Diniz, C. G., & Santos, M. O. (2013). Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: Resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides. *Frontiers in Microbiology*, 4(DEC), 412. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00412>
- Téllez, G. A., Castaño, J. C., & Peptides, A. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55–67. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70093-X](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70093-X)
- Thomas, S., Karnik, S., Barai, R. S., Jayaraman, V. K., & Idicula-Thomas, S. (2009). CAMP: A useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, 38(SUPPL.1), D774–D780. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1021>
- Vila-Farres, X., Giralt, E., & Vila, J. (2012). Update of Peptides with Antibacterial Activity. *Current Medicinal Chemistry*, 19(36), 6188–6198. <https://doi.org/10.2174/092986712804485818>
- Wang, Y., Tao, F., Ni, J., Li, C., & Xu, P. (2015). Production of C3 platform chemicals from CO<sub>2</sub> by genetically engineered cyanobacteria. *Green Chem.*, 17(5), 3100–3110. <https://doi.org/10.1039/C5GC00129C>
- Woo, H. M. (2017). Solar-to-chemical and solar-to-fuel production from CO<sub>2</sub> by metabolically engineered microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 45, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.017>
- Xue, Y., & He, Q. (2015). Cyanobacteria as Cell Factories to Produce Plant Secondary Metabolites. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, 57. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00057>
- Yu, Y., You, L., Liu, D., Hollinshead, W., Tang, Y. J., & Zhang, F. (2013). Development of *synechocystis* sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory. *Marine Drugs*,

11(8), 2894–2916. <https://doi.org/10.3390/md11082894>

Zhou, J., Zhang, H., Meng, H., Zhang, Y., & Li, Y. (2014). Production of optically pure d-lactate from CO<sub>2</sub> by blocking the PHB and acetate pathways and expressing d-lactate dehydrogenase in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Process Biochemistry*, 49(12), 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.09.007>

Zhou, J., Zhu, T., Cai, Z., & Li, Y. (2016). From cyanochemicals to cyanofactories: a review and perspective. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0405-3>