República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0923748-8 B1

(22) Data do Depósito: 29/12/2009

(45) Data de Concessão: 09/04/2019

(54) Título: MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE DIÓIS

(51) Int.Cl.: C12P 7/18; C12N 1/21; C12N 9/02; C12N 9/88; C12N 15/53; (...).

(30) Prioridade Unionista: 31/12/2008 EP 08173129.1; 31/12/2008 US 61/141,699.

(73) Titular(es): METABOLIC EXPLORER.

(72) Inventor(es): PHILIPPE SOUCAILLE; CÉDRIC BOISART.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009067994 de 29/12/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/076324 de 08/07/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/06/2011

(57) Resumo: MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE DIÓIS A presente invenção se refere a um novo método para a preparação biológica de um diol compreendendo cultivar um microorganismo geneticamente modificado para a bioprodução de um diol alifático, onde o microrganismo é composto por uma via metabólica para a descarboxilação de um metabólito de ácido hidróxi-2-ceto-alifático com uma enzima com uma atividade de 2-ceto ácido descarboxilase, o produto resultante da referida etapa de descarboxilação sendo posteriormente reduzido para o correspondente diol alifático, e no qual o microorganismo é geneticamente modificado para a produção melhorada do referido metabólito de ácido hidróxi-2-ceto-alifático. A invenção também diz respeito a um microorganismo modificado para a produção de um diol alifático.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: **"MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE DIÓIS".**

A presente invenção se refere a um novo método para a preparação biológica de um diol compreendendo o cultivo de um microorganismo geneticamente modificado para a bioprodução de um diol alifático, onde o microrganismo compreende uma via metabólica para a descarboxilação de um metabólito de ácido hidróxi-2-ceto-alifático com duas enzimas: uma enzima com atividade descarboxilase do 2-ceto ácido e uma enzima com atividade redutase para hidróxi aldeído. A invenção também diz respeito a um microorganismo modificado para a produção de um diol alifático.

Antecedentes da Invenção

A produção fermentativa de dióis pelo cultivo de microrganismos produtores de dióis é conhecida no estado da técnica, incluindo a produção fermentativa com microrganismos geneticamente modificados para uma produção melhorada do dióis. A produção de dióis é descrita, entre outros, nos seguintes documentos: WO1996/035796, WO2001/012833, WO2004/033646 e US7267972. Em particular, a produção de 1,3-propanodiol envolvendo enzimas dependentes de vitamina B12 já foi descrita, mas esta torna o processo de produção muito caro.

Há uma necessidade permanente de soluções alternativas

com microorganismos modificados, tanto para a produção de dióis a partir de fontes renováveis de carbono quanto para ter-se potencial melhoria na produção dos dióis, particularmente com caminhos independentes da vitamina B12. Estas melhorias técnicas podem se dar sobre o rendimento global do produto que está sendo produzido, com base na energia necessária para essa produção, ou, eventualmente, no nível de impurezas e subprodutos a serem especificamente controlados para o isolamento do produto e para a sua comercialização e utilização.

Descrição Geral Da Invenção

A presente invenção se refere um microorganismo geneticamente modificado para a bioprodução de um diol alifático, onde o microorganismo compreende uma via metabólica para a descarboxilação de um metabólito de ácido hidróxi-2-ceto-alifático com uma enzima tendo atividade descarboxilase do 2-ceto ácido, o produto obtido a partir da referida etapa de descarboxilação sendo posteriormente reduzido ao correspondente diol alifático com uma enzima tendo atividade de redutase de hidróxi aldeído e em que o microrganismo é geneticamente modificados para a produção melhorada do referido metabólito de ácido hidróxi-2-ceto-alifático.

O microorganismo da presente invenção é geralmente

selecionado do grupo consistindo de uma bactéria, levedura ou fungo. Preferencialmente, o microorganismo é selecionado entre: *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomycetaceae* e *Corynebacteriaceae*.

De acordo com uma primeira modalidade da presente invenção, o microorganismo compreende um gene endógeno de codificação para uma atividade de 2-ceto ácido descarboxilase. É preferencialmente selecionado entre: *Saccharomyces cerevisiae* (PDC1, Pdc5, Pdc6, Aro10, Thi3); *Lactococcus lactis* (Kivd); *Clostridium acetobutylicum* (PDC), *Arabidopsis thaliana* (Pdc2, Pdc3); *Pichia stipitis* (PDC1, Pdc2, Aro10); *Zymomonas mobilis* (Pdc) e o *Mycobacterium tuberculosis*. Este microorganismo tendo atividade descarboxilase endógena de 2-ceto ácido pode ser modificado para aumentar a expressão do gene endógeno de codificação para a descarboxilase do 2-ceto ácido.

De acordo com outra modalidade da presente invenção, o microorganismo não compreende um gene endógeno que codifica para uma descarboxilase de 2-ceto ácido. Esse microrganismo destituído de descarboxilase do 2-ceto ácido endógena é preferencialmente selecionado entre: *Escherichia coli* ou *Corynebacterium glutamicum* ou *Bacillus subtilis*. Para esses microorganismos, o microorganismo da presente invenção compreende um gene heterólogo que codifica para uma 2-

cetoácido descarboxilase.

De acordo com uma outra modalidade da presente invenção, o microorganismo compreende um gene endógeno de codificação para uma atividade hidróxi aldeído redutase. Ele é preferencialmente selecionado dentre: *Escherichia coli* (yqhD, Fuco, dkgA, dkgB); *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2, ...) e todos os organismos que tenham pelo menos uma enzima com atividade de aldeído redutase ou atividade de álcool desidrogenase. Este microorganismo tendo atividade de redutase endógena de hidróxi aldeído pode ser modificado para aumentar a expressão do gene endógeno de codificação para a hidróxi aldeído redutase.

O diol alifático produzido com os microorganismos da presente invenção é um diol alifático tendo uma cadeia linear ou ramificada compreendendo um grupo alquila de 2-6 átomos de carbono, preferivelmente 2, 3 ou 4 átomos de carbono.

Em uma modalidade preferida, o diol alifático é etileno glicol e o metabólito do ácido hidróxi-2-ceto-alifático é hidroxipiruvato.

Em uma outra modalidade preferida, o diol alifático é o 1,3-propanodiol e o metabolito do ácido hidróxi-2-ceto-alifático é o 4-hidróxi-2-cetobutirato.

Em uma outra modalidade preferida, o diol alifático é

o 1,4-butanodiol e o metabolito do ácido hidróxi-2-ceto-alifático é 5-hidróxi-2-cetopentanoato.

A presente invenção também se refere a um método para a bioprodução de um diol alifático, compreendendo as etapas de:

- Cultivar um microorganismo da presente invenção, como descrito acima e ao longo desse relatório em um meio de cultura adequado compreendendo uma fonte de carbono, e
- Recuperar o diol alifático do meio de cultura.

De acordo com a modalidade preferida da invenção, o diol é posteriormente purificado.

Descrição detalhada da Invenção

Microorganismos

O microorganismo da presente invenção é um microrganismo geneticamente modificado ou geneticamente projetado. Isso significa, de acordo com o significado usual destes termos, que o microorganismo da presente invenção não é encontrado na natureza e é modificado, quer pela introdução ou pela exclusão de novos elementos genéticos. Ele também pode ser transformado, forçando o desenvolvimento e evolução de novas vias metabólicas pela combinação de mutagênese dirigida e evolução sob pressão de seleção específica (ver, por exemplo, o documento WO 2004/076659).

De acordo com a presente invenção, o termo "microorganismo" designa uma bactéria, levedura ou fungo. Preferencialmente, o microorganismo é selecionado dentre: *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomycetaceae* e *Corynebacteriaceae*. Mais preferencialmente, o microrganismo é uma espécie de: *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Salmonella* e *Corynebacterium*. Ainda mais preferencialmente, o microrganismo pode ser das espécies: *Escherichia coli* e *Corynebacterium glutamicum* ou *Clostridium acetobutylicum* e *Bacillus subtilis*.

Um microorganismo pode expressar genes exógenos se estes genes forem introduzidos no microorganismo com todos os elementos que permitam a sua expressão no microrganismo hospedeiro. Microorganismos transformados com DNA exógeno fazem parte de uma tarefa de rotina para um técnico no assunto.

Genes exógenos podem ser integrados ao genoma do hospedeiro, ou seja, expressos extracromossomalmente por plasmídeos ou vetores. Diferentes tipos de plasmídeos são conhecidos por um técnico no assunto, que diferem em relação à sua origem de replicação e de seu némero de cópias na célula.

Promotores são elementos importantes para controlar a

expressão de genes. Em uma modalidade preferida da invenção, os genes podem ser expressos através de promotores com forças diferentes, que podem ser indutível. Estes promotores podem ser homólogos ou heterólogos. Um técnico no assunto saberá como escolher os promotores que são os mais convenientes; por exemplo, os promotores Ptrc, PTAC, Plac ou o *cI* promotor lambda são amplamente utilizados.

Em modalidades específicas da presente invenção, genes endógenos também podem ser modificados para modular sua expressão e/ou atividade, quer através da introdução de mutações na sequência de codificação para modificar o produto do gene ou pela introdução de sequências heterólogas em adição ou em substituição aos elementos endógenos regulamentares. A modulação de um gene endógeno pode ir nos dois sentidos: hiper-regulação e/ou aumentando a atividade do produto do gene de um lado ou, por outro lado, hipo-regulação e/ou a diminuição da atividade do produto do gene endógeno.

O termo "atenuação de um gene", de acordo com a presente invenção, indica a supressão parcial ou total da expressão de um gene, o qual é dito ser "atenuado". Esta supressão da expressão pode ser tanto uma inibição da expressão do gene, uma exclusão de toda ou parte da região

promotora necessária para a expressão do gene, uma deleção na região codificante do gene ou a substituição do tipo selvagem de promotor por um promotor natural menor ou sintético. Preferencialmente, a atenuação de um gene é, essencialmente, a eliminação completa desse gene, que pode ser substituído por um gene marcador de seleção que facilita a identificação, isolamento e purificação das linhagems de acordo com a invenção. Um gene é inativado, preferencialmente, por meio da técnica de recombinação homóloga (Datsenko, KA & Wanner, BL (2000) "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645).

Em outras modalidades da presente invenção, sequências endógenas também podem ser eliminadas ou excluídas, para favorecer a nova via metabólica.

Todas as técnicas para transformar os microorganismos e elementos regulatórios utilizados para aumentar a produção da proteína da presente invenção são bem conhecidas no estado da técnica e disponíveis na literatura, incluindo pedidos de patente dos próprios requerentes para modificação das vias de biossíntese de vários microorganismos, incluindo os documentos: WO 2008/052973, WO 2008/052595, WO 2008/040387, WO

2007/144346, WO 2007/141316, WO 2007/077041, WO 2007/017710, WO 2006/082254, WO 2006/082252, WO 2005/111202, WO 2005/073364, WO 2005/047498 e WO 2004/076659, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

Genes e atividades enzimáticas

No relatório descritivo da presente invenção, atividades enzimáticas também são designadas com referência aos genes que codificam para as enzimas com tal atividade. Salvo indicação em contrário, os genes e as proteínas são geralmente identificadas com as denominações de genes de *Escherichia coli*. No entanto, o uso destas denominações tem um significado mais geral, de acordo com a invenção, abrangendo todos os genes e as proteínas correspondentes em outros organismos, mais particularmente microorganismos, homólogos funcionais, variantes funcionais e fragmentos funcionais dos referidos genes e proteínas.

Os genes a serem identificados no presente pedido são listados na Figura 4 com o seu número de acesso.

Usando as referências da nomenclatura enzimática IUBMB para as atividades enzimáticas conhecidas, um técnico no assunto é capaz de determinar as mesmas atividades enzimáticas em outros organismos, bactérias, leveduras, fungos, etc. Este trabalho de rotina é vantajosamente feito

utilizando-se sequências consenso que podem ser determinadas através da realização de alinhamentos de sequência com proteínas provenientes de outros microorganismos.

Métodos de determinação da porcentagem de homologia entre duas sequências de proteínas são conhecidos dos técnicos no assunto. Por exemplo, ela pode ser feita após o alinhamento das sequências utilizando-se o software *CLUSTALW* disponível no endereço eletrônico http://www.ebi.ac.uk/clustalw/ com os parâmetros padrão indicados no *site*. A partir do alinhamento, o cálculo da porcentagem de identidade pode ser feito facilmente pelo registro do número de resíduos idênticos na mesma posição em relação ao número total de resíduos. Alternativamente, o cálculo automático pode ser feito utilizando-se, por exemplo, os programas *BLAST*, disponível no endereço eletrônico http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, com os parâmetros padrão indicados no *site*.

O banco de dados *PFAM* (banco de dados de famílias de proteínas por alinhamentos e modelos ocultos de Markov; http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/) representa uma grande coleção de alinhamentos de sequências de proteína. Cada PFAM torna possível a visualização de alinhamentos múltiplos, consulta de domínios da proteína, avaliação da

distribuição entre os organismos, o acesso a outras bases de dados e a visualização de estruturas de proteínas conhecidas.

Os COGs (clusters de grupos de ortólogos de proteínas; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/) são obtidos por comparação de sequências de proteínas de 66 genomas sequenciados, representando 30 principais linhas filogenéticas. Cada COG é definido a partir de pelo menos três linhas, que permitam a identificação dos domínios ancestrais conservados.

Proteínas compartilhando homologia com a proteína desejada podem ser obtidas a partir de outros microorganismos, ou podem ser uma variante ou um fragmento funcional de uma proteína natural.

O termo "variante funcional ou fragmento funcional" significa que a sequência de aminoácidos do polipeptídeo não pode limitar-se estritamente à sequência observada na natureza, mas que pode conter mais aminoácidos. Pelo termo "fragmento funcional" entende-se que a sequência do polipeptídeo pode incluir menos aminoácidos do que a sequência original, mas ainda aminoácidos suficientes para conferir a atividade enzimática da sequência original de referência. É bem conhecido no estado da técnica que um polipeptídeo pode ser modificado por substituição,

inserção, exclusão e/ou adição de um ou mais aminoácidos, mantendo a sua atividade enzimática. Por exemplo, é comum a substituição de um aminoácido em uma determinada posição por um aminoácido quimicamente equivalente que não afeta as propriedades funcionais de uma proteína. Para efeitos da presente invenção, as substituições são definidas como intercâmbios dentro de um dos seguintes grupos:

• Resíduos alifáticos pequenos, não polares ou pouco polares: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly

• Polares, resíduos carregados negativamente e suas amidas: Asp, Asn, Glu, Gln

• Polares, resíduos positivamente carregados: His, Arg, Lys

• Resíduos alifáticos grandes, resíduos não-polares: Met, Leu, Ile, Val, Cys

• Resíduos aromáticos grandes: Phe, Tyr, Trp.

Alterações que resultam na substituição de um resíduo carregado negativamente por outro (como o ácido glutâmico pelo ácido aspártico) ou de um resíduo de carga positiva por outro (como lisina para arginina) podem esperadamente produzir um produto funcionalmente equivalente.

As posições nas quais os aminoácidos são modificados e quais números de aminoácidos serão sujeitos a modificações na sequência de aminoácidos não são parâmetros

particularmente limitados. Um técnico no assunto é capaz de reconhecer as modificações que podem ser introduzidas sem afetar a atividade da proteína. Por exemplo, alterações na porção N- ou C-terminal de uma proteína podem esperadamente não alterar a atividade de uma proteína em determinadas circunstâncias.

O termo "variante" refere-se à polipeptídeos submetidos a modificações, como definido acima, mantendo a atividade enzimática original.

Os termos "codificação" ou "código" referem-se ao processo pelo qual um polinucleotídeo, através dos mecanismos de transcrição e tradução, produz uma sequência de aminoácidos. Este processo é permitido pelo código genético, que é a relação entre a sequência de bases no DNA e a sequência de aminoácidos nas proteínas. Uma das principais características do código genético é que ele é degenerado, significando que um aminoácido pode ser codificado por mais de uma trinca de bases (um "códon"). A consequência direta deste fato é que uma mesma sequência de aminoácidos pode ser codificada por diferentes polinucleotídeos. É bem conhecido de um técnico no assunto que o uso de códons pode variar de acordo com os organismos. Dentre os códons que codificam o mesmo aminoácido, alguns podem ser usados, preferencialmente, por

um dado microorganismo. Assim, pode ser de interesse projetar-se um polinucleotídeo adaptado à utilização de códons de um microorganismo em particular, a fim de otimizar a expressão da proteína correspondente neste organismo.

Em alguns exemplos, genes ou enzimas podem ser designados pelo nome da atividade. Em alguns outros casos, a designação de "atividade" pode significar uma combinação de duas ou mais enzimas em combinação com a atividade desejada. Nesse caso, cada enzima na combinação pode ser codificada por genes distintos sob controle de diferentes elementos regulatórios, ou uma combinação de genes sob o controle do mesmo operon.

Genes que codificam para uma atividade de 2-ceto ácido descarboxilase são bem conhecidos na técnica, incluindo Pdc genes de várias espécies, e mais particularmente os genes PDC1, Pdc5, Pdc6, Aro10 e Thi3 de *Saccharomyces cerevisiae*, gene kivD de *Lactococcus lactis*; gene pdc de *Clostridium acetobutylicum*; genes Pdc2 e Pdc3 de *Arabidopsis thaliana*; genes Pdc2, PDC1 e Aro10 de *Pichia stipitis*; gene pdc de *Zymomonas mobilis*. A primeira subunidade do complexo 2-cetoglutarato descarboxilase, codificada pelo gene sucA da *Escherichia coli*, também possui atividade de 2-ceto ácido descarboxilase, bem como a enzima codificada pelo gene dxs

de *Escherichia coli*. Homólogos funcionais, variantes funcionais e fragmentos funcionais dos referidos genes e proteínas são abrangidos por esta definição.

Genes que codificam para uma atividade hidróxi aldeído redutase também são bem conhecidos na teecnica, incluindo genes yqhD, fucO, dkgA, dkgB de *Escherichia coli* e os genes ADH1 e ADH2 de *Saccharomyces cerevisiae*. Homólogos funcionais, variantes funcionais e fragmentos funcionais dos referidos genes e proteínas são abrangidos por esta definição.

Produção fermentativa

A presente invenção também diz respeito a produção fermentativa de um diol alifático, compreendendo as etapas de:

- Cultivar de um microorganismo em um meio de cultura adequado compreendendo uma fonte de carbono; e

- Recuperar o diol alifático do meio de cultura.

A fermentação é geralmente conduzida em fermentadores com um meio de cultura adequado ao microorganismo a ser utilizado, contendo pelo menos uma fonte de carbono simples e, se necessário, co-substratos.

Um "meio de cultura apropriado" designa um meio (por exemplo, um meio estéril, líquido) compreendendo nutrientes essenciais ou benéficos para a manutenção e/ou o

crescimento da célula, tais como: fontes de carbono ou substrato de carbono, fontes de nitrogênio, por exemplo, peptona, extratos de levedura, extratos de carne, extratos de malte, uréia, sulfato de amônia, cloreto de amônio, nitrato de amônio e fosfato; fontes de fósforo, por exemplo, fosfato monopotássico ou dipotássico; oligoelementos (por exemplo, sais de metais) como, por exemplo, sais de magnésio, sais de cobalto e/ou sais de manganês, bem como fatores de crescimento, tais como aminoácidos, vitaminas, promotores de crescimento e semelhantes.

Como exemplo de meios de cultura conhecido para *E. coli*, o meio de cultura pode ser de composição idêntica ou semelhante a um meio M9 (Anderson, 1946, Proc. Natl. Acad. Sci. 32:120-128 EUA), um meio M63 (Miller, 1992; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) ou um meio, tal como definido por Schaefer *et al.* (1999, Anal Biochem 270: 88-96).

Como outro exemplo de um meio de cultura para *C. glutamicum*, o meio de cultura pode ser de composição idêntica ou semelhante ao meio BMCG (Liebl *et al*, 1989, Appl Microbiol Biotechnol 32: 205-210) ou um meio tal como

descrito por Riedel *et al.* (2001, J. Mol Microbiol Biotechnol 3: 573-583).

Os termos "fonte de carbono" ou "substrato de carbono" ou "fonte carbônica", de acordo com a presente invenção, indicam qualquer fonte de carbono que pode ser utilizada por qualquer pessoa versada na técnica para propiciar o crescimento normal de um microrganismo, incluindo hexoses (tais como galactose, glicose ou lactose), pentoses, monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos (como a celobiose, sacarose ou maltose), melaço, fécula ou seus derivados, hemicelulose, glicerol e suas combinações. Uma fonte de carbono simples especialmente preferida é a glicose. Outra fonte de carbono simples preferida é a sacarose.

Em algumas modalidades da invenção, o meio de cultura compreende uma fonte de carbono para ser um subproduto de outro processo que utiliza biomassa como matéria-prima ou, eventualmente, o produto mecânico e/ou químico e/ou enzimático, e em tais casos tanto *in vitro* ou *in vivo*, da degradação da biomassa, como a degradação da celulose.

O microorganismo da presente invenção é vantajosamente escolhido e/ou modificado para utilizar a fonte de carbono como única fonte de carbono para crescer em meio de cultura.

Microrganismos selecionados para crescer em uma fonte específica de carbono são bem conhecidos no estado da técnica, bem como modificações a serem introduzidas em um microorganismo que lhe permitam crescer na referida fonte específica de carbono.

Os técnicos no assunto são capazes de definir as condições de cultura para os microrganismos de acordo com a presente invenção. Em especial, as bactérias fermentam a uma temperatura entre 20°C e 55°C, preferencialmente entre 25°C e 40°C e mais especificamente a cerca de 30°C para *C. glutamicum* e cerca de 37°C para *E. coli*.

Recuperar o diol alifático do meio de cultura é uma tarefa de rotina para um técnico no assunto.

Em um aspecto da invenção, o diol alifático recuperado é posteriormente purificado.

Métodos para recuperar um diol de um meio de cultura e sua purificação são conhecidos no estado da técnica e divulgados, entre outros, nos seguintes documentos: PCT/EP2008/063287, depositado em 03 de outubro de 2008 e PCT/EP2007/063068, depositado em 30 de novembro de 2007.

Modalidades específicas

Outras modalidades da presente invenção serão descritas a seguir. Os microrganismos são modificados tanto para favorecer a produção do metabólito de ácido hidróxi-2-

ceto-alifático quanto para a transformação para o correspondente diol alifático do produto obtido a partir da etapa de descarboxilação do referido metabólito de ácido hidróxi-2-ceto-alifático.

A descrição abaixo é feita por referência a *E. coli*, cujo microorganismo carece de atividade descarboxilase endógena para 2-ceto ácido. Portanto, um gene heterólogo que codifica para tal atividade é introduzido no microorganismo.

Modificações do microrganismo para otimizar o caminho para a produção do metabólito de ácido hidróxi-2-ceto-alifático e transformar o produto obtido a partir da etapa de descarboxilação do referido metabólito de ácido hidróxi-2-ceto-diol alifático na também são feitas com base nas vias metabólicas e nos genes endógenos conhecidos de *E. coli*. No entanto, um técnico no assunto pode usar estratégias semelhantes para introduzir ou eliminar genes correspondentes em outros microrganismos com genes e caminhos metabólicos conhecidos.

I. Preparação de etileno glicol

A via de biossíntese para a produção de etileno glycol, de acordo com a presente invenção, compreende três reações enzimáticas começando com a transformação do precursor 3-fosfohidroxipiruvato (precursor para serina).

Primeiro, uma atividade de fosfatase permite a conversão de fosfohidroxipiruvato em hidroxipiruvato. O hidroxipiruvato é transformado em glicoaldeído com uma atividade de 2-ceto ácido descarboxilase. Finalmente, uma atividade da hidróxi aldeído redutase permite a conversão do glicoaldeído em etileno glicol. Outro caminho para a produção de etileno glicol começa a partir de L-serina como precursor. Primeiro, uma atividade de transaminase ou de oxidase de aminoácidos permite a conversão de serina em hidroxipiruvato. As próximas duas etapas são semelhantes ao primeiro esquema descrito acima.

A via de biossíntese global é representada na Figura 1.

A presente invenção fornece um método para a produção fermentativa de etileno glicol, seus derivados ou precursores, incluindo: cultura de um microorganismo, particularmente uma bactéria, em meio de cultura adequado compreendendo uma fonte de carbono e a recuperação do etileno glicol a partir do meio de cultura.

Em uma modalidade preferida, o método é realizado com um microorganismo, particularmente uma bactéria, que contém pelo menos um gene que codifica um polipeptídeo com atividade de 2-ceto ácido descarboxilase e um gene que codifica um polipeptídeo com atividade hidróxi aldeído

redutase. Esses genes podem ser exógenos ou endógenos e podem ser expressos extracromossomalmente ou cromossomicamente.

Em uma modalidade adicional da invenção, o método é realizado com um microorganismo, particularmente uma bactéria, no qual a disponibilidade do intermediário 3-fosfoglicerato é aumentada. Preferencialmente, o aumento é conseguido por meio da atenuação do nível de expressão de genes que codificam fosfoglicerato mutases, em particular, um ou ambos os genes GPMA e pgmI. Isto pode ser feito através da substituição do promotor do tipo selvagem destes genes por um promotor mais fraco, ou pelo uso de um elemento desestabilizador do RNA mensageiro correspondente ou da proteína. Se necessário, a atenuação total dos genes também pode ser conseguida pela supressão das sequências de DNA correspondentes. A invenção também está relacionada com o microrganismo utilizado nesta modalidade particular da invenção, ou seja, um microorganismo, particularmente uma bactéria, que apresenta uma maior disponibilidade de 3-fosfoglicerato, em particular um microorganismo, de preferência uma bactéria, em que a expressão dos genes que codificam para fosfoglicerato mutases é atenuada, de preferência a expressão de um ou ambos os genes GPMA e pgmI.

Em outra modalidade, o método é realizado com um microorganismo, particularmente uma bactéria, no qual o fluxo na via de biossíntese de serina é estimulado. Isto pode ser conseguido através do aumento do nível de expressão da 3-fosfoglicerato desidrogenase e/ou fosfoserina aminotransferase, codificada pelo gene *serA* e *serC*, respectivamente. O aumento do nível de expressão da 3-fosfoglicerato desidrogenase e/ou fosfoserina aminotransferase pode ser conseguido através da introdução de promotores artificiais que dirigem a expressão dos genes *serA* e/ou *serC*, pelo aumento do número de cópias na célula ou através da introdução de mutações nos genes *serA* e/ou *serC* que aumentam a atividade das proteínas correspondentes. A expressão do gene *serA* pode ser aumentada através da substituição do gene *lrp* tipo selvagem (que codifica a proteína reguladora de resposta à leucina) por um alelo mutado *lrp* (como o alelo *lrp*-1, correspondendo a uma substituição GLU114ASP na proteína *lrp*) levando à ativação constitutiva da transcrição do gene *serA*. A presente invenção também é relacionada com o microorganismo, particularmente uma bactéria, utilizado nesta modalidade específica da invenção.

Em uma modalidade especial da presente invenção, mutações podem ser introduzidas nos genes *serA* que reduzem

a sensibilidade da proteína *serA* do inibidor *feed-back* de serina (alelos *feed-back* dessensibilizados) e, assim, permitindo uma maior atividade na presença de serina. Exemplos de alelos insensíveis, ou seja, alelos *feed-back* dessensibilizados, são descritos nos documentos EP 0 931 833 (Ajinomoto) ou EP 0 620 853 (Wacker).

Em outra modalidade, o método é realizado com um microorganismo, particularmente uma bactéria, em que o fluxo na via de biossíntese hidroxipiruvato é estimulado. Este resultado pode ser conseguido através do aumento do nível de expressão de serino transaminase ou serino oxidase (para o percurso a partir de serina como precursor), ou aumentando a expressão da fosfatase-3-fosfohidroxipiruvato. O aumento no nível de expressão da serino oxidase pode ser conseguido através da introdução e superexpressão do gene que codifica para oxidase de L-aminoácidos a partir de *R. opacus*, ou através da introdução de mutações no gene que aumenta a atividade da proteína correspondente. Um aumento na expressão de serino transaminase pode ser conseguido através da introdução de promotores artificiais que expressam gene *serC* de *E. coli* aumentando o número de cópias na célula ou através da introdução de mutações no gene *serC* que aumentam a atividade da proteína correspondente. Um aumento da expressão da 3-

fosfohidroxipiruvato fosfatase pode ser conseguido através da introdução de promotores artificiaia que expressam genes *yeaB* ou *serB* de *E. coli*, aumentando o número de cópias na célula ou através da introdução de mutações nos genes *yeaB* ou *serB* que aumentam a atividade das proteínas correspondentes. Um aumento da expressão da 3-fosfohidroxipiruvato fosfatase também pode ser alcançado através da introdução e superexpressão do gene *GPP2* de *S. cerevisiae*, ou através da introdução de mutações no gene *GPP2* que aumentam a atividade da proteína correspondente. A invenção também é relacionada com os microorganismos, particularmente uma bactéria, utilizados nesta modalidade específica da invenção.

Em uma modalidade adicional da invenção, o microorganismo, particularmente uma bactéria, é modificado para apresentar um nível de atenuação de conversão de serina para outros compostos de etileno glicol. Este resultado pode ser obtido pela atenuação do nível de enzimas consumidoras de serina como serino desaminases (codificada por *sdaA* e *sdaB* e *tdcG*), serino transacetilase (codificada por *cysE*), triptofano sintase (codificada por *trpAB*) ou serino hidroximetiltranferase (codificada por *glyA*). Esses genes podem ser atenuados através da substituição do promotor natural ou por um promotor de

menor força por elementos desestabilizadores do RNA mensageiro correspondente ou da proteína. Se necessário, a atenuação total do gene também pode ser alcançada por uma supressão da sequência de DNA correspondente. A invenção também é relacionada com os microorganismos, particularmente uma bactéria, utilizados nesta modalidade específica da invenção.

Em uma modalidade adicional da invenção, o microorganismo, particularmente uma bactéria, é modificado para apresentar um nível de atenuação de conversão de hidroxipiruvato a outros compostos além de glicoaldeído. Este resultado pode ser obtido pela atenuação do nível de enzimas que consomem hidroxipiruvato, como hidroxipiruvato redutase (codificada por *ghrA*) ou hidroxipiruvato isomerase (codificada por *hyi*). Estes genes podem ser atenuados através da substituição do promotor natural ou por um promotor de menor força por elementos desestabilizadores do RNA mensageiro correspondente ou da proteína. Se necessário, a atenuação total do gene também pode ser alcançada por uma supressão da sequência de DNA correspondente. A invenção também é relacionada aos microorganismos, particularmente uma bactéria, utilizados nesta modalidade específica da invenção.

Em uma modalidade adicional da invenção, o

microorganismo, particularmente uma bactéria, é modificado para apresentar um nível de atenuação de conversão de glicoaldeído a outros compostos além de etileno glicol. Isto pode ser alcançado por meio da atenuação do nível de enzimas que consomem hidroxitreonina, como glicoaldeído aldolase (codificada por *ltaE*) ou glicoaldeído desidrogenase (codificada por *aldA*, *aldB*). A atenuação desses genes pode ser feita através da substituição do promotor natural por um promotor de menor força ou por elementos desestabilizadores do RNA mensageiro correspondente ou da proteína. Se necessário, a atenuação total do gene também pode ser alcançada por uma supressão da sequência de DNA correspondente. A invenção também é relacionada aos microorganismos, particularmente uma bactéria, utilizados nesta modalidade específica da invenção.

Em um aspecto da invenção, a eficiência de importação de açúcar é aumentada, utilizando-se um sistema de importação de açúcar não dependente de fosfoenolpiruvato (PEP) como doador de fósforo como a *galP* que é conhecida para o transporte de glicose, ou pelo fornecimento de mais fosfoenolpiruvato (PEP) para o fosfotransferase-açúcar do sistema. Existem vários meios que podem ser utilizados para aumentar a disponibilidade de PEP em um microorganismo. Em

particular, este pode ser realizado pela atenuação da reação piruvato → PEP. Preferencialmente, pelo menos um gene selecionado entre *pykA* e *pykF*, codificando piruvato quinase, é atenuado na referida linhagem, a fim de obter este resultado. Outra forma de aumentar a disponibilidade de PEP é favorecer a reação piruvato → PEP. Isto pode ser conseguido através do aumento da atividade da enzima fosfoenolpiruvato que catalisa a reação acima. Esta enzima é codificada pelo gene *ppsA*. Portanto, no microorganismo, a expressão do gene *ppsA* é preferencialmente aumentada. Ambas as alterações podem estar presentes no microorganismo simultaneamente.

II. Preparação de 1,3-propanodiol

A via de biossíntese para a produção de 1,3-propanodiol de acordo com a presente invenção compreende três reações enzimáticas, começando com a transformação do precursor de L-homoserina (obtido a partir de L-aspartato). Primeiro, uma atividade homosserino transaminase ou homosserino oxidase permite a conversão de L-homoserina em 4-hidróxi-2-cetobutirato. A segunda atividade descarboxilase do 2-ceto ácido permite a conversão de 4-hidróxi-2-cetobutirato em 3-hidroxipropionaldeído. O 3-hidroxipropionaldeído é então convertido em 1,3-propanodiol com uma atividade hidróxi aldeído redutase.

A via de biossíntese global é representado na figura 2.

A presente invenção fornece um método para a produção fermentativa de 1,3-propanodiol, seus derivados ou precursores, incluindo: cultivar um microorganismo, particularmente uma bactéria, em meio de cultura adequado compreendendo uma fonte de carbono e a recuperação de 1,3-propanodiol a partir de meio de cultura.

Em uma modalidade preferida, o método é realizado com um microorganismo, particularmente uma bactéria, que contém pelo menos um gene que codifica um polipeptídeo com atividade de 2-ceto ácido descarboxilase e um gene que codifica um polipeptídeo com atividade hidróxi aldeído redutase. Estes genes podem ser exógenos ou endógenos e podem ser expressos extracromolsomalmente ou cromossomicamente.

Em outra modalidade, o método é realizado com um microorganismo, particularmente uma bactéria, cujo fluxo na via de biossíntese de oxalacetato é estimulado, sendo que este resultado pode ser conseguido através do aumento do nível de expressão da fosfoenolpiruvato carboxilase, codificada pelo gene *ppc*. O aumento da expressão da fosfoenolpiruvato carboxilase pode ser alcançado através da introdução de promotores artificiais que expressam o gene

ppc, pelo aumento do número de cópias na célula ou através da introdução de mutações no gene *ppc* que aumentam a atividade da proteína correspondente. A disponibilidade de produto intermediário oxaloacetato também pode ser aumentada por meio da atenuação do nível de expressão de genes que codificam para fosfoenolpiruvato carboxiquinase e/ou enzimas málicas, codificada pelos genes *pckA* e/ou *maeA* e/ou *maeB*, respectivamente. Isto pode ser feito através da substituição do promotor do tipo selvagem desses genes por um promotor mais fraco, ou pelo uso de um elemento desestabilizador do RNA mensageiro correspondente ou da proteína. Se necessário, a atenuação total dos genes também pode ser conseguida pela supressão das sequências de DNA correspondentes. A invenção também é relacionada aos microorganismos, particularmente uma bactéria, utilizados nesta modalidade particular da invenção, ou seja, um microorganismo, uma bactéria em particular, apresentando um aumento da disponibilidade dos oxaloacetato.

Em outra modalidade, o método é realizado com um microorganismo, particularmente uma bactéria, em que o fluxo na via de biossíntese homosserina é estimulado. Isto pode ser conseguido através do aumento da expressão de aspartoquinase e homosserino desidrogenase e/ou aspartato semialdeído desidrogenase, codificada pelos genes *thrA* e

asd, respectivamente. O aumento da expressão de aspartoquinase e homosserino desidrogenase e/ou aspartato semialdeído desidrogenase pode ser realizado através da introdução de promotores artificiais que dirigem a expressão de genes *thrA* e/ou *asd*, aumentando o número de cópias na célula ou através da introdução de mutações nos genes *thrA* e/ou *asd* que aumentam a atividade das proteínas correspondentes. A invenção também é relacionada aos microorganismos, particularmente uma bactéria, utilizados nesta modalidade específica da invenção.

Em uma modalidade especial da presente invenção mutações podem ser introduzidas no gene *thrA* que reduzem a sua sensibilidade para o inibidor de *feed-back* de treonina (alelos *feed-back* dessensibilizados) e, assim, permitir uma maior atividade na presença de treonina.

Em outra modalidade, o método é realizado com um microorganismo, particularmente uma bactéria, em que o fluxo na via de biossíntese de 4-hidróxi-2-cetobutirato é estimulado. Este resultado pode ser conseguido através do aumento da expressão de homosserino transaminase ou homosserino oxidase. O aumento da expressão da homosserino oxidase pode ser realizado através da introdução e superexpressão do gene que codifica para a L-aminoácido oxidase de *R. opacus*, ou através da introdução de mutações

no gene que aumentam a atividade da proteína correspondente. O aumento do nível de expressão de homosserino transaminase pode ser conseguido através da introdução de promotores artificiais que dirigem a expressão do gene *serC* de *E. coli*, aumentando o número de cópias na célula ou através da introdução de mutações no gene *serC* que aumentam a atividade da proteína correspondente. A invenção também é relacionada aos microorganismos, particularmente uma bactéria, utilizados nesta modalidade específica da invenção.

Em uma modalidade adicional da invenção, o microorganismo, particularmente uma bactéria, é modificado para apresentar um nível de atenuação de conversão homosserina a outros compostos além de 1,3-propanodiol. Este resultado pode ser obtido pela atenuação do nível de enzimas que consomem homosserina, como homosserino quinase e treonino sintase (codificada por *thrB* e *thrC*), homosserino O-transsuccinilase (codificada por *metA*) ou dihidrodipicolinato sintase (codificada por *dapA*). Estes genes podem ser atenuados através da substituição do promotor natural por um promotor mais fraco ou por elementos desestabilizadores no RNA mensageiro ou proteínas correspondentes. Se necessário, a atenuação total do gene também pode ser alcançada pela supressão da sequência de

DNA correspondente. A invenção também é relacionada aos microorganismos, particularmente uma bactéria, utilizados nesta modalidade específica da invenção.

Em uma modalidade adicional da invenção, o microorganismo, particularmente uma bactéria, é modificado para apresentar um nível de atenuação de conversão 3-hidroxipropionaldeído a outros compostos além de 1,3-propanodiol. Isto pode ser alcançado por meio da atenuação do nível de enzimas que consomem 3-hidroxipropionaldeído, como a 3-hidroxipropionaldeído-desidrogenase (codificada por *aldA*, *aldB*). Estes genes podem ser atenuados através da substituição do promotor natural por um promotor mais fraco ou por elementos desestabilizadores do RNA mensageiro correspondente ou da proteína. Se necessário, a atenuação total do gene também pode ser alcançada pela supressão da sequência de DNA correspondente. A invenção também é relacionada aos microorganismos, particularmente uma bactéria, utilizados nesta modalidade específica da invenção.

Em um aspecto da invenção, a eficiência da importação de açúcar é aumentada, utilizando-se um sistema de importação de açúcar não dependente de fosfoenolpiruvato (PEP) como doador de fósforo como o codificado pela *galP*, que é conhecido para o transporte de glicose, ou pelo

fornecimento de mais fosfoenolpiruvato (PEP) para o sistema fosfotransferase-açúcar. Existem vários meios que podem ser usados para aumentar a disponibilidade de PEP em um microorganismo. Em particular, este pode ser obtido pela atenuação da reação piruvato → PEP. Preferencialmente, pelo menos um gene selecionado entre *pykA* e *pykF*, codificando piruvato quinase, é atenuado na referida linhagem, a fim de obter este resultado. Outra forma de aumentar a disponibilidade de PEP é favorecer a reação piruvato → PEP. Isto pode ser conseguido através do aumento da atividade da enzima fosfoenolpiruvato que catalisa a reação acima. Esta enzima é codificada pelo gene *ppsA*. Portanto, no microorganismo, a expressão do gene da *ppsA* é preferencialmente aumentada. Ambas as alterações podem estar presentes no microorganismo simultaneamente.

III. Preparação de 1,4-butanodiol

A via de biossíntese para a produção de 1,4-butanodiol de acordo com a presente invenção compreende cinco reações enzimáticas começando com a transformação do precursor 2-cetoglutarato (metabólito do ciclo de Krebs).

A primeira atividade, 4-oxoglutaril-CoA sintetase, permite a conversão de 2-cetoglutarato em 4 oxoglutaryl-CoA. Este composto é então convertido em 5-hidróxi-2-cetopentanoato com as combinações de duas atividades, a

aldeído desidrogenase primeiro e depois a álcool desidrogenase ambas codificadas pelo gene *adhE2* de *Clostridium acetobutylicum* ou *adhE* de *Escherichia coli*. A atividade 2-ceto ácido descarboxilase permite, então, a conversão do 5-hidróxi-2-oxopentanoato em 4-hidroxibutiraldeído, que é posteriormente convertido em 1,4-butanodiol com base na atividade hidróxi aldeído redutase.

A via de biossíntese global é representada na figura 3.

A presente invenção fornece um método para a produção fermentativa de 1,4-butanodiol, seus derivados ou precursores, incluindo: cultivar um microorganismo, particularmente uma bactéria, em meio de cultura adequado compreendendo uma fonte de carbono e recuperar o 1,4-butanodiol a partir do meio de cultura.

Em uma modalidade preferida, o método é realizado com um microorganismo, particularmente uma bactéria, que contém pelo menos um gene que codifica um polipeptídeo com atividade de 2-ceto ácido descarboxilase e um gene que codifica um polipeptídeo com atividade hidróxi aldeído redutase. Estes genes podem ser exógenos ou endógenos, e podem ser expressos extracromossomalmente ou cromossomicamente.

Em outra modalidade, o método é realizado com um microorganismo, particularmente uma bactéria, no qual o fluxo na via de biossíntese de oxalacetato é estimulado (entrada do ciclo de Krebs). Isto pode ser conseguido através do aumento da expressão da fosfoenolpiruvato carboxilase, codificada pelo gene *ppc*. O aumentando da expressão da fosfoenolpiruvato carboxilase pode ser realizado através da introdução de promotores artificiais que a expressam o gene *ppc*, aumentando o número de cópias na célula ou através da introdução de mutações no gene *ppc* que aumentam a atividade da proteína correspondente. A disponibilidade do produto intermediário oxaloacetato também pode ser aumentada por meio da atenuação do nível de expressão de genes que codificam para carboxicinase fosfoenolpiruvato e/ou enzimas málicas, codificadas pelos genes *pckA* e/ou *maeA* e/ou *maeB*, respectivamente. Isso pode ser feito através da substituição do promotor do tipo selvagem destes genes por um promotor mais fraco, ou pelo uso de um elemento desestabilizador do RNA mensageiro correspondente ou da proteína. Se necessário, a atenuação total dos genes também pode ser conseguida pela supressão das sequências de DNA correspondentes. A invenção também é relacionada aos microorganismos, particularmente uma bactéria, utilizados nesta modalidade particular da

invenção, ou seja, um microorganismo, uma bactéria em particular, apresentando um aumento da disponibilidade de 2-cetoglutarato.

Em outra modalidade, o método é realizado com um microorganismo, particularmente uma bactéria, na qual o fluxo na via de biossíntese de 2-cetoglutarato é estimulado. Isto pode ser conseguido através do aumento da expressão da enzima citrato sintase e/ou isocitrato desidrogenase, codificadas pelos genes *gltA* e *icd*, respectivamente. O aumento da expressão da citrato sintase e/ou isocitrato desidrogenase pode ser realizado através da introdução de promotores artificiais que dirigem a expressão dos genes *gltA* e/ou *icd*, aumentando o número de cópias na célula ou através da introdução de mutações nos genes *gltA* e/ou *icd* que aumentam a atividade das proteínas correspondentes. A atividade isocitrato desidrogenase é modulada por fosforilação ou desfosforilação, que são reações catalisadas por AceK. A fosforilação reduz a atividade de Icd e a desfosforilação reativa a enzima Icd. A atividade da enzima Icd pode, portanto, também ser controlada através da introdução de genes mutantes *aceK* que reduzam a atividade da quinase e aumentem a atividade da fosfatase em comparação com a enzima do tipo selvagem AceK. O nível de atividade AceK também pode ser diminuído pela

atenuação da expressão do gene *aceK*. Isto pode ser feito através da substituição do promotor do tipo selvagem do gene por um promotor mais fraco, ou pelo uso de um elemento desestabilizador do RNA mensageiro correspondente ou da proteína. Se necessário, a atenuação total do gene também pode ser alcançada pela supressão da sequência de DNA correspondente. A disponibilidade do intermediário 2-cetoglutarato também pode ser aumentada pela atenuação da expressão de genes que codificam para 2-cetoglutarato descarboxilase e succinil-CoA sintetase e/ou isocitrato liase e malato sintase, codificadas pelos genes *sucAB* ou *sucCD* e/ou *aceA* ou *aceB*, respectivamente. Isto pode ser feito através da substituição do promotor do tipo selvagem destes genes por um promotor mais fraco, ou pelo uso de um elemento desestabilizador do RNA mensageiro correspondente ou da proteína. O fluxo no ciclo de Krebs também pode ser aumentado pelo alívio da repressão da ArcA (codificada pelo gene *arcA*) que reprime os genes que codificam o ciclo de Krebs. A invenção também é relacionada aos microorganismos, particularmente uma bactéria, utilizados nesta modalidade particular da invenção, ou seja, um microorganismo, uma bactéria em particular, apresentando um aumento da disponibilidade de 2-cetoglutarato.

Em outra modalidade, o método é realizado com um

microorganismo, particularmente uma bactéria, em que o fluxo na via de biossíntese de 5-hidróxi-2-cetopentanoato é estimulado. Isto pode ser conseguido através do aumento da expressão da 4-oxoglutaril-CoA sintetase (formador de AMP, como codificada pelos genes *prpE*, ou formador de ADP, como codificada pelos genes *sucC* e *sucD*) e/ou o aldeído redutase / álcool desidrogenase. A invenção também é relacionada aos microorganismos, particularmente uma bactéria, utilizados nesta modalidade específica da invenção.

Em uma modalidade adicional da invenção, o microorganismo, particularmente uma bactéria, é modificado para apresentar um nível de atenuação de conversão de 2-cetoglutarato a outros compostos que não 1,4-butanodiol. Isto pode ser alcançado por meio da atenuação do nível de enzimas que consomem 2-cetoglutarato como a glutamato desidrogenase ou glutamato sintase (codificada por *gdhA* e *gltB*). Estes genes podem ser atenuados através da substituição do promotor natural por um promotor mais fraco ou por elementos desestabilizadores do RNA mensageiro correspondente ou da proteína. Se necessário, a atenuação total do gene também pode ser alcançada pela supressão da sequência de DNA correspondente. A invenção também é relacionada aos microorganismos, particularmente uma bactéria, utilizados nesta modalidade específica da

invenção.

Em uma modalidade adicional da invenção, o microorganismo, particularmente uma bactéria, é modificado para apresentar um nível de atenuação da conversão de 4-hidroxibutiraldeído a outros compostos que não 1,4-butanodiol. Isto pode ser alcançado por meio da atenuação do nível de enzimas que consomem 4- hidroxibutiraldeído, como a 4-hidroxibutiraldeído-desidrogenase (codificado por *aldA*, *aldB*). Estes genes podem ser atenuados através da substituição do promotor natural por um promotor mais fraco ou por elementos desestabilizadores do RNA mensageiro correspondente ou da proteína. Se necessário, a atenuação total do gene também pode ser alcançada pela supressão da sequência de DNA correspondente. A invenção também é relacionada aos microorganismos, particularmente uma bactéria, utilizados nesta modalidade específica da invenção.

Em uma modalidade adicional da invenção, o microorganismo, particularmente uma bactéria, é modificado para produzir 1,4-butanodiol em condições anaeróbicas. Para alcançar tal capacidade, o sistema de transporte PTS-açúcar é excluído no referido microorganismo, a fim de metabolizar o açúcar através de um sistema de transporte permease/quinase. A fim de produzir ATP suficiente para o

crescimento do microrganismo em condições anaeróbias, oxaloacetato deve ser produzido a partir de fosfoenolpiruvato através da atividade fosfoenolpiruvato carboxiquinase codificada pelo gene *pckA* em *E. coli*. Isso gera um mol de ATP por mol de oxaloacetato produzido. De maneira semelhante, a conversão de 2-oxoglutarato em 4-oxoglutaril-CoA deve ser alcançada através da 4-oxoglutaril-CoA sintetase. A atividade formadora de ADP, tal como a codificada pelos genes *sucC* e *sucD* em *E. coli*, consome apenas um mol de ATP por mol de 4-oxoglutaril-CoA produzido. A via metabólica descrita para produzir 1,4-butanodiol a partir de D-glicose é especialmente adaptada para as condições de crescimento anaeróbio. O equilíbrio da reação global da via é: D-glicose + ADP + Pi → 1,4-butanodiol + formato + CO2 + H2O + ATP. Em uma modalidade adicional da invenção, o microorganismo, particularmente uma bactéria, é modificado para apresentar um nível de atenuação de conversão de acetil-CoA para outros compostos que não 1,4-butanodiol; este resultado podendo ser obtido pela atenuação do nível de enzimas que consomem acetil-CoA como acetato quinase e fosfato acetiltransferase (codificada por *ackA* e *pta*). A atenuação destes genes pode ser feita através da substituição do promotor natural por um promotor de menor potência ou por um elemento

desestabilizador do RNA mensageiro correspondente ou da proteína. Se necessário, a atenuação total do gene também pode ser alcançada por uma supressão da sequência de DNA correspondente. A invenção também é relacionada aos microorganismos, particularmente uma bactéria, utilizados nesta modalidade específica da invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Construção de linhagens que expressam um gene 2-ceto ácido que codifica a hidróxi aldeído descarboxilase e um gene que codifica redutase: MG1655

(pMEl01-kivDl1-yqhD-TT07)

1.1 Construção do plasmídeo pM-Ptrc01-kivDl1-TT07 para a superexpressão de kivD de Lactococcus lactis descarboxilase que codifica a alfa-ceto-isovalerato descarboxilase:

Um gene sintético *kivD* de *Lactococcus lactis* codificando para a alfa-ceto-isovalerato descarboxilase foi preparado por Geneart (Alemanha). O uso de códons e o conteúdo GC do gene foi adaptado para *Escherichia coli* de acordo com a matriz do fornecedor. A expressão do gene sintético foi conduzida por um promotor *Ptrc* constitutivo. Um terminador de transcrição foi adicionado a jusante do gene. A construção foi clonada em vetores pM do fornecedor e verificada por sequenciamento. Quando necessário, o gene

sintético foi clonado no vetor pME101 (este plasmídeo é derivado do plasmídeo pCL1920 (Lerner & Inouye, 1990, NAR 18, 15 p 4631)) antes de transformar uma linhagem de *E. coli*.

Ptrc01 kivDll-TT07:

sítios de restrição (BamHI, HindIII, EcoRV) (SEQ ID NO 1):

ggatccatgcaagcttatgcgatatc

promotor Ptrc01 (SEQ ID NO 2):

gagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaataaggaggtataac

sequência do gene *kivDll* otimizado para *E. coli* (CAG34226.) (SEQ ID NO 3):

atgtataccgtgggtgattatctgctggatcgtctgcatgaactgggcattgaagaaat
tttcggcgttccgggtgattataatctgcagtttctggatcagattattagccataaag
atatgaaatgggtgggtaatgccaatgaactgaatgcaagctatatggcagatggttat
gcccgtaccaaaaaagcagcagcatttctgaccacctttggtgttggtgaactgagcgc
agttaatggtctggctggtagctatgcagaaaatctgccggttgttgaaattgttggta
gcccgaccagcaaagttcagaatgaaggcaaatttgtgcatcataccctggccgatggt
gattttaaacatttcatgaaaatgcatgaaccggttaccgcagcacgtaccctgctgac
cgcagaaaatgcaaccgttgaaattgatcgtgttctgagcgcactgctgaaagaacgta
aaccggtgtatattaatctgccggtggatgttgcagcagcaaaagcagaaaaaccgagc
ctgccgctgaaaaaagaaaatagcaccagcaataccagcgatcaggaaattctgaataa
aattcaggaatccctgaaaaacgccaaaaaaccgattgtgattaccggtcatgaaatta
ttagctttggcctggaaaaaaccgttacccagtttattagcaaaaccaaactgccgatt
accaccctgaattttggtaaaagcagcgttgatgaagcactgccgagctttctgggtat

ttataatggcaccctgagcgaaccgaatctgaaagaatttgtggaaagcgcagatttca
ttctgatgctgggtgttaaactgaccgatagctctaccggtgcatttacccatcatctg
aatgaaaacaaaatgattagcctgaatattgatgaaggcaaaatttttaatgaacgcat
tcagaattttgattttgaaagcctgattagcagcctgctggatctgagcgaaatcgaat
ataaaggcaaatatattgataaaaaacaggaagattttgttccgagcaatgcactgctg
tctcaggatcgtctgtggcaggcagttgaaaatctgacccagagcaatgaaaccattgt
tgcagaacagggcaccagcttttttggtgcaagcagcatttttctgaaaagcaaaagcc
attttattggtcagccgctgtggggtagcattggttatacctttccggcagcactgggt
agccagattgcagataaagaaagccgtcatctgctgtttattggtgatggtagcctgca
gctgaccgttcaggaactgggtctggccattcgcgaaaaaattaatccgatttgcttta
ttatcaataatgatggctataccgtggaacgtgaaattcatggtccgaatcagagctat
aatgatattccgatgtggaattatagcaaactgccggaatcttttggtgcaaccgaaga
tcgtgttgtgagcaaaattgtgcgcaccgaaaatgaatttgtgagcgtgatgaaagaag
cacaggcagatccgaatcgtatgtattggattgaactgattctggccaaagaaggtgca
ccgaaagttctgaaaaaaatgggcaaactgttcgccgaacagaataaaagctaa

terminador de sequência T7Te (ref: Harrington KJ, Laughlin RB e Liang S. Proc Acad nacional Sci UAS A. 24 de abril de 2001, 98 (9) :5019-24.) (SEQ ID NO 4):

attacgtagaAGATCTtcctggctcaccttcgggtgggcctttctg

sítios de restrição (*SmaI, BamHI, EcoRI*) (SEQ ID NO 5):

ccccgggatgcggatccatgcgaattc

Para a expressão de um vetor de cópia baixa do plasmídeo pME101 foi construído como se segue. O plasmídeo pCL1920 foi amplificado por PCR utilizando os

oligonucleotídeos PME101F e PME101R e o fragmento *BstZ17I - XmnI* do vetor pTRC99A carreando o gene *lacI* e o promotor Ptrc foi inserido no vetor amplificado. O vetor resultante foi restringido por *NcoI* e *BamHI* e o vetor contendo os genes kivDll foi restringido por AflIII e BamHI. O fragmento contendo kivDll foi então clonado no vetor pME101: O plasmídeo resultante foi denominado pME101 kivDll-TT07

PME101F (SEQ ID NO 6): ccgacagtaa gacgggtaag cctg PME101R (SEQ ID NO 7): agcttagtaa agcccctcgct ag

1.2 Construção de um plasmídeo pME101-kivDll-yqhD-TT07 para a superexpressão de kivD de Lactococcus lactis descarboxilase que codifica a alfa-cetoisovalerato descarboxilase e yqhD de Escherichia coli codificando metilglioxal redutase:

O vetor pME101 e o vetor contendo os genes *kiv*Dll foram restringidos por *SnaBI* e *BglII* e o fragmento contendo *yqh*D foi clonado no vetor pME101, o plasmídeo resultante sendo denominado pME101-kivDll-yqhD-TT07.

O gene *yqh*D foi amplificado por PCR do DNA genômico da linhagem de *E. coli* MG1655 com os oligonucleotídeos *yqh*D F e *yqh*D R:

*yqh*D F (SEQ ID NO 8)

T***TACGTA***cccagcaaagggagcaagtaatgaacaac

- região para adição de um sítio de restrição SnaBI (caracteres maiúsculos em negrito e itálico)

- região (em caracteres minúsculos) homóloga à região de *E. coli* MG1655 *yqh*D de 3153357 a 3153385

*yqh*D R (SEQ ID NO 9)

a***agatct***tcTTAGCGGGCGGCTTCGTATATAC

- região (em caracteres maiúsculos) homóloga à região de *E. coli* MG1655 *yqh*D de 3154540 a 3154518

- região de adição de um sítio de restrição *Bgl*II (caracteres minúsculos em negrito e itálico)

Fragmentos amplificados por PCR foram cortados com as enzimas de restrição *Sna*BI e *Bgl*II e clonados nos sítios *Sna*BI - *Bgl*II do vetor pME101-*kivDll*-TT07 resultando no vetor pME101-*kivDll*-*yqh*D-TT07.

Exemplo 2

Construção de linhagens com maior fluxo da via de etileno glicol: MG1655 □*sdaA* □*sdaB* □*pykF* Ptrc18-gpmA Ptrc18-gpmB (pME101-kivDll-yqhD-TT07)

2.1 Construção da linhagem MG1655 □*sdaA* □*sdaB*

Para eliminar o gene *sdaA*, a estratégia de recombinação homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000) foi utilizada. Esta estratégia permitiu a inserção de um cassete de cloranfenicol ou de um cassete de resistência à canamicina, ao excluir a maioria dos genes em questão. Para

este efeito, os seguintes oligonucleotídeos foram utilizados:

ΔsdaAF (SEQ ID NO 10)

gtcaggagtattatcgtgattagtctattcgacatgtttaaggtggggattggtccctc atcttcccataccgtagggccTGTAG GCTGGAGCTGCTTCG com

- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à sequência (1894941-1895020) do gene *sdaA* (sequência de referência na página eletrônica http://genolist.pasteur.fr/Colibri/),
- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para a ampliação do cassete de resistência à canamicina (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

ΔsdaAR (SEQ ID NO 11)

GGGCGAGTAAGAAGTATTAGTCACACTGGACTTTGATTGCCAGACCACCGCGT GAGGTTTCGCGGTATTTGGCGTTCATGTCCCATATGAATATCCTCCTAAG com

- uma região (caracteres maiúsculos) homóloga à sequência (1896336-1896254) do gene *sdaA* (sequência de referência na página eletrônica http://genolist.pasteur.fr/Colibri/),
- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para a ampliação do cassete de resistência à canamicina (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Os oligonucleotídeos ΔsdaAF e ΔsdaAR foram utilizados

para amplificar o cassete de resistência à canamicina a partir do plasmídeo pKD4. O produto de PCR obtido foi, então, introduzido por eletroporação na linhagem MG 1655 (pKD46). Os transformantes resistentes à canamicina foram selecionadas e a inserção do cassete de resistência foi confirmada por análise de PCR com os oligonucleotídeos sdaAF e sdaAR definidos abaixo. A linhagem retida foi designada MG1655 ΔsdaA: Km. sdaAF (SEQ ID NO 12): cagcgttcgattcatctgcg (homóloga à sequência 1894341-1894360). sdaAR (SEQ ID NO 13): GACCAATCAGCGGAAGCAAG (homóloga à sequência 1896679-1896660).

Os transformantes resistentes à canamicina foram então selecionados e o ΔsdaA: Km foi verificado pela análise de PCR com os oligonucleotídeos previamente definidos sdaAF sdaAR. A linhagem retida foi designada MG1655 ΔsdaA: Km. Em seguida, o DsdaB: Cm foi introduzido na linhagem MG1655 ΔsdaA: Km por transdução. O ΔsdaB MG1655: Cm foi construído utilizando-se o mesmo método, como descrito anteriormente, com o seguinte oligonucleotídeo:

ΔsdaBF (SEQ ID NO 14)

cggcattggcccttccagttctcataccgttggaccaatgaaagcgggtaaacaatttaccgacgatctgattgcccgTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG com

- uma região (em caracteres minúscuoas) homóloga à

sequência (2927627-2927705) do gene *sda*B (sequência de referência na página eletrônica http://genolist.pasteur.fr/Colibri/),

- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para a ampliação do cassete de resistência a cloranfenicol (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

ΔsdaBR (SEQ ID NO 15)

CGCAGGCAACGATCTTCATTGCCAGGCCGCCGCGAGAGGTTTCGCGGTACTTGGCGTTC ATATCTTTACCTGTTTCGTACCATATGAATATCCTCCTTAG com

- uma região (caracteres maiúsculos) homóloga à sequência (2928960-2928881) do gene *sda*B (sequência de referência na página eletrônica http://genolist.pasteur.fr/Colibri/),

- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para a ampliação do cassete de resistência a cloranfenicol (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Os oligonucleotídeos ΔsdaBF e ΔsdaBR foram utilizados para amplificar o cassete de resistência a cloranfenicol do plasmídeo pKD3. O produto de PCR obtido foi, então, introduzido por eletroporação na linhagem MG1655 (pKD46). Os transformantes resistentes a cloranfenicol foram selecionados e a inserção do cassete de resistência foi confirmada por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos

sdaBF e sdaBR definidos abaixo. A linhagem retida foi designada MG1655 ΔsdaB: Cm. sdaBF (SEQ ID NO 16): Gcgtaagtacagcggtcac (homóloga à sequência 2927450-2927468). sdaBR (SEQ ID NO 17): CGATGCCGGAACAGGCTACGGC (homóloga à sequência 2929038-2929017). Para transferir a ΔsdaB::Cm, o método de transdução de Pl fago foi usado. A preparação do lisato de fago da linhagem MG1655 ΔsdaB::Cm foi utilizada para a transdução na linhagem MG1655 ΔsdaA::Km.

Os transformantes resistentes a cloranfenicol, foram selecionados e a ΔsdaB::Cm foi verificada por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos previamente definidos sdaBF e sdaBR. A linhagem retida foi designada MG1655 ΔsdaA::Km ΔsdaB::Cm. Os cassetes de resistência à canamicina e a cloranfenicol foram, então, eliminados. O plasmídeo pCP20 carregando a FLP recombinase atuando nos locais FRT da canamicina e os cassetes de resistência a cloranfenicol foi então introduzido nos sitios recombinantes através de eletroporação. Após uma série de culturas a 42°C, a perda da resistência a canamicina e os cassetes cloranfenicol foram verificados por uma análise de PCR com os mesmos oligonucleotídeos utilizados anteriormente (sdaAF / sdaAR e sdaBF / sdaBR). A linhagem retida foi designada MG1655 DsdaA ΔsdaB.

2.2 Construção da linhagem MG1655 ΔsdaA ΔsdaB ΔpykF6

Para eliminar o gene *pykF*, a estratégia de recombinação homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000) foi utilizado. Esta estratégia permitiu a inserção de um cassete de resistência a cloranfenicol ou à canamicina, ao excluir a maioria dos genes em questão. Para este efeito, os seguintes oligonucleotídeos foram utilizados:

ΔpykFF (SEQ ID NO 18)

cccatccttctcaacttaaagactaagactgtcatgaaaaagaccaaaattgtttgcac catcggaccgaaaaccgaaTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG com

- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à sequência (1753689-1753766) da região *pykF* (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres maiúsculos) para a ampliação do cassete de resistência à canamicina (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

ΔpykFR (SEQ ID NO 19)

ggacgtgaacagatgcggtgttagtagtgccgctcggtaccagtgcaccagaaaccata actacaacgtcacctttgtgCATATGAATATCCTCCTTAG com

- uma região (caracteres maiúsculos) homóloga à sequência (1755129-1755051) da região *pykF* (sequência de referência na página eletronica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres maiúsculos) para a ampliação do cassete de resistência à canamicina (sequência de

referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Os oligonucleotídeos ΔpykFF e ΔpykFR foram utilizados para amplificar o cassete de resistência à canamicina do plasmídeo pKD4. O produto de PCR obtido foi, então, introduzido por eletroporação na linhagem MG 1655 (pKD46). Os transformantes resistentes a canamicina foram selecionados e, em seguida, a inserção do cassete de resistência foi confirmada por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos pykFF e pykFR definidos abaixo. A linhagem retida foi designada MG1655 ΔpykF::Km. pykFF (SEQ ID NO 20): gcgtaacctttccctggaacg (homóloga à sequência 1753371-1753392). pykFR (SEQ ID NO 21): gcgttgctggagcaacctgccagc (homóloga à sequência 1755518-1755495).

Para transferir a ΔpykF::Km, o método de transdução de Pl fago foi utilizado. A preparação do lisado de fago da linhagem MG1655 ΔpykF::Km foi utilizada para a transdução na linhagem MG1655 ΔsdaA ΔsdaB.

Os transformantes resistentes à canamicina foram selecionados e o ΔpykF::Km foi verificado por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos previamente definidos pykFF e pykFR. A linhagem retida foi designada MG1655 ΔsdaA ΔsdaB ΔpykF::Km.

O cassete de resistência à canamicina foi então eliminado. O plasmídeo pCP20 carregando a FLP recombinase atuando nos sítios FRT do cassete de resistência à canamicina foi então introduzido no sítio recombinante através de eletroporação. Após uma série de culturas a 42°C, a perda dos cassetes de resistência à canamicina foi verificada por uma análise de PCR com os mesmos oligonucleotídeos utilizados anteriormente (sdaAF / sdaAR, sdaBF / sdaBR e pykFF / pykFR). A linhagem retida foi designada MG1655 *ΔsdaA ΔsdaB ΔpykF*.

2.3 Construção da linhagem MG1655ΔsdaA ΔsdaB ΔpykF Ptrc18-gpmA Ptrc18-gpmB

Para aumentar o nível de 3-fosfoglicerato, os mutantes Ptrc18-gpmA e Ptrc18-gpmB foram construídos. Em primeiro lugar, para diminuir a expressão do gene fosfoglicerato mutase gpmA, o promotor é trocado por uma versão modificada do promotor constitutivo *trc* com atividade fraca. O Ptrc18-gpmA é transferido para a linhagem MG1655 *ΔsdaA ΔsdaB ΔpykF* por transdução.

A linhagem MG1655 Ptrc18-gpmA::Km é primeiramente construída utilizando-se o mesmo método como descrito anteriormente com os seguintes oligonucleotídeos:

Ptrc18-gpmAF (SEQ ID NO 22)

CCACTGACTTTCGCCATGACGAACCAGAACCAGCTTAGTTACAGCCATAATATACCTCC

TTATTCCACACAgTATACGAGCCGGATGATTAATcGcCAACAGCTCTGTAGGCTGGAGC TGCTTCG com

- uma região (caracteres maiúsculos) homóloga à sequência (786.771-786.819) do gene da *gpmA* (sequência de referência na página eletrônica http://genolist.pasteur.fr/Colibri/),
- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para a ampliação do cassete de resistência à canamicina (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, 2000, PNAS, 97: 6640-6645),
- uma região (caracteres maiúsculos em itálico) para a sequência promotora trc onde as caixas -35 e -10 são sublinhadas.

Ptrcl8-gpmAR (SEQ ID NO 23)

ggttatgcgtaagcattgctgttgcttcgtcgcggcaatataatgagaattattatcat taaaagatgatttgaggagtaagtatCATATGAATATCCTCCTTAG com

- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à sequência (786.903-786.819) da região a montante do gene *gpmA* (sequência de referência na página eletronica http://genolist.pasteur.fr/Colibri/),
- uma região (em caracteres maiúsculos em negrito) para a ampliação do cassete de resistência à canamicina (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Os oligonucleotídeos Ptrcl8-gpmAF e Ptrcl8-gpmAR foram

utilizados para amplificar o cassete de resistência à canamicina do plasmídeo pKD4. O produto de PCR obtido foi então introduzido por eletroporação na linhagem MG1655 (pKD46), na qual a enzima Red recombinase expressa permite a recombinação homóloga. Os transformantes resistentes à canamicina são então selecionados, a inserção do cassete de resistência sendo verificada por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos gpmAF e gpmAR definidos abaixo. A linhagem retida é designada MG1655 Ptrcl8-gpmA::Km. gpmAF (SEQ ID NO 24): CCTTCCTCTTTCAGCAGCTTACC (homóloga à sequência 786673-786695). gpmAR (SEQ ID NO 25): cgacgatcagcgcaaagtgaaagg (homóloga à sequência 787356-787333).

Para transferir a modificação Ptrcl8-gpmA::Km, transdução de Pl fago é utilizada. O protocolo seguido é implementado em duas etapas, com a preparação, primeiramente, do lisado de fago da linhagem MG1655 Ptrcl8-gpmA::Km, e posterior transdução na linhagem MG1655 ΔsdaA ΔsdaB ΔpykF. A construção da linhagem é descrita anteriormente.

1 - Preparação do lisado de fago Pl

- inoculação com 100 ml de uma cultura preparada na noite anterior de linhagem MG1655 Ptrcl8-gpmA::Km de 10 ml de LB + Km 50 mg/ml de glicose + 0,2% + $CaCl_2$ 5 mM. Incubação por

30 min a 37°C com agitação.

- adição de 100 ml de lisado de fago P1 preparado na linhagem MG1655 (cerca de $1,10^9$ fago/ml).

- agitação a 37°C por 3 horas até que todas as células fossem lisadas. Adição de 200 µl de clorofórmio e submissão a vortex.

- centrifugação por 10 min a 4500 g para eliminar restos celulares.

- transferência do sobrenadante para um tubo estéril e adição de 200 µl de clorofórmio.

- armazenamento do lisado a 4°C.

2 - Transdução

- Centrifugação por 10 min a 1500 g de 5 ml de uma cultura preparada na noite anterior da linhagem MG1655 Δ*sdaA* Δ*sdaB* Δ*pykF* em meio LB.

- suspensão do pellet de células em 2,5 ml de $MgSO_4$ 10 mM, $CaCl_2$ 5 mM - Tubos de controle: células 100 µl

- 100 µl de fagos P1 de linhagem MG1655 Ptrc18-gpmA::Km - Tubo de ensaio: 100 µl de células + 100 µl de fagos P1 de linhagem MG1655 Ptrc18-gpmA::Km.

- incubação por 30 min a 30°C sem agitação. Adição de 100 µl de citrato de sódio 1 M em cada tubo e submissão a vortex.

- adição de 1 ml de LB. - Incubação por 1 hora a 37°C com

agitação.

- aplicação em pratos LB + Km 50 µg/ml após a centrifugação dos tubos por 3 min a 7000 rpm.

- incubação a 37°C durante a noite.

3 - Verificação da linhagem

Os transformantes resistentes à canamicina são selecionados e a modificação do promotor Ptrc18-gpmA:: Km é verificada por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos gpmAF e gpmAR descritos anteriormente. A linhagem retida foi designada MG1655 Δ*sdaA* Δ*sdaB* Δ*pykF* Ptrc18-gpmA::Km. Em seguida, o Ptrc18-gpmB é transferido para a linhagem MG1655 Δ*sdaA* Δ*sdaB* Δ*pykF* Ptrc18-gpmA::Km por transdução. A MG1655 Ptrc18-gpmB::Cm é primeiramente construída utilizando-se o mesmo método, como descrito anteriormente com os seguintes oligonucleotídeos:

Ptrc18-gpmBR (SEQ ID NO 26)

CGGCGTTCC

ACTGCGTTTCACCGTGGCGGACTAGGTATACCTGTAACATAATATACCTCCTTATTCCA

CACAgTATACGAGCCGGATGATTAATcGcCAACAGCTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

com

- uma região (caracteres maiúsculos) homóloga à sequência (4631414-4631366) do gene *gpmB* (sequência de referência na página eletrônica http://genolist.pasteur.fr/Colibri/),

- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para a

ampliação do cassete de resistência a cloranfenicol (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, 2000, PNAS, 97:6640-6645),

- uma região (caracteres maiúsculos em itálico) para a sequência promotora *trc* onde as caixas -35 e -10 são sublinhadas.

Ptrcl8-gpmBF (SEQ ID NO 27)

Gcgggattggtggtcgcacagacaacttggtgcataatcagcattactcagaaaattaa cgttacagcagtatacggaaaaaaagcCATATGAATATCCTCCTTAG com

- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à sequência (4631280-4631365) da região a montante do gene *gpmB* (sequência de referência na página eletrônica http://genolist.pasteur.fr/Colibri/),

- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para a ampliação do cassete de resistência a cloranfenicol (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Os oligonucleotídeos Ptrcl8-gpmBF e Ptrcl8-gpmBR são utilizadas para amplificar o cassete de resistência a cloranfenicol do plasmídeo pKD3. O produto de PCR obtido é então introduzido por eletroporação na linhagem MG1655 (pKD46), em que a enzima Red recombinase expressa permite a recombinação homóloga. Os transformantes resistentes a cloranfenicol são selecionados e, em seguida, a inserção do

cassete de resistência é verificada por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos gpmBF e gpmBR definidos abaixo. A linhagem retida é designada MG1655 Ptrcl8-gpmB::Cm gpmBF (SEQ ID NO 28): ccttacgaccaatctcatcaataccgg (homóloga à sequência 4630906-4630932). gpmBR (SEQ ID NO 29): GCAATACCATGACTCACCAGC (homóloga à sequência 4631823-4631803).

Para transferir a modificação Ptrcl8-gpmB::Cm, transdução de Pl fago é utilizada. Lisado de fago da linhagem MG1655 Ptrcl8-gpmB::Cm é utilizado para a transdução na linhagem MG1655 *ΔsdaA ΔsdaB ΔpykF* Ptrcl8-gpmA::Km. Os transformantes resistentes a cloranfenicol são selecionados e o Ptrcl8-gpmB::Cm é verificado por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos previamente definidos gpmBF e gpmBR. A linhagem retida é designada MG1655 *ΔsdaA ΔsdaB ΔpykF* Ptrcl8-gpmA::Km Ptrcl8-gpmB:: Cm. Os cassetes de resistência à canamicina e a cloranfenicol podem ser eliminados. O plasmídeo pCP20 carregando FLP recombinase atuando nos locais FRT da canamicina e os cassetes de resistência a cloranfenicol são então introduzidos no sítio recombinante através de eletroporação. Após uma série de culturas a 42°C, a perda dos cassetes de resistência à canamicina e acloranfenicol é verificada por uma análise de PCR com os mesmos

oligonucleotídeos utilizados anteriormente (gpmAF / gpmAR e gpmBF / gpmBR). A linhagem retida é designada MG1655 Δ*sdaA* Δ*sdaB* Δ*pykF* Ptrc18-gpmA Ptrc18-gpmB.

2,4 Construção da linhagem MG1655 ΔsdaB ΔsdaA ΔpykF Ptrc18-gpmA Ptrc18-gpmB (pME101-kivD11-yqhD-TT07)

O plasmídeo *pME101-kivD11-yqhD-TT07* é então introduzido na linhagem MG1655 Δ*sdaA* Δ*sdaB* Δ*pykF* Ptrc18-gpmA Ptrc18-gpmB.

Exemplo 3

Construção de linhagems com fluxo de via 1,3-propanodiol aumentado: MG1655 Δ*metA* Δ*pykF* Δ*thrLABC*:: TT07-Ptrc-thrA*1 *(pME101-kivD11-yqhD-TT07) (PMA aaoro)*

3.1 Construção da linhagem MG1655 ΔmetA

Para eliminar o gene *metA*, a estratégia de recombinação homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000) foi utilizada. Esta estratégia permite a inserção de um cassete de resistência a cloranfenicol ou à canamicina, ao excluir a maioria dos genes em questão. Para este efeito, os seguintes oligonucleotídeos foram utilizados:

ΔmetAF (SEQ ID NO 30):

ttcgtgtgccggacgagctacccgccgtcaatttcttgcgtgaagaaaacgtctttgtg atgacaacttctcgtgcgtctTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

com

- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à sequência (4212310-4212389) da região *metA* (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres maiúsculos) para a ampliação do cassete de resistência à canamicina (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

ΔmetAR (SEQ ID NO 31):

atccagcgttggattcatgtgccgtagatcgtatggcgtgatctggtagacgtaatagt tgagccagttggtaaacagtaCATATGAATATCCTCCTTAG

com

- uma região (caracteres maiúsculos) homóloga à sequência (4213229-4213150) da região de *metA* (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres maiúsculos) para a ampliação do cassete de resistência à canamicina (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, de 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Os oligonucleotídeos ΔmetAF e ΔmetAR foram utilizados para amplificar o cassete de resistência à canamicina do plasmídeo pKD4. O produto de PCR obtido foi, então, introduzido por eletroporação na linhagem MG 1655 (pKD46). Os transformantes resistentes à canamicina foram selecionados e, em seguida, a inserção do cassete de

resistência foi confirmada por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos metAF e metAR definidos a seguir. A linhagem retida foi designada MG1655 Δ*metA*::Km. metAF (SEQ ID NO 32): tcaccttcaacatgcaggctcgacattggc (homóloga à sequência 4212203-4212232). metAR (SEQ ID NO 33): ataaaaaaggcacccgaaggtgcctgaggt (homóloga à sequência 4213301-4213272).

O cassete de resistência à canamicina foi então eliminado. O plasmídeo pCP20 carregando a FLP recombinase atuando nos sítios FRT do cassete de resistência à canamicina foi então introduzido no sítio recombinante através de eletroporação. Após uma série de culturas a 42°C, a perda do cassete de resistência à canamicina foi verificada por uma análise de PCR com os mesmos oligonucleotídeos utilizados anteriormente (metAF / metAR). A linhagem retida foi designada MG1655 Δ*metA*.

3.2 Construção da linhagem MG1655 ΔmetA ΔpykF

Para transferir a Δ*pykF*: Km, transdução de P1 fago foi utilizada. A preparação do lisado de fago da linhagem MG1655 Δ*pykF*::Km (descrito acima) foi utilizado para a transdução na linhagem MG1655 Δ*metA*.

Transformantes resistentes à canamicina são selecionados e o Δ*pykF*::Km foi verificado por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos previamente definidos pykFF

e pykFR. A linhagem retida foi designada MG1655 Δ*metA* D*pykF*::Km.

*3.3 Construção da linhagem MG1655 DmetA DpykF DthrLABC::TT07-Ptrc-thrA*1*

Para aumentar a expressão do alelo resistente ao *feedback* de desidrogenase aspartoquinase/homosserino desidrogenase, thrA*1, os seguintes plasmídeos foram construídos: pSB1 para obter o *thrA*1* e pSB2 para substituir o operon *thrLABC* pelo alelo *Ptrc-thrA*1*.

O plasmídeo pSB1 é derivado do plasmídeo pCL1920 (Lerner & Inouye, 1990, NAR 18, 15 p 4631) e abriga o alelo aspartoquinase/homosserina thrA* com resistência *feed-back* reduzida para treonina (Lee *et al*. 2003 J. Bacteriol. 185 , 18 pp 5442-5451) expressado do promotor Ptrc. Para a construção de pSB1, thrA foi amplificado por PCR do DNA genômico através dos seguintes oligonucleotídeos:

BspHIthrA (SEQ ID NO 34):

TTATCATGAgagtgttgaagttcggcggtacatcagtggc

com

- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à sequência (341-371) do gene *thrA* (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres maiúsculos) para o sítio de restrição *Bsp*HI e extra-bases,

SmaIthrA (SEQ ID NO 35):

TTACCCGGGccgccgccccgagcacatcaaacccgacgc

com

- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à sequência (2871-2841) do gene *thrA* (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres maiúsculos) para o sítio de restrição *Sma*I e extra-bases.

O fragmento amplificado por PCR foi cortado com as enzimas de restrição BspHI e SmaI e clonados nos sítios NcoI/SmaI do vetor pTRC99A (Stratagene). Para a expressão de um vetor de cópia baixa do plasmídeo pME101 foi construído como se segue. O plasmídeo pCL1920 foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleotídeos PME101F e PME101R e o fragmento BstZ17I-XmnI do vetor pTRC99A carreadores do gene *lacI* e o promotor Ptrc foi inserido no vetor amplificado. O vetor resultante e o vetor contendo os genes *thrA* foram restringidos por ApaI e SmaI e o fragmento contendo *thrA* foi clonado no vetor pME101. Para liberar ThrA da inibição de *feedback* a mutação *thr*AS345F foi introduzida por mutagênese sítio-dirigida (Stratagene) utilizando os oligonucleotídeos ThrA SF for e Thra SF rev, resultando no vetor pSB1.

PME101F (SEQ ID NO 36)

ccgacagtaagacgggtaagcctg

PME101R (SEQ ID NO 37)

agcttagtaaagccctcgctag

ThrA SF for (SEQ ID NO 38)

CGTATTTCCGTGGTGCTGATTACGCAATTCTCTTCCGAGTACTCAATCAGTTTCTGC

Thra SF rev (SEQ ID NO 39)

GCAGAAACTGATTGAGTACTCGGAAGAGAATTGCGTAATCAGCACCACGGAAATACG

Para excluir o operon *thrLABC* e substituí-lo pelo alelo *Ptrc-thrA*1*, a estratégia de recombinação homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000) foi utilizada. Esta estratégia permite a inserção de um cassete de resistência a cloranfenicol ou à canamicina, mas também de DNA adicional, ao excluir a maioria dos genes em questão. Para este efeito, o seguinte plasmídeo pSB2 foi construído.

O plasmídeo pSB2 é derivado do plasmídeo pUC18 (Norrander *et al*. Gene 26 (1983), 101-106) e abriga o cassete de resistência a cloranfenicol associado ao alelo *Ptrc-thrA*1*, ambos clonados entre a região a montante de *thr*L e a jusante de *thr*C.

Para a construção de pSB2, a região a montante de *thr*L e a região a jusante de *thr*C foram amplificadas a partir do DNA genômico através dos seguintes oligonucleotídeos:

HpaIupthrLF (SEQ ID NO 40)

CGTAGTTAACGAATTCccaactagttgcatcatacaactaataaacgtgg

com

- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à sequência (4638698-4638731) da região *thr*L (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres maiúsculos) para os sítios de restrição *Hpa*I e *Eco*RI e extra-bases.

BstZ17IupthrLR (SEQ ID NO 41)

CCCGGGGGAGGCGCCCGCGGATCCCGGTATAC**CAGAAAGGCCCACCCGAAGGTGAGCCA GGA**aggtaaccagttcagaagctgctatcag

com

- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à sequência (87-60) da região *thr*L (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para sequência T7te de terminador de transcrição (Harrington KJ, Laughlin RB e Liang S. Proc Acad nacional Sci EUA A. 24 de abril de 2001; 98 (9):5019-24),
- uma região (caracteres maiúsculos) para o sítio múltiplo de clonagem composto por *BstZ*17I, *Bam*HI, *Sfo*I e sítios de restrição *Sma*I.

BamHIdownthrCF (SEQ ID NO 42)

TCCTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGGTATACCGGGATCCGCGGGCGCCTCCCCC GGGaatctattcattatctcaatcaggccggg

com

- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à sequência (5021-5049) da região *thr*C (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para a sequência T7te de terminador de transcrição (Harrington KJ, Laughlin RB e Liang S. Proc Acad nacional Sci EUA A. 24 de abril de 2001; 98 (9):5019-24),
- uma região (caracteres maiúsculos) para o sítio múltiplo de clonagem composto por *BstZ*17I, *Bam*HI, *Sfo*I e sítios de restrição *Sma*I.

HpaIdownthrCR (SEQ ID NO 43)

CGTAGTTAACGAATTCgagaatgcccgagggaaagatctg

com

- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à sequência de (6054-6031) da região *thr*C (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres maiúsculos) para *Hpa*I e sítio de restrição *Eco*RI e extra-bases.

Primeiramente, fragmentos "acimathrL" e "abaixothrC" foram amplificados de DNA genômico de MG1655 utilizando-se, respectivamente, os oligonucleotídeos HpaIupthrLF / BstZ17IupthrLR e BamHIdownthrCF / HpaIdownthrCR. Em segundo lugar, o fragmento "acimathrL-abaixothrC" foi amplificado a partir de fragmentos PCR "acimathrL" e "abaixothrC" (que

possuem uma região de sobreposição composta por um terminador de transcrição T7Te e o sítio de clonagem múltipla composto por *BstZ*17I, *Bam*HI, *Sfo*I e sítios de restrição *Sma*I) utilizando os oligonucleotídeos HpaIupthrLF / HpaIdownthrCR. O fragmento PCR "acimathrL-abaixothrC" foi cortado com a enzima de restrição *Hpa*I e clonado nos sítios *Eco*RI / *Sfo*I do vetor pUC18, dando o plasmídeo pUC18-DthrLABC::TT07-SMC.

Em seguida, o cassete de resistência a cloranfenicol foi amplificado por PCR a partir do vetor pKD3 utilizando-se os seguintes oligonucleotídeos:

BstZ17ICmF (SEQ ID NO 44)

GGGGTATACtgtaggctggagctgcttcg

com

- uma região (em caracteres minúsculos) para a ampliação do cassete de resistência a cloranfenicol (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

- uma região (caracteres maiúsculos) para o sítio de restrição *BstZ*17I e extra-bases.

BamHICmR (SEQ ID NO 45)

CGCGGATCCcatatgaatatcctccttag

com

- uma região (em caracteres minúsculos) para a ampliação do

cassete de resistência a cloranfenicol (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

- uma região (caracteres maiúsculos) para o sítio de restrição *Bam*HI e extra-bases.

O fragmento de PCR foi cortado com as enzimas de restrição *BstZ*17I e *Bam*HI e clonado nos sítios *BstZ*17I / *Bam*HI do plasmídeo pUC18-ΔthrLABC::TT07-SMC, dando o plasmídeo pUC18-ΔthrLABC::TT07-SMC::Cm.

Por fim, o alelo *Ptrc-thrA*1* foi cortado a partir do plasmídeo pSB1 com as enzimas de restrição *Sfo*I e *Sma*I e clonados nos sítios *Sfo*I / *Sma*I do plasmídeo pUC18-ΔthrLABC::TT07-SMC::Cm, dando o plasmídeo pUC18-ΔthrLABC::TT07-*Ptrc-thrA*1*::Cm ou pSB2.

O fragmento *ΔthrLABC*::TT07-Ptrc-thrA*1::Cm foi obtido cortando-se o plasmídeo pSB2 com a enzima de restrição *Eco*RI e foi introduzido por eletroporação na linhagem MG1655 (pKD46), na qual a expressão da enzima Red recombinase permite a recombinação homóloga. Os transformantes resistentes a cloranfenicol são selecionados e a inserção do cassete de resistência é verificada por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos thrA*1F e thrA*1R definidos abaixo. A linhagem retida é designada MG1655 ΔthrLABC::TT07-Ptrc-thrA*1::Cm. thrA*1F (SEQ ID NO 46):

cgtgttgcgtgttaccaactcg (homóloga à sequência (4638276-4638297) da região *thr*L (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/)). thrA*1R (SEQ ID NO 47) cggaaactgacgcctccgcag (homóloga à sequência (6345-6325) da região *thr*C (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/)).

Plasmídeos recombinantes foram verificados por sequenciamento de DNA.

Para transferir a *ΔthrLABC*::TT07-Ptrc-thrA*1::Cm, transdução de Pl fago é utilizada. A preparação do lisado de fago da linhagem MG1655 *ΔthrLABC*::TT07-Ptrc-thrA*1::Cm é utilizada para a transdução na linhagem MG1655 ΔmetA DpykF::Km.

Os transformantes resistentes a canamicina e cloranfenicol são selecionados e o *ΔthrLABC*::TT07-Ptrc-thrA*1::Cm é verificado por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos previamente definidos thrA*1F e thrA*1R. A linhagem retida é designada MG1655 *ΔmetA ΔpykF*::KmΔ*thrLABC*::TT07-Ptrc-thrA*1::Cm.

Os cassetes de resistência à canamicina e a cloranfenicol podem ser eliminado. O plasmídeo pCP20 carregando FLP recombinase atuando nos sítios FRT da canamicina e os cassetes de resistência a cloranfenicol são então introduzida no sites recombinante através de

eletroporação. Após uma série de culturas a 42°C, a perda dos cassetes de resistência a canamicina e cloranfenicol é verificada por uma análise de PCR com os mesmos oligonucleotídeos utilizados anteriormente (metAF / METAR, pykF / pykFR e thrA*1F / thrA*1R). A linhagem retida é designada MG1655 Δ*met*A Δ*pyk*F Δ*thrLABC*::TT07-Ptrc-thrA*1.

3,4 Construção do plasmídeo pMA-aaoro

Um gene sintético do gene *aao* de *Rhodococcus opacus* codificando para aminoácido oxidase foi elaborado por Geneart (Alemanha). O uso de códons e conteúdo GC dos genes foi adaptado para *Escherichia coli* de acordo com o fornecedor das matrizes. A expressão do gene sintético foi conduzida por um promotor P*trc* constitutivo. A construção foi clonada em vetor pMA do fornecedor e verificada por sequenciamento.

Ptrc01 aaoro:

sítios de restrição (*KpnI*, *EcoRI*, *SmaI*) (SEQ ID NO 48):

ggtaccgaattccccggg

promotor Ptrc01 e RBS (SEQ ID NO 49):

gagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaaggatcccccgggtaag gaggttataa

sequência do gene *aaoro* otimizado para *E. coli* (AY053450.) (SEQ ID NO 50):

atggcatttacccgtcgcagctttatgaaaggtctgggtgcaaccggtggtgcaggtct
ggcatatggtgcaatgagcaccctgggtctggcaccgtctacagcagcaccggcacgta
cctttcagccgctggcagccggtgatctgattggtaaagtgaaaggtagccatagcgtt
gttgttctgggtggtggtccggcaggtctgtgtagcgcatttgaactgcagaaagccgg
ttataaagttaccgttctggaagcacgtacccgtccgggtggtcgtgtttggaccgcac
gtggtggtagcgaagaaaccgatctgagcggtgaaacccagaaatgtacctttagcgaa
ggccatttttataatgttggtgccacccgtattccgcagagccatattaccctggatta
ttgtcgcgaactgggtgttgaaattcagggtttcggcaatcaaaatgccaatacctttg
tgaattatcagagcgataccagcctgagcggtcagagcgttacctatcgtgcagcaaaa
gcagataccttggctatatgagcgaactgctgaaaaaagcaaccgatcagggtgcact
ggatcaggttctgagccgtgaagataaagatgcactgagcgaatttctgagcgattttg
gtgatctgtctgatgatggtcgttatctgggtagcagccgtcgtggttatgatagcgaa
ccgggtgccggtctgaattttggcaccgaaaaaaaaccgtttgccatgcaggaagttat
tcgtagcggtattggtcgcaattttagctttgattttggctatgatcaggccatgatga
tgtttacaccggttggtggtatggatcgtatttattatgcctttcaggatcgtattggc
actgataacatcgtgttcggtgccgaagttaccagcatgaaaaatgttagcgaaggtgt
gaccgttgaatataccgcaggcggtagcaaaaaaagcattaccgcagattatgccattt
gtaccattcctccgcatctggttggtcgtctgcagaataatctgcctggtgatgttctg
accgcactgaaagcagcaaaaccgagcagcagcggtaaactgggtattgaatatagccg
tcgttggtgggaaaccgaagatcgcatttatggtggtgcaagcaataccgataaagata
ttagccagattatgtttccgtatgatcattataatagcgatcgtggtgttgttgttgca
tattatagctctggtaaacgccaggaagcatttgaaagcctgacccatcgtcagcgtct
ggcaaaagcaattgcagaaggcagcgaaattcacggcgaaaaatatacccgtgatatta
gcagcagctttagcggtagctggcgtcgtaccaaatatagcgaaagcgcatgggcaaat

tgggcaggtagcggtggttctcatggtggtgcagccactccggaatatgaaaaactgct
ggaaccggtggataaaatttattttgccggtgatcatctgagcaatgcaatcgcatggc
agcatggtgcactgaccagcgcacgtgatgttgttacccatattcatgaacgtgttgca
caggaagcctaa

sítios de restrição (*BglII, EcoRV, PacI, SacI, XbaI, HindIII*) (SEQ ID NO 51):

gatctgatatcttaattaagagctctctagaaagctt

*3,5 Construção da linhagem MG1655 ΔmetA ΔpykF ΔthrLABC::TT07-Ptrc-thrA*1 (pME101-kivDll-yqhD-TT07) (pMA-aaoro)*

O *pME101-kivDll-yqhD-TT07* e os plasmídeos pMA-*aaoro* são, então, introduzidos na linhagem MG1655 Δ*metA* Δ*pykF* Δ*thrLABC*::TT07-Ptrc-thrA*1.

Exemplo 4

Construção de linhagems com fluxo de via 1,4-butanodiol aumentado: MG1655 Δ*sucCD* Δ*aceBAK* Δ*arcA* Δ*gdhA* (pUC19-Ptrc01/OP01/RBS01-adhE2ca-prpE-TT02) (pME101-kivDll-yqhD-TT07)

4.1 Construção da linhagem MG1655 ΔaceBAK ΔsucCD

Para apagar os genes *aceBAK*, a estratégia de recombinação homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000) foi utilizada. Esta estratégia permite a inserção de cassete de resistência a cloranfenicol ou à canamicina, ao excluir a maioria dos genes em questão. Para este efeito,

os seguintes oligonucleotídeos foram utilizados:

ΔaceBAKF (SEQ ID NO 52):

ctggctttcacaaggccgtatggcgagcaggagaagcaaattcttactgccgaagcggt agaatttctgactgagctggtTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

com

- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à sequência (4213531-4213610) da região *aceB* (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para a ampliação do cassete de resistência à canamicina (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, de 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

ΔaceBAKR (SEQ ID NO 53):

aacatcttccacatgcccttcacgtatgcggttttgtagtgcgcgccagtaatcagcgc ggaacaggtcggcgtgcatcCATATGAATATCCTCCTTAG

com

- uma região (caracteres maiúsculos) homóloga à sequência (4218298-4218220) da região *aceK* (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/,
- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para a ampliação do cassete de resistência à canamicina (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, de 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Os oligonucleotídeos ΔaceBAKF e ΔaceBAKR são

utilizados para amplificar o cassete de resistência à canamicina do plasmídeo pKD4. O produto de PCR obtido é então introduzido por eletroporação na linhagem MG 1655 (pKD46). Os transformantes resistentes à canamicina são selecionados e a inserção do cassete de resistência é verificada por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos aceBAKF e aceBAKR definidos abaixo. A linhagem retida é designada MG1655 Δ*metA*::Km. aceBAKF (SEQ ID NO 54): cgttaagcgattcagcaccttacc (homóloga à sequência 4213251 a 4213274). aceBAKR (SEQ ID NO 55): aacgcattacccactctgtttaatacg (homóloga à sequência 4218728 a 4218702).

Para excluir os genes *sucCD* a estratégia de recombinação homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000) foi utilizada. Esta estratégia permite a inserção de um cassete de resistência a cloranfenicol ou à canamicina, ao excluir a maioria dos genes em questão. Para este efeito, os seguintes oligonucleotídeos foram utilizados:

ΔsucCDF (SEQ ID NO 56):

tttttgcccgctatggcttaccagcaccggtgggttatgcctgtactactccgcgcgaa gcagaagaagccgcttcaaaaCATATGAATATCCTCCTTAG

com

- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à sequência (762.268-762.347) da região *sucC* (sequência de

referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),

- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para a ampliação do cassete de resistência a cloranfenicol (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, de 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

ΔsucCDR (SEQ ID NO 57):

atatccgccaggctgcgaacggttttcacgcctgcggcttccagagcagcgaatttctc atccgcagtcccttaccggcTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

com

- uma região (caracteres maiúsculos) homóloga à sequência (764.241-764.168) da região *sucD* (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),

- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para a ampliação do cassete de resistência a cloranfenicol (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, de 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Os oligonucleotídeos DsucCDF e DsucCDR são utilizados para amplificar o cassete de resistência a cloranfenicol do plasmídeo pKD3. O produto de PCR obtido é então introduzido por eletroporação na linhagem MG 1655 (pKD46). Os transformantes resistentes a cloranfenicol são selecionados e, em seguida, a inserção do cassete de resistência é verificada por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos sucCDF e sucCDR definidos abaixo. A linhagem retida é

designada MG1655 Δ*sucCD*::Cm. sucCDF (SEQ ID NO 58): tcgcgaatccgtgggcttcctggtaacg (homóloga à sequência 761887-761914). sucCDR (SEQ ID NO 59: cctctgatgccaaccgaagagatgagccg (homóloga à sequência 764555-764527).

Para transferir a Δ*aceBAK*::Km, o método de transdução de P1 fago é utilizado. A preparação do lisado de fago da linhagem MG1655 DaceBAK::Km é usado para a transdução na linhagem MG1655 Δ*suc*CD::Cm.

Os transformantes resistentes a canamicina e cloranfenicol são selecionados e os ΔaceBAK::Km são verificados por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos previamente definidos e aceBAKF aceBAKR. A linhagem retida é designada MG1655 Δ*sucCD*::Cm Δ*aceBAK*::Km.

Os cassetes de resistência à canamicina e a cloranfenicol podem ser eliminados. O plasmídeo pCP20 carregando a FLP recombinase atuando nos sítios FRT dos cassetes de resistência a canamicina e cloranfenicol são então introduzidos no sítio recombinante através de eletroporação. Após uma série de culturas a 42°C, a perda dos cassetes de resistência a canamicina e cloranfenicol é verificada por uma análise de PCR com os mesmos oligonucleotídeos utilizados anteriormente (aceBAKF / aceBAKR e sucCDF / sucCDR). A linhagem retida é designada

MG1655 Δ*sucCD* Δ*aceBAK*.

4.2 Construção da linhagem MG1655 ΔsucCD ΔaceBAK ΔarcA ΔgdhA

Para eliminar o gene *arcA*, a estratégia de recombinação homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000) foi utilizada. Esta estratégia permite a inserção de um cassete de resistência a cloranfenicol ou à canamicina, ao excluir a maioria dos genes em questão. Para este efeito, os seguintes oligonucleotídeos foram utilizados:

ΔarcAF (SEQ ID NO 60):

cccgcacattcttatcgttgaagacgagttggtaacacgcaacacgttgaaaagtattt tcgaagcggaaggctatgTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

com

- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à sequência (4638322-4638245) da região *arcA* (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para a ampliação do cassete de resistência à canamicina (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, de 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

ΔarcAR (SEQ ID NO 61):

ccagatcaccgcagaagcgataaccttcaccgtgaatggtggcgatgatttccggcgta tccggcgtagattcgaaatgCATATGAATATCCTCCTTAG

com

- uma região (caracteres maiúsculos) homóloga à sequência (4637621-4637699) da região *arcA* (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para a ampliação do cassete de resistência à canamicina (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, de 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Os oligonucleotídeos DarcAF e DarcAR e são utilizados para amplificar o cassete de resistência à canamicina do plasmídeo pKD4. O produto de PCR obtido é então introduzido por eletroporação na linhagem MG 1655 (pKD46). Os transformantes resistentes à canamicina são selecionados e a inserção do cassete de resistência é verificada por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos arcAF e arcar definidos abaixo. A linhagem retida é designada MG1655 Δ*arcA*::Km. arcAF (SEQ ID NO 62): cgacaattggattcaccacg (homóloga à sequência 4638746-4638727). arcAR (SEQ ID NO 63): gcggtattgaaaggttggtgc (homóloga à sequência 4637308-4637328).

Para transferir o ΔarcA::Km, transdução de P1 fago é utilizada. O lisado de fago da linhagem MG1655 DarcA::Km é usado para a transdução na linhagem MG1655 Δ*sucCD* Δ*aceBAK*.

Os transformantes resistentes à canamicina são selecionados e o Δ*arcA*::Km é verificado por uma análise de

PCR com os oligonucleotídeos previamente definidos arcAF e arcAR. A linhagem retida é designada MG1655 Δ*sucCD* Δ*aceBAK* Δ*arcA*::Km.

Para eliminar o gene *gdhA*, a estratégia de recombinação homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000) foi utilizada. Os oligonucleotídeos ΔgdhAF e ΔgdhAR são utilizados para amplificar o cassete de resistência a cloranfenicol do plasmídeo pKD3.

ΔgdhAF (SEQ ID NO 64):

taaacaacataagcacaatcgtattaatatataagggttttatatctatgTGTAGGCTG GAGCTGCTTCG com

- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à sequência (1840348-1840397) a montante do gene *gdhA* (http://ecogene.org/blast.php),
- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para a ampliação do cassete de resistência a cloranfenicol (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, de 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

ΔgdhAR (SEQ ID NO 65):

taagcgtagcgccatcaggcatttacaacttaaatcacaccctgcgccagCATATGAAT ATCCTCCTTAG com:

- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à sequência (1841767-1841718) para o final e na região a jusante do gene *gdhA* (http://ecogene.org/blast.php),

- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para a ampliação do cassete de resistência a cloranfenicol (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, de 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

O produto de PCR obtido é então introduzido por eletroporação na linhagem MG1655 (pKD46). Os transformantes resistentes a cloranfenicol são selecionados e, em seguida, a inserção do cassete de resistência é verificada por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos Ptrc-gdhAverF e gdhA R.

Ptrc-gdhAverF (SEQ ID NO 66):

CCTTAACGTTATTGTCTCTGC

- uma região homóloga à sequência (1840168-1840188) da região a montante do gene *gdhA* (http://ecogene.org/blast.php).

gdhA R (SEQ ID NO 67):

GGAGGAAGCCCCAGAGCAGG

- uma região homóloga à sequência (1842274-1842293) da região a jusante do gene *gdhA* (http://ecogene.org/blast.php).

A linhagem obtida foi nomead MG1655 Δ*gdhA*::Cm.

Para transferir a Δ*gdhA*::Cm, transdução de P1 fago é utilizada. O lisado de fago da linhagem MG1655 Δ*gdhA*::Cm é usado para a transdução na linhagem MG1655 Δ*sucCD* ΔaceBAK

Δ*arcA*::Km.

Os transformantes resistentes a canamicina e cloranfenicol são selecionados e a Δ*gdhA*::Cm é verificada por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos previamente definidos Ptrc-gdhAverF e gdhA R. A linhagem retida é designada MG1655 Δ*sucCD* Δ*aceBAK* Δ*arcA*::Km Δ*gdhA*::Cm.

Os cassetes de resistência canamicina e a cloranfenicol podem ser eliminados. O plasmídeo pCP20 carregando a FLP recombinase atuando nos sítios FRT da canamicina e os cassetes de resistência a cloranfenicol são então introduzidos no sítio recombinante através de eletroporação. Após uma série de culturas a 42°C, a perda dos cassetes de resistência à canamicina e a cloranfenicol sendo verificada por uma análise de PCR com os mesmos oligonucleotídeos utilizados anteriormente (aceBAKF / aceBAKR, sucCDF / sucCDR, arcAF / arcAR e gdhAverF / gdhA R). A linhagem retida é designada MG1655 Δ*sucCD* Δ*aceBAK* Δ*arcA* Δ*gdhA*.

4,3 Construção de um plasmídeo para superexpressão da acetaldeído-CoA/álcool desidrogenase bifuncional adhE2 de Clostridium acetobutylicum e propionil-CoA sintetase de gene prpE de Escherichia coli: pUC19-Ptrc01/OP01/RBS01-adhE2ca-prpE-TT02

O gene *adhE2* de Clostridium acetobutylicum codificando

para a acetaldeído-CoA/álcool desidrogenase bifuncional foi clonado no plasmídeo pUC19. O gene que codifica para a prpE propionil-CoA sintetase foi clonado a montante de *adhE2*.

O gene *adhE2* foi amplificado por PCR a partir do megaplasmídeo pSol1 da linhagem de ATCC824 de *Clostridium acetobutylicum* (posição 33722-36298), com os oligonucleotídeos adhE2Ca F e adhE2Ca R.

adhE2Ca F(SEQ ID NO 68):

ggtaccggatccgggcccgagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtgg *aattgtgagcggataacaattTACGTA*taaggaggtatatt**ATGAAAGTTACAAATCAA AAAGAAC**

com

- uma região (em caracteres minúsculos em negrito) para a adição do sítio de restrição *Kpn*I, *Bam*HI, *Apa*I
- uma região (caracteres sublinhados minúsculos) para a adição do promotor Ptrc01
- uma região (em caracteres minúsculos em itálico) para a adição de uma sequência operadora OP01
- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) para a adição de sítio de restrição *Sna*BI
- uma região (em caracteres minúsculos) para a sequência de adição RBS01
- uma região (caracteres sublinhados maiúsculos) homólogos da região *adhE2* 33722-33752 de *C.acetobutylicum*

adhE2Ca R (SEQ ID NO 69):

GAGCTCAAGCTT**aacagataaaacgaaaggcccagtctttcgactgagcctttcgttttatttgatg***cctagggctagctctagattaa*TTAAATGATTTTATATAGATATCCTTAAGTTCAC, com

- uma região (caracteres maiúsculos) para a adição do sítio de restrição *Hind*III, *Sac*I.
- uma região (caracteres sublinhados em negrito minúsculos) para a adição do terminador TT02
- uma região (caracteres em itálico) para a adição do sítio de restrição *Pac*I, *Xba*I, *Nhe*I, *Avr*II
- uma região (caracteres sublinhados maiúsculos) homólogos da região *adhE2* 36264-36298 de *C.acetobutylicum*.

Este fragmento de PCR foi digerido com *Bam*HI e *Hind*III e clonado no vetor pUC19 digerido com as mesmas enzimas de restrição. O plasmídeo obtido foi nomeado pUC19-Ptrc01/OP01/RBS01-*adhE2ca*-TT02

Para amplificar o gene *prpE*, PCR é realizado através de DNA cromossômico de *E. coli* como modelo e os *primers* *prpE* F e *prpE* R.

prep F(SEQ ID NO 70):

tctagaggatccaagttcaacaggagagcattatg, com

- uma região (caracteres em negrito sublinhados) para a adição de sítios de restrição *Xba*I e *Bam*HI
- uma região homóloga (em caracteres minúsculos) à região

351910-351932 (http://ecogene.org/blast.php).

prep R (SEQ ID NO 71):

ggatccgctagccctaggtacgtactactcttccatcgcctggc, com

- uma região (caracteres em negrito sublinhados) para a adição de sítios de restrição *Bam*HI, *Nhe*I, *Avr*II, *Sna*BII
- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à região 353816-353797 (http://ecogene.org/blast.php).

Este fragmento de PCR foi digerido com *Xba*I e *Nhe*I e clonados no vetor pUC19-Ptrc01/OP01/RBS01-*adhE2ca*-TT02 digerido com as mesmas enzimas de restrição. O plasmídeo obtido foi nomeado pUC19-Ptrc01/OP01/RBS01-*adhE2ca-prpE*-TT02.

4,4 Construção da linhagem ΔsucCD MG1655 ΔaceBAK ΔarcA ΔgdhA (pUC19-Ptrc01/OP01/RBS01-adhE2ca-prpE-TT02) (pME101-kivD11-yqhD-TT07)

Os plasmídeos pUC19-Ptrc01/OP01/RBS01-*adhE2ca-prpE*-TT02 e *pME101-kivD11-yqhD-TT07* são então introduzidos no linhagem MG1655 Δ*sucCD* Δ*aceBAK* Δ*arcA* Δ*gdh*A.

Exemplo 5

Fermentação de linhagems produtoras de etileno glicol em frascos de Erlenmeyer

O desempenho das linhagens foi avaliado em culturas mantidas em frascos Erlenmeyer de 500 ml com meio modificado M9 (Anderson, 1946, Proc. Natl. Acad. Sci.

32:120-128 EUA), que foi suplementado com 10 g MOPS/l e 10 g/l de glicose e pH ajustado para 6,8. Espectinomicina foi adicionada, se necessário, em uma concentração de 50 mg/L e/ou antibiótico cloranfenicol foi adicionado, se necessário, a uma concentração de 30mg/l. Uma precultura de 24h foi utilizada para inocular uma cultura de 50 ml a um OD600 nm de cerca de 0,3. As culturas foram mantidas em um agitador a 37°C e 200 rpm até a glicose no meio de cultura ser esgotada. No final da cultura, glicose e os principais produtos foram analisados por HPLC usando uma coluna *Biorad HPX 97H* para a separação e um refratômetro para a detecção. A produção de etileno glicol foi confirmada por cromatografia gasosa / espectrometria de massas (GC / MS) com um cromatógrafo a gás *Hewlett Packard 6890 Series* acoplado a um detector de massas *série 5973 Hewlett Packard* seletivo (EI) e uma coluna *HP-Innowax* (25 m de comprimento, 0,20 mm de diâmetro, 0,20 mícrons de espessura de filme). O tempo de retenção e espectro de massas de Etileno Glicol gerados foram comparados com a de Etileno Glicol autêntico.

A comparação dos desempenhos entre a linhagem de produção e uma linhagem de referência é dada na tabela abaixo. (Ver abaixo para a construção da linhagem produtora)

Ref_Cultura	Linhagem_genótipo	[etilenoglicol] (mM)
FbDI_0180	MG1655 DpykF	nd
FbDI_0184	MG1655 DpykF (pME101-kivDll-yqhD-yeaB-TT07) (pCC1BAC-serA)	0,63

nd: não detectado

Exemplo 6

Construção de linhagem com o aumento do fluxo da via de etileno glicol: MG1655 Δ*pyk*F (pME101-*kiv*Dll-*yqh*D-*yea*B-TT07) (pCC1BAC-*ser*A)

6,1 Construção de um plasmídeo para a superexpressão da ácido ceto-hidroxi descarboxilase kivD de Lactococcus lactis, da aldeído hidroxi redutase yqhD e os genes yeaB fosfohidróxi piruvato fosfatase de Escherichia coli: plasmídeo pME101-kivDll-yqhD-yeaB-TT07

O fragmento contendo *yea*B foi restringido por *Xba*I e *Bgl*II e clonado no vetor pME101-*kiv*Dll-*yqh*D limitado pela mesmas enzimas de restrição, o plasmídeo resultante sendo denominado pME101-*kiv*Dll-*yqh*D-*yea*B-TT07.

O gene *yea*B foi amplificado por PCR do DNA genômico da linhagem MG1655 de *E. coli* com os oligonucleotídeos yeaB F e yeaB R:

yeaB F (SEQ ID NO 72)

AGCT***GTATAC****TA****GAATTC****AT****AGATCT***taaggaggtatattATGGAATACCGTAGCCTGA CGC com

- uma região (caracteres em negrito e itálico maiúsculos) para a adição de sítios de restrição *Bst*Z17I, *Eco*RI e *Bam*HI
- uma região (caracteres sublinhados minúsculos) para adição de um *Ribosome Binding Site*
- uma região (caracteres maiúsculos) homóloga à região *yea*B de *E. coli* MG1655 de 1894195-1894215 (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),

yeaB R (SEQ ID NO 73)

GC*TTATAAGCCAGCTGGCTCTAGA*TAGCAGAAAGGCCCACCCGAAGGTGAGCCAGGA*GT ATACATGAAGCATTTCCGTTAATTAACGGAGCTCATCCTAGG***TCAGGGTTTCACACCAA TTTGCAGCGCC***

- uma região (caracteres maiúsculos em negrito) homóloga à região *yea*B de *E. coli* MG1655 de 1894772-1894745 (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres sublinhados maiúsculos) homóloga à sequência de terminação T7Te(ref Harrington KJ, Laughlin RB e Liang S. Proc Acad National Sci EUA A. 24 abr de2001, 98 (9) :5019-24.)
- uma região (caracteres maiúsculos em itálico), para adição de sítios de restrição *Psi*II, *Pvu*II, *Xba*I, *Bst*Z17I, *Xmn*I, *Pac*I, *Sac*I e *Avr*II

O fragmento amplificado por PCR foi cortado com as enzimas de restrição *Xba*I e *Bgl*II e clonado nos sítios *Xba*I - *Bgl*II do vetor pME101-*kiv*Dll-*yqh*D-TT07 dando vetor pME101-*kiv*Dll-*yqh*D-*yea*B-TT07.

6,2 Construção de um plasmídeo para superexpressão Fosfoglicerato desidrogenase de serA de plasmídeo de Escherichia coli: pCC1BAC-serA

Para aumentar a expressão do gene *serA*, o gene foi expresso a partir do vetor de controle de cópia pCC1BAC (epicentro), utilizando o seu próprio promotor.

Para este efeito, o gene *serA* foi amplificado a partir do genoma de *E. coli* utilizando os oligonucleotídeos serA F e serA R. O produto de PCR foi restringido utilizando-se as enzimas *Xba*I e *Sma*I e clonado no vetor pUC18 (Stratagene) limitado pela mesmas enzimas de restrição. O vetor resultante foi denominado pUC18-*ser*A.

serA F (SEQ ID NO 74):

ctag**TCTAGA**TTAGTACAGCAGACGGGCGCG

com

- uma região (caracteres maiúsculos) homóloga à sequência (3055199-3055220) do gene *serA* (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres em negrito) que abriga o sítio *Xba*I

serA R (SEQ ID NO 75):

tcc**CCCGGGAAGCTT**CCGTCAGGGCGTGGTGACCG

com

- uma região (caracteres maiúsculos) homóloga à sequência (3056880-3056861) da região de gene *serA* (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres em negrito) abrigando os sítios *Sma*I e *Hind*III.

Para transferir o gene *ser*A para a cópia de controle de vetor pCC1BAC, o vetor pUC18-*ser*A foi limitado com a enzima *HindIII* e clonado em sítio *HindIII* clonagem pronto pCC1BAC (epicentro).

O resultado de construto foi verificado e chamado de pCC1BAC-*serA*.

6,3 Construção de linhagem ΔpykF MG1655 (pME101-kivDll-yqhD-yeaB-TT07) (pCC1BAC-serA)

A linhagem de construção MG1655 ΔpykF foi previamente detalhada (parte 2.2).

Os plasmídeos pCC1BAC-*ser*A e pME101-*kiv*Dll-*yqh*D-*yea*B-TT07 foram introduzidos na linhagem MG1655 Δ*pyk*F.

Exemplo 7

Demonstração da atividade de hidróxi-cetoácido descarboxilase codificada pelo gene *kiv*D de *Lactococcus lactis*

7,1 Construção de linhagem para a caracterização KivD: BL21 (pPAL7 kivDll)

Para caracterizar a proteína KivD, o gene correspondente foi expresso a partir do vetor de expressão pPAL7 (Bio-Rad).

Para este efeito, o gene *kiv*D foi amplificado a partir do genoma de *Lactococcus lactis* utilizando os oligonucleotídeos pPAL7-kivDll F e pPAL7-kivDll R. O produto de PCR foi restringido com o uso de enzimas *Hind*III e *Eco*RI e clonados no vetor pPAL7 limitado pelas mesmas enzimas de restrição. O vetor resultante foi denominado pPAL7-kivDll.

pPAL7-kivDll F(SEQ ID NO 76):

cccAAGCTTtg**ACTTCT***ATGTATACCGTGGGTGATTATC*

com

- uma região (caracteres em itálico) homóloga à sequência do gene sintético do gene *kivD* de *Lactococcus lactis*,
- uma região (caracteres em negrito), contendo os nucleotídeos necessários para gerar a proteína livre de tag, contendo uma pequena extensão de aminoácidos N-terminal para favorecer a purificação
- uma região (caracteres sublinhados) abrigando o sítio de restrição *Hind*III

pPAL7-kivDll R (SEQ ID NO 77):

gGAATTC*TTAGCTTTTATTCTGTTCGGCGAACAG*

com

- uma região (caracteres em itálico) homóloga à sequência do gene sintético do gene *kivD* de *Lactococcus lactis*,
- uma região (caracteres sublinhados) abrigando o sítio de restrição *Eco*RI.

O plasmídeo pPAL7-*kiv*Dll foi, então, introduzido na linhagem BL21 (DE3) competente (Invitrogen).

7,2 superprodução da proteína KivD

A superprodução da proteína KivD foi feita em um balão Erlenmeyer de 2 l, utilizando caldo LB (Bertani, 1951, J. Bacteriol. 62:293-300), que foi suplementado com 2,5 g/l de glicose e 100 mg/l de ampicilina. Uma precultura da noite anterior foi usada para inocular uma cultura de 500 ml para um OD600 nm de cerca de 0,15. Esta precultura foi realizada em um Erlenmeyer de 500 ml preenchido com 50 ml de caldo LB que foi suplementado com 2,5 g/l de glicose e 100 mg/litro de ampicilina. A cultura foi mantida em um agitador a 37°C e 200 rpm até OD600 nm ser de cerca de 0,5 e, em seguida, a cultura foi movida em um segundo agitador a 25°C e 200rpm até OD600 nm ser de 0,6 - 0,8 (cerca de uma hora), antes da indução com IPTG 500µM. A cultura foi mantida a 25°C e 200 rpm até OD600 nm ser de cerca de 4 e depois foi parada. As células foram centrifugadas a 7000 rpm, por 5 minutos a 4°C

e, em seguida, armazenadas a -20°C.

7,3 purificação da proteína KivD

7.3.1 Etapa 1: Preparação dos extratos livres de célula

Cerca de 188 mg de biomassa de *E. coli* foi suspensa em 30 ml de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,6, e num coquetel de inibidores de protease. A suspensão de células (15 ml por tubo cônico) foi sonicada em gelo (sonoplus Bandelin, 70 W) em um tubo de 50 ml, durante 8 ciclos de 30 segundos com intervalos de 30 seg. Após a secagem, as células foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente com 5 mM $MgCl_2$ e 1UI/mL de DNaseI. Detritos de células foram removido por centrifugação a 12000g por 30 min a 4°C.

7.3.2 Etapa 2: Purificação por afinidade

A proteína foi purificada a partir de extrato bruto de células por afinidade em coluna *Profinity* (BioRad, Bio-Escala Mini cartucho Profinity de exatos 5 ml) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O extrato bruto foi carregado em um cartucho Profinity exato de 5 ml equilibrado com fosfato de potássio 100 mM, pH 7,6. A coluna foi lavada com 10 volumes de coluna do mesmo tampão e incubada durante a noite com fosfato de potássio 100 mM, pH 7,6, 100 mM de fluoreto a 4°C. A proteína foi eluída da coluna com 2 volumes de coluna de fosfato de potássio 100

mM, pH 7,6. O marcador ficou fortemente ligado à resina e a proteína purificada foi liberada. As frações contendo as proteínas foram misturadas e dialisadas contra o fosfato de potássio 100 mM, 150 mM NaCl e glicerol 10% pH 8.

A concentração de proteínas foi medida usando o ensaio da proteína de Bradford.

7,4 Ensaio de hidróxi ceto-ácido descarboxilase

7.4.1 Síntese química do ácido 5-hidróxi-2-cetopentanóico

A síntese química do ácido 5-hidróxi-2-cetopentanóico foi descrita na publicação: Friedhelm Korte, Karl Heinz Büchel, a-Hydroxyalkyliden-lacton-Umlagerung, X. a-Hydroxyalkyliden-lacton-Umlagerung em wäßriger Salzsäure Chemische Berichte, Volume 92 No.4, páginas 877-883 (1959).

7.4.2 A síntese química do ácido 4-hidróxi-2-cetobutírico

A síntese química do ácido 4-hidróxi-2-cetobutírico foi descrita na publicação: RS Lane; EE Dekker; (1969) 2-keto-4-hydroxybutyrate. Synthesis, chemical properties, and as a substrate for lactate dehydrogenase of rabbit muscle Biochemistry., 8 (7), 2958-2966.

7.4.3 Ensaio de hidóxi ceto-ácido descarboxilase

A descarboxilação do hidóxi ceto-ácido foi medida a 30°C utilizando-se um ensaio enzimático acoplado. O ensaio

da atividade hidóxi ceto-ácido descarboxilase foi realizada com tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6, 0,2 mM NADH 1 mM $MgSO_4$, difosfato de tiamina 0,5 mM, 72 unidades/ml de álcool desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae*, 10 mM hidróxi ceto-ácido neutralizados (ácido hidroxipirúvico ou ácido 4-hidróxi-2-cetobutírico ou ácido 5-hidróxi-2-cetopentanóico) e cerca de 40 mg de proteína purificada em um volume total de 1 ml. O consumo de NADH foi monitorado a 340 nm em espectrofotômetro. A atividade detectada no ensaio de controlo, sem o substrato, foi subtraída da atividade detectada no ensaio com substrato. Uma unidade de atividade hidroxi ceto-ácido descarboxilase é a quantidade de enzima necessária para catalisar a descarboxilação de 1 mol de hidroxil-ceto-ácido por minuto a 30°C. (Nm Epsilon 340 = 6290 M-1 cm-1).

7,5 atividade da enzima purificada

	Atividade da enzima purificada (mUI / mg)
Ensaio hidroxipiruvato descarboxilase	79
Ensaio 4-hidróxi-2-cetobutirato descarboxilase	70

Ensaio 5-hidróxi-2-cetopentanoato descarboxilase	63

Exemplo 8

Demonstração da atividade hidróxi aldeído redutase codificada pelo gene *yqhD* de *Escherichia coli*

8,1 construção de uma linhagem para YqhD caracterização: MG1655 ΔpykF::Km (pTRC99A-yqhD)

8.1.1 Construção da linhagem MG1655 ΔyqhD::Km

Para eliminar o gene *yqhD*, a estratégia de recombinação homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000) foi utilizada. Esta estratégia permite a inserção de um cassete de resistência a cloranfenicol ou à canamicina, ao excluir a maioria dos genes em questão. Para este efeito, os seguintes oligonucleotídeos foram utilizados:

ΔyqhDF (SEQ ID NO 78)

atgaacaactttaatctgcacaccccaacccgcattctgtttggtaaaggcgcaatcgc tggtttacgcgaacaaattccg**tgtaggctggagctgcttcg**

com

- uma região (em caracteres minúsculos) homóloga à sequência (3153377-3153456) da região *yqhD* (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres maiúsculos) para a ampliação do cassete de resistência à canamicina (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, 2000, PNAS, 97:

6640-6645),

ΔyqhDR (SEQ ID NO 79)

ttagcgggcggcttcgtatatacggcggctgacatccaacgtaatgtcatgattttcgc
ccagttgggtcatgccgtgctc**catatgaatatcctccttag**

com

- uma região (caracteres maiúsculos) homóloga à sequência (3154540-3154460) da região *yqhD* (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres maiúsculos) para a ampliação do cassete de resistência à canamicina (sequência de referência em Datsenko, KA & Wanner, BL, 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Os oligonucleotídeos ΔyqhDF e ΔyqhDR são utilizados para amplificar o cassete de resistência à canamicina do plasmídeo pKD4. O produto de PCR obtido é então introduzido por eletroporação na linhagem MG 1655 (pKD46). Os transformantes resistentes à canamicina são selecionados e a inserção do cassete de resistência é verificada por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos yqhDF e yqhDR definidos abaixo. A linhagem retida é designada MG1655 Δ*yqh*D::Km. yqhDF (SEQ ID NO 80): ggcgtctcgccatacaacaaacgcacatcgggc (homóloga à sequência 3153068-3153100). yqhDR (SEQ ID NO 81): gggctttgccgacaccttcttcgttcttg (homóloga à sequência

3154825-3154797).

8.1.2 Construção de plasmídeo pTRC99A-yqhD

Para caracterizar a proteína YqhD, o gene correspondente foi expresso a partir do vetor pTRC99A (Amersham).

Para este efeito, o gene *yqhD* foi amplificado a partir do genoma de *E. coli* usando os oligonucleotídeos yqhD F pTRC99A F e yqhD R pTRC99A R. O produto de PCR foi restringido peloo uso de enzimas *Hind*III e *Bsp*HI e clonados no vetor pTRC99A restringido pelas enzimas de restrição *NcoI-HindIII*. O vetor resultante foi denominado pTRC99A-yqhD.

yqhD F pTRC99A F (SEQ ID NO 82):

cgatgcacg**tcatga**acaactttaatctgcacaccccaacccg,

com:

- uma região (caracteres sublinhados), homóloga à sequência (3153377-3153408) do gene *yqhD* (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- um sítio de restrição *Bsp*HI (caracteres em negrito)

yqhD R pTRC99A R (SEQ ID NO 83):

ggcgtaaa**aagctt**agcgggcggcttcgtatatacggcggctgacatccaacgtaatgt cgtgattttcg

com:

- uma região (caracteres sublinhados), homóloga à sequência

(3154540-3154483) do gene *yqhD* (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),

- um sítio de restrição *Hind*III (caracteres em negrito).

O pTRC99A-yqhD plasmídeo foi então introduzida no MG1655 linhagem ΔyqhD: km.

8,2 superprodução da proteína YqhD

A proteína YqhD foi superproduzida a 37°C em condições aeróbias em frasco Erlenmeyer desconectado de 2l com 500 mL de meio LB com 2,5 g/l de glicose e 50 mg/litro de ampicilina e 50mg/l de canamicina. Os frascos foram agitados a 200 rpm em um agitador orbital. Quando a densidade óptica medida em 550 nm chegou a 0,5 unidades, os frascos foram incubados a 25°C. Quando a densidade ótica atingiu 1,2 unidades, a produção de proteínas YqhD foi induzida pela adição de IPTG para uma concentração final de 500 mM. A biomassa foi coletada por centrifugação quando as culturas atingiram uma densidade óptica acima de 3,5 unidades. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi armazenado a -20°C antes do uso.

8,3 purificação da proteína YqhD

8.3.1 Etapa 1: Preparação dos extratos livres de célula.

400 mg de biomassa de *E. coli* foram suspensas em 70 ml de Hepes 50 mM pH 7,5, e num coquetel de inibidores de

protease. As células foram sonicadas em gelo (Branson sonifier, 70W) em uma célula *RZ3 Rosett* durante oito ciclos de 30 segundos com intervalos de 30 segundos. Após a secagem, as células foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com $MgCl_2$ 1mM e 1UI/mL de DNaseI. Os detritos de células foram removidos por centrifugação a 12000g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi mantido como o extrato bruto.

8.3.2 Etapa 2: Precipitação com sulfato de amônio

O extrato bruto foi precipitado em uma concentração de sulfato de amónio 50% e sulfato de amónio sólido (300 g/l) foi adicionado ao extrato bruto em gelo. Após 15 min de incubação a 4°C, a mistura foi centrifugada a 12000g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido em 50 ml de Hepes 50 mM pH 7,5, 1 M de sulfato de amônio.

8.3.3 Etapa 3: cromatografia de interação hidrofóbica

Utilizando-se um *Akta Purifier* (GE Healthcare), o extrato protéico da etapa anterior foi carregado em uma coluna de 5ml *PhenylHP HiTrap* (GE Healthcare) equilibrada com o mesmo tampão. A coluna foi lavada com 10 volumes de coluna do mesmo tampão. As proteínas foram eluídas com gradientes de duas etapas, um gradiente de 10 volumes de coluna a partir de 1 M a 0,5 M de sulfato de amônio e um

gradiente de 20 volumes de coluna de 0,5 m a 0 M de sulfato de amônio. Após eluição, a coluna foi lavada com 10 volumes de coluna de 50 mM Hepes pH 7,5. A taxa de fluxo da coluna foi de 2,5 ml/min e foram coletadas frações de 2,5 ml. As frações contendo a proteína foram reunidas, dialisadas em 50 mM Hepes pH 7,5 e concentradas a uma concentração de 1,14 mg/microlitro.

8,4 Ensaios de hidróxi aldeído redutase

8.4.1 Síntese química de 4-hidroxibutiraldeído

A síntese química do 4-hidroxibutiraldeído foi descrita na publicação: N° 158 Transposition des dihydro-2.5 furannes en dihydro-2.3 furannes. - Application à la préparation de l'hydroxy-4 butanal ; par R. PAUL, M. FLUCHAIRE et G. GOLLARDEAU.

Bulletin de la Société Chimique de France, 668-671, 1950.

8.4.2 Ensaio de atividade de glicoaldeído e 4-hidroxibutiraldeído redutase

A atividade glicoaldeído e 4-hidroxibutiraldeído-redutase foi avaliada através da medição da velocidade inicial de oxidação do NADPH com espectrofotômetro em um comprimento de onda de 340 nm e em uma temperatura constante de 30°C. A mistura de reação utilizando glicoaldeído ou 4-hidroxibutiraldeído como substrato foi realizada em 20 mM HEPES pH 7,5, 0,1 mM de sulfato de

zinco, 0,2 mM de NADPH, 2 mg de proteína purificada em um volume final de 1ml. A mistura de reação foi incubada por 5 min a 30°C e, em seguida, a reação foi iniciada pela adição do substrato (glicoladeído ou 4-hidroxibutiraldeído) a uma concentração final de 10 mM. Um ensaio controle (branco), sem o substrato, foi executado em paralelo, o valor medido para o controle foi subtraído do valor medido para o ensaio levando em conta a oxidação não específica de NADPH. (Epsilon 340 nm = 6290 M-1 cm-1).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consumiu 1 mol de substrato por minuto nas condições do ensaio. A atividade enzimática específica foi expressa em unidades por mg de proteína.

8.4.3 . Ensaio de atividade 3-hidroxipropionaldeído-redutase

A atividade de YqhD para o substrato 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA) foi descrita na publicação: Hongmei Li ;Jia Chen ;Hao Li ;Yinghua Li ;Ying Li ; (2008).Enhanced activity of yqhD oxidoreductase in synthesis of 1,3-propanediol by error-prone PCR Prog Nat Sci., 18 (12), 1519-1524.

Estes autores utilizaram cloreto de zinco 5mM, 1mM EDTA e 1mM Beta-mercaptoetanol para seus ensaios de 3-hidroxipropionaldeído redutase.

8,5 atividade da enzima purificada

	Atividade da enzima purificada (mUI / mg)
Ensaio de atividade glicoladeído redutase	9840
Ensaio de atividade 3-hidroxipropionaldeído-redutase	7918
Ensaio de atividade 4 hidroxibutiraldeído-redutase	1443

Exemplo 9

Demonstração da atividade da L-serino transaminase codificada pelo gene *serC* de *Escherichia coli*

9,1 Construção de linhagem para a caracterização serC: BL21 (pPAL7-SERC)

Para caracterizar a proteína serC, o gene correspondente foi expresso a partir do vetor de expressão pPAL7 (Bio-Rad).

Para este efeito, o gene *serC* foi amplificado a partir do genoma de *E. coli* usando os oligonucleotídeos pPAL7-serC-F e pPAL7-serC R. O produto de PCR foi restrito com o uso de enzimas *Hind*III e *Eco*RI e clonado no vetor pPAL7 limitado pelas mesmas enzimas de restrição. O vetor

resultante foi denominado pPAL7-*ser*C.

pPAL7 SERC-F (SEQ ID NO 84):

cccAAGCTTtg**ATGGCTCAAATCTTCAATTTTAGTTCTGG**

com

- uma região (caracteres em negrito) homóloga à sequência (956.876-956.904) do gene *ser*C (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres sublinhados) abrigando o sítio de restrição *Hind*III

pPAL7 SERC-R (SEQ ID NO 85):

gGAATTC**TTAACCGTGACGGCGTTCGAACTCAACC**

com

- uma região (caracteres em negrito) homóloga à sequência (957.964-957.937) da região do gene *serC* (sequência de referência na página eletrônica http://www.ecogene.org/),
- uma região (caracteres sublinhados) abrigando o sítio de restrição *Eco*RI

O plasmídeo pPAL7-*ser*C foi então introduzido nas células BL21 pertinentes (DE3) (Invitrogen).

9,2 Superprodução da proteína serC

A superprodução da proteína serC foi realizada aplicando o mesmo protocolo do exemplo 7.2.

9,3 Purificação da proteína serC

9.3.1 Etapa 1: Preparação dos extratos livres de

células.

Cerca de 280 mg de biomassa de *E. coli* foi suspensa em 45 ml de fosfato de potássio 100 mM pH 7,6, e num coquetel de inibidores de protease. A suspensão de células (15 ml por tubo cônico) foi sonicada em gelo (sonoplus Bandelin, 70 W) em um tubo de 50 ml, durante 8 ciclos de 30 segundos com intervalos de 30 seg. Após a secagem, as células foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente com 5 mM $MgCl_2$ e 1UI/mL de DNaseI. Detritos de células foram removidos por centrifugação a 12000g por 30 min a 4°C.

9.3.2 Etapa 2: Purificação por afinidade

A proteína foi purificada a partir de extrato bruto de células por afinidade em coluna *Profinity* (BioRad, Bio-Escala, Mini cartuchos Profinity exatos de 5 ml) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O extrato bruto foi carregado em um cartucho Profinity de 5 ml exato equilibrado com fosfato de potássio 100 mM pH 7,6. A coluna foi lavada com 10 volumes de coluna do mesmo tampão e incubada por 30min com fosfato de potássio 100 mM pH 7,6, 100 mM de flúor à temperatura ambiente. A proteína foi eluída da coluna com 2 volumes de coluna de fosfato de potássio 100 mM pH 7,6. O marcador ficou fortemente ligado à resina e a proteína purificada foi liberada. As frações contendo as proteínas foram misturadas e dialisadas contra

100 mM Tris HCl 150 mM NaCl e glicerol 10% pH 8.

A concentração de proteína foi medida usando o ensaio da proteína de Bradford.

9,4 Ensaio de atividade de L-serino transaminase

Para o ensaio de atividade de L-serino transaminase cerca de 30 mg de enzima purificada foi adicionada a uma solução tampão contendo tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,2, 3 mM L-Serina, 1 mM de ácido α-cetoglutárico em um volume total de 300 ml. A reação foi incubada durante 60 minutos a 30°C. O produto de reação (ácido hidroxipirúvico) foi medido diretamente por LC-MS/MS.

9,5 Atividade da enzima purificada

	Atividade da enzima purificada (mUI / mg)
Ensaio L-Serino transaminase	186

Exemplo 10

Demonstração da atividade da 3-fosfohidroxipiruvato fosfatase codificada pelo gene GPP2 de *Saccharomyces cerevisiae*

10,1 Construção de uma linhagem para a caracterização de GPP2sc: BL21 (pPAL7-gpp2sc)

Para caracterizar a proteína GPP, o gene correspondente é expresso a partir do vetor de expressão pPAL7 (Bio-Rad).

Para este efeito, o gene *gpp* é amplificado do genoma de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando-se os oligonucleotídeos pPAL7-gpp2sc F e pPAL7-gpp2sc R. O produto de PCR é restrito com o uso de enzimas *Hind*III e *Bam*HI e clonado no vetor pPAL7 limitado pela mesmas enzimas de restrição. O vetor resultante é chamado pPAL7-gpp2sc.

pPAL7-gpp2sc F (SEQ ID NO 86):

cccAAGCTTTg**ATGGGATTGACTACTAAACCTCTATC**

com

- uma região (caracteres em negrito) homóloga à sequência (280680-280655) da região do gene *gpp2* (sequência de referência na página eletrônica http://www.yeastgenome.org/),
- uma região (caracteres sublinhados) abrigando o sítio de restrição *Hind*III

pPAL7 kivDll-R (SEQ ID NO 87):

gGGATCC**TTACCATTTCAACAGATCGTCCTTAGC**

com

- uma região (caracteres em negrito) homóloga à sequência (279928-279954) da região do gene *gpp2* (sequência de referência na página eletrônica http://www.yeastgenome.org/),
- uma região (caracteres sublinhados) abrigando o sítio de restrição *Bam*HI

O plasmídeo pPAL7-gpp2sc é então introduzido em células BL21 pertinentes(DE3) (Invitrogen).

10,2 Superprodução da proteína GPP2sc

A superprodução da proteína GPP2sc foi realizada aplicando-se o mesmo protocolo do exemplo 7.2.

10,3 purificação da proteína GPP2sc

10.3.1 Etapa 1: Preparação dos extratos livres de células

Cerca de 294 mg de biomassa de *E. coli* foi suspensa em 45 ml de fosfato de potássio 100 mM pH 7,6, e num coquetel de inibidores de protease. A suspensão de células (15 ml por tubo cônico) foi sonicada em gelo (sonoplus Bandelin, 70 W) em um tubo de 50 ml, durante 8 ciclos de 30 segundos com intervalos de 30 seg. Após a secagem, as células foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente com 5 mM MgCl2 e 1UI/mL de DNaseI. Detritos de células foram removidos por centrifugação a 12000g por 30 min a 4°C.

10.3.2 Etapa 2: Purificação por afinidade

A proteína foi purificada a partir de extrato bruto de células por afinidade em coluna *Profinity* (BioRad, Bio-Escala Mini cartucho Profinity exato de 5 ml) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O extrato bruto foi carregado em um cartucho Profinity de 5 ml exato, equilibrado com fosfato de potássio 100 mM pH 7,6. A coluna

foi lavada com 10 volumes de coluna do mesmo tampão e incubada durante a noite com fosfato de potássio 100 mM pH 7,6, 100 mM de flúor à temperatura ambiente. A proteína foi eluída da coluna com 2 volumes de coluna de fosfato de potássio 100 mM pH 7,6. O marcador ficou fortemente ligado à resina e a proteína purificada foi liberada. As frações contendo as proteínas foram misturadas e dialisadas contra fosfato de potássio 100 mM, 150 mM NaCl, glicerol 10% pH 8 e concentradas em uma concentração de 0,22 mg/microlitro.

A concentração de proteínas foi medida usando-se o ensaio de proteína de Bradford.

10,4 Ensaio de atividade 3-fosfohidroxipiruvato fosfatase

10.4.1 Síntese química de 3-fosfohidroxipiruvato

A síntese química, de 3-fosfohidroxipiruvato foi descrita na publicação: CE Ballou ;H Hesse ;R Hesse ; (1956).The Synthesis and Properties of Hydroxypyruvic Acid Phosphate J Am Chem Soc., 78 (15), 3718-3720.

10.4.2 Ensaio de atividade 3-fosfohidroxipiruvato fosfatase

O ensaio de atividade 3-fosfohidroxipiruvato fosfatase foi realizado com 50 tampão Tris-HCl pH 8,2 mM, 5 mM $MgCl_2$, 3,6 mM de 3-fosfohidroxipiruvato e cerca de 6 mg de proteína purificada (GPP), num volume total de 300 ml. A

reação foi incubada durante 120 minutos a 30°C. O produto de reação (ácido hidroxipirúvico) foi determinado diretamente por LC-MS/MS.

10.5 Atividade da enzima purificada

	Atividade da enzima purificada (mUI / mg)
Ensaio 3-fosfohidroxi piruvato fosfatase	9

Exemplo 11

Simulação do rendimento máximo de etilenoglicol, produção de 1,3-propanodiol e de 1,4-butanodiol

11,1 Parâmetros utilizados para as simulações

As simulações foram realizadas com o software METOPT™ de propriedade de Metex. Uma rede metabólica simplificada de *E. coli* foi utilizada, incluindo uma rede central metabólica, vias metabólicas de todos os precursores de biomassa e processos de produção específicos, como descritos acima. Uma composição clássica de biomassa para *E. coli* foi utilizada. Para cada diol específico, duas simulações foram realizadas. A primeira para calcular um rendimento máximo teórico (tendo em conta a estequiometria apenas do modelo, sem crescimento e sem energia de manutenção). A segunda para o cálculo do rendimento máximo prático, tendo em conta uma taxa de crescimento de $0,1h^{-1}$ e

uma energia de manutenção de 5 $mmol_{ATP}.g_{DW}^{-1}.h^{-1}$. Todas as simulações foram realizadas com uma taxa de absorção específica de glicose de 3 $mmol.g_{DW}^{-1}.h^{-1}$. Para etileno glicol e 1,3 propanodiol, simulações foram realizadas em condições aeróbias. Especificamente para o 1,4-butanodiol, as simulações foram realizadas tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias. Nas condições anaeróbicas, a taxa de crescimento não é definida em $0,1h^{-1}$. A taxa de crescimento é a taxa de crescimento máxima possível de acordo com o ATP disponível.

11,2 Resultados das simulações

	etilenoglicol	1,3-propanodiol	1,4-butanodiol aeróbico)	1,4-butanodiol (anaeróbico)
Rendimento máximo teórico (g / g)	0,69	0,60	0,50	0,50
Rendimento máximo prático (g / g)	0,50	0,39	0,35	0,45 ($m_{máx}$ = $0,03h^{-1}$)

REIVINDICAÇÕES

1. Microrganismo geneticamente modificado de *Escherichia coli* para a bioprodução de um diol alifático escolhido entre etileno-glicol, 1,3-propanodiol e 1,4-butanodiol,

caracterizado pelo fato de que o microorganismo compreende uma via metabólica para a descarboxilação de um metabólito ácido hidroxi-2-cetoalifático com uma enzima tendo uma atividade 2-cetoácido descarboxilase codificada pelo gene *kiv*D de *Lactococcus lactis*, sendo o produto obtido da dita etapa de descarboxilação ainda reduzido no diol alifático correspondente com uma enzima que possui atividade de hidroxil aldeído redutase codificada pelo gene *yqh*D de *Escherichia coli*,

em que o metabólito do ácido hidroxi-2-cetoalifático é:

- hidroxipiruvato quando o diol alifático é etileno-glicol, ou

- 4-hidroxi-2-cetobutirato, quando o diol alifático é o 1,3-propanodiol, ou

- 5-hidroxi-2-cetopentanoato quando o diol alifático é 1,4-butanodiol, respectivamente,

e

em que o microorganismo é geneticamente modificado para a produção melhorada do referido metabólito ácido hidroxi-2-cetoalifático.

2. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a produção melhorada de

hidroxipiruvato é obtida por, pelo menos, uma das seguintes modificações:

- Atenuar a expressão dos genes *gpmA* e / ou *pgmI*;

- Aumentar a expressão dos genes *serA* e / ou *serC*;

- Mutar o gene *serA* para obter um alelo resistente a *feedback*;

- Aumentar a expressão dos genes *yeaB* ou *serB*;

- Introduzir e aumentar a expressão do gene *GPP2* de *S. Cerevisiae*;

- Atenuar a expressão dos genes *sdaA* e / ou *sdaB* e / ou *tdcG* e / ou *cysE* e / ou *trpAB* e / ou *glyA*;

- atenuar a expressão dos genes *ghrA* ou *hyi*;

- atenuar a expressão dos genes *ItaE* ou *aldA* / *aldB*;

- atenuar a expressão dos genes *pykA* e *pykF*;

- Aumentar a expressão do gene *pps*A.

3. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a produção melhorada de 4-hidroxi-2-cetobutirato é obtida por, pelo menos, uma das seguintes modificações:

- aumentar a expressão do gene *ppc*;

- atenuar a expressão dos genes *pckA* e / ou *maeA* e / ou *maeB*;

- aumentar a expressão dos genes *thrA* e *asd*;

- mutar o gene *thrA* para obter um alelo resistente a *feedback*;

- aumentar a expressão do gene *serC*;

- atenuar a expressão dos genes *thrB* e *thrC*, e / ou *metA* e / ou *dapA*;

- atenuar a expressão dos genes *aldA* e *aldB*;

- atenuar a expressão dos genes *pykA* e *pykF*;

- aumentar a expressão do gene ppsA.

4. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a produção melhorada de 5-hidroxi-2-cetopentanoato é obtida por, pelo menos, uma das seguintes modificações:

- aumentar a expressão do gene *ppc*;

- atenuar a expressão dos genes *pckA* e / ou *maeA* e / ou *maeB*;

- aumentar a expressão dos genes *gltA* e / ou *icd*;

- atenuar a expressão dos genes *sucAB* ou *sucCD* e / ou *aceA*: ou *aceB*;

- atenuar a expressão do gene *arcA*;

- aumentar a expressão do gene *prpE*;

- atenuar a expressão dos genes *gdhA* e *gltB*;

- atenuar a expressão dos genes *aldA* e *aldB*;

- atenuar a expressão dos genes *ack* e *pta*.

5. Método para a produção fermentativa de um diol alifático escolhido entre etileno-glicol, 1,3-propanodiol e 1,4-butanodiol **caracterizado pelo** fato de que compreende as etapas de:

- cultivar um microrganismo conforme definido pelas reivindicações 1 a 4 em um meio de cultura adequado compreendendo uma fonte de carbono, e

- recuperar o diol alifático do meio de cultura.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pelo** fato de que o diol é ainda purificado.

7. Método, de acordo com uma das reivindicações 5 ou 6, **caracterizado pelo** fato de que a fonte de carbono é

selccionada entre hexoses, pentoses, monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos, melaços, amido e combinações dos mesmos.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato de que a fonte de carbono é selecionada entre glicose e sacarose.

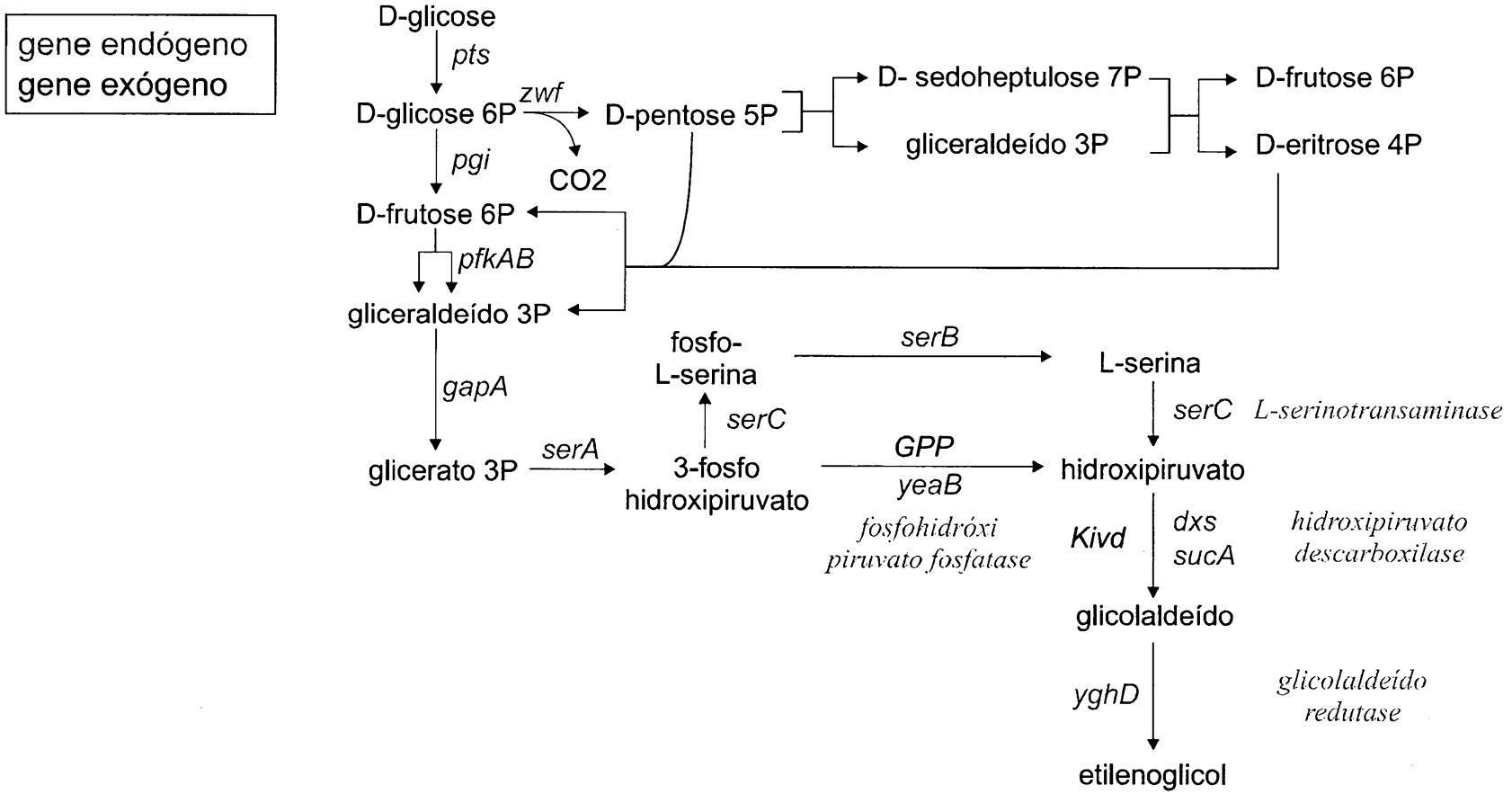

gene endógeno
gene exógeno
D-glicose
pts
D-glicose 6P
zwf
D-pentose 5P
CO2
D- sedoheptulose 7P
gliceraldeído 3P
D-frutose 6P
D-eritrose 4P
pgi
D-frutose 6P
pfkAB
gliceraldeído 3P
gapA
glicerato 3P
serA
fosfo-
L-serina
serC
3-fosfo
hidroxipiruvato
serB
GPP
yeaB
fosfohidróxi
piruvato fosfatase
L-serina
serC
L-serinotransaminase
hidroxipiruvato
Kivd
dxs
sucA
hidroxipiruvato
descarboxilase
glicolaldeído
yghD
glicolaldeído
redutase
etilenoglicol

FIGURA 1

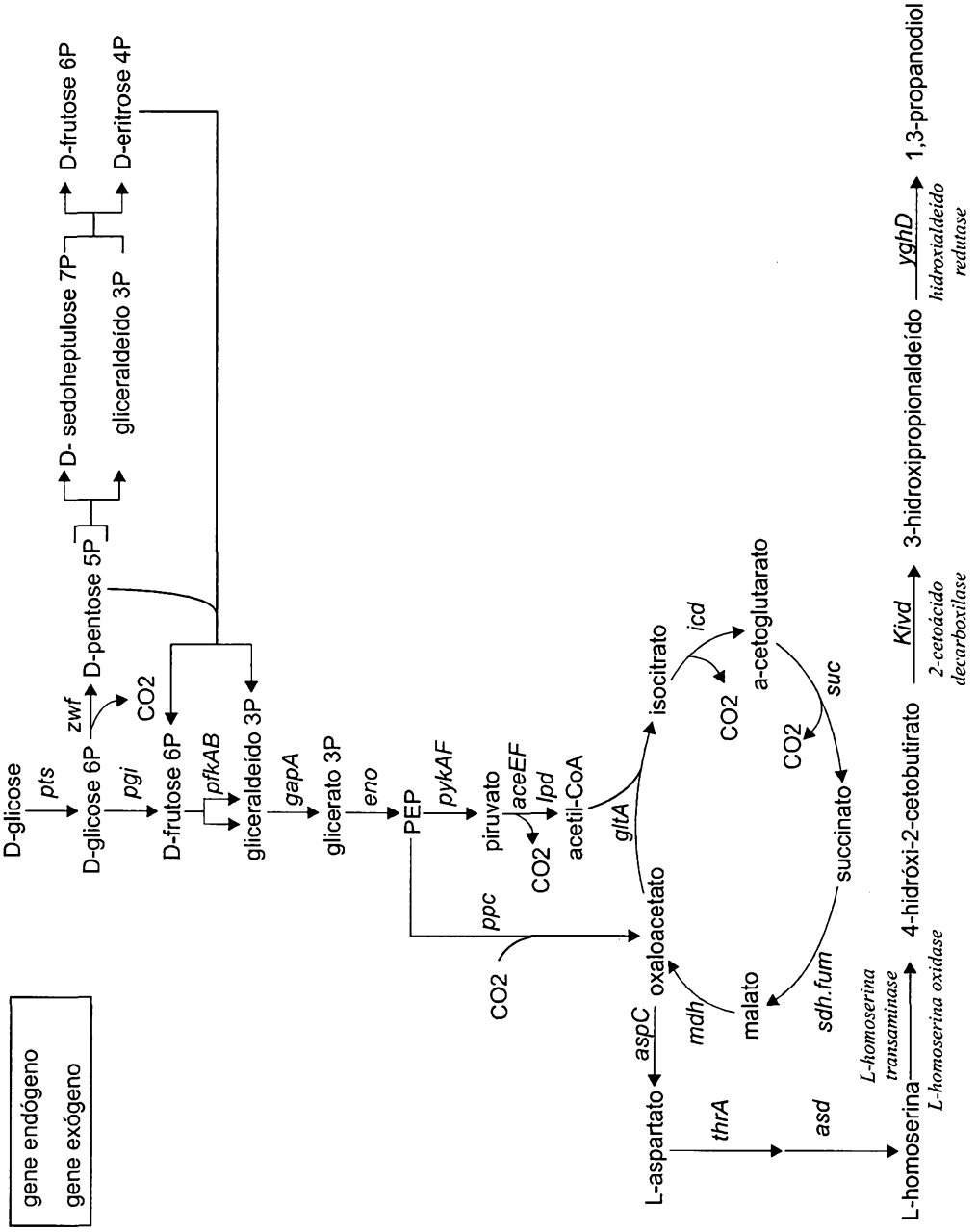

gene endógeno
gene exógeno
D-glicose
pts
D-glicose 6P
zwf
D-pentose 5P
D- sedoheptulose 7P
D-frutose 6P
D-eritrose 4P
pgi
CO2
D-frutose 6P
pfkAB
gliceraldeído 3P
gliceraldeído 3P
gapA
glicerato 3P
eno
PEP
pykAF
piruvato
aceEF
lpd
CO2
acetil-CoA
gltA
isocitrato
icd
CO2
a-cetoglutarato
CO2
suc
succinato
sdh.fum
malato
mdh
oxaloacetato
ppc
CO2
aspC
L-aspartato
thrA
asd
L-homoserina
L-homoserina oxidase
4-hidróxi-2-cetobutirato
L-homoserina transaminase
Kivd
2-cetoácido descarboxilase
3-hidroxipropionaldeído
yghD
hidroxialdeído redutase
1,3-propanodiol

FIGURA 2

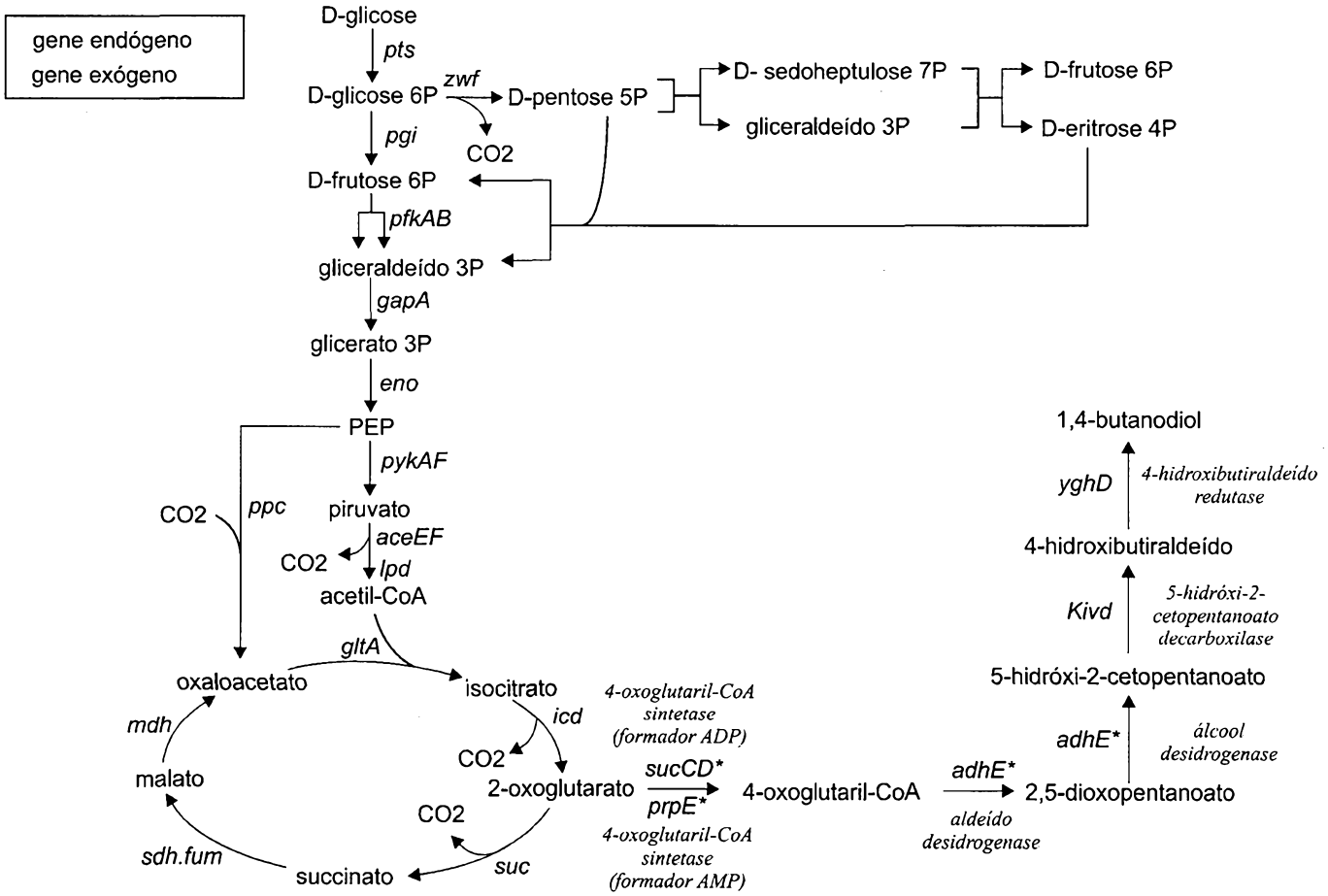

gene endógeno
gene exógeno
D-glicose
pts
D-glicose 6P
zwf
D-pentose 5P
CO2
D- sedoheptulose 7P
gliceraldeído 3P
D-frutose 6P
D-eritrose 4P
pgi
D-frutose 6P
pfkAB
gliceraldeído 3P
gapA
glicerato 3P
eno
PEP
pykAF
CO2
ppc
piruvato
aceEF
CO2
lpd
acetil-CoA
gltA
oxaloacetato
isocitrato
icd
mdh
CO2
malato
2-oxoglutarato
CO2
sdh.fum
succinato
suc
4-oxoglutaril-CoA sintetase (formador ADP)
sucCD*
prpE*
4-oxoglutaril-CoA sintetase (formador AMP)
4-oxoglutaril-CoA
adhE*
aldeído desidrogenase
2,5-dioxopentanoato
adhE*
álcool desidrogenase
5-hidróxi-2-cetopentanoato
Kivd
5-hidróxi-2-cetopentanoato decarboxilase
4-hidroxibutiraldeído
yghD
4-hidroxibutiraldeído redutase
1,4-butanodiol

FIGURA 3

Gene	Organismo	Número de acesso
Pdc2	Arabidopsis thaliana	REGIÃO NC_003076 : complemento(22327913..22329987)
Pdc3	Arabidopsis thaliana	REGIÃO NC_003076 : complemento(132318..134861)
Pdc	Clostridium acetobutylicum	REGIÃO NC_001988 : 24954..26618
aceA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 4215132..4216436
aceB	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 4213501..4215102
aceK	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 4216619..4218355
arcA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : complemento(4637613..4638329)
asd	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : complemento(3571798..3572901)
cysE	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : complemento(3779764..3780585)
dapA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : complemento(2596904..2597782)
dkgA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 3154645..3155472
dkgB	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 229167..229970
fucO	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : complemento(2929887..2931038)
galP	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 3086306..3087700
gdhA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 1840395..1841738
gltA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : complemento(752408..753691)
gltB	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 3352654..3357207
glyA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : complemento(2682276..2683529)
gpmA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : complemento(786066..786818)
gpmB	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 4631820..4632467
icd	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 1194346..1195596
lrp	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 931818..932312
maeA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : complemento(1551996..1553693)
maeB	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : complemento(2574120..2576399)
metA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 4212303..4213232
pckA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 3530840..3532462
ppc	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : complemento(4148470..4151121)
ppsA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : complemento(1782758..1785136)
pykA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 1935673..1937115
pykF	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 1753722..1755134
sdaA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 1894956..1896320
sdaB	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 2927598..2928965
serA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : complemento(3055200..3056432)
serC	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 956876..957964
sucA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 757929..760730
sucB	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 760745..761962
sucC	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 762237..763403
sucD	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 763403..764272
thrA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 337..2799
thrB	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 2801..3733
thrC	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 3734..5020
trpA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : complemento(1314440..1315246)
trpB	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : complemento(1315246..1316439)
yqhD	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 3153377..3154540

FIGURA 4-1

Kivd	Lactococcus lactis	AJ746364
Aro10	Pichia stipitis	NC_009046: complemento(1053281..1055152)
Pdc1	Pichia stipitis	REGIÃO NC_009068 : 1765715..1767920
Pdc2	Pichia stipitis	REGIÃO NC_009068 : complemento(285510..287347)
ADH1	Saccharomyces cerevisiae	REGIÃO NC_001147 : complemento(159548..160594)
ADH2	Saccharomyces cerevisiae	REGIÃO NC_001145 : complemento(873290..874336)
Aro10	Saccharomyces cerevisiae	REGIÃO NC_001136 : 1234210..1236117
Pdc1	Saccharomyces cerevisiae	REGIÃO NC_001144 : complemento(232391..234082)
Pdc5	Saccharomyces cerevisiae	REGIÃO NC_001144 : 410724..412415
Pdc6	Saccharomyces cerevisiae	REGIÃO NC_001139 : complemento(651294..652985)
Thi3	Saccharomyces cerevisiae	REGIÃO NC_001136 : complemento(310642..312471)
pdc	Zymomonas mobilis	REGIÃO NC_006526 : complemento(1373405..1375111)
yeaB	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 1894194..1894772
aldA	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : 1486256..1487695
aldB	Escherichia coli	REGIÃO NC_000913 : complemento(3754534..3752996)
aao	Rhodococcus opacus	REGIÃO NC_012522 : complemento(1799119..1800723)

FIGURA 4-2