



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

(21) PI 1013216-3 A2



(22) Data do Depósito: 02/03/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 03/11/2020

(54) Título: ISOPRENO DE ORIGEM MICROBIANA E MÉTODOS PARA SUA FABRICAÇÃO

(51) Int. Cl.: B60Q 1/32.

(30) Prioridade Unionista: 03/03/2009 US 61/202,474.

(71) Depositante(es): AMYRIS, INC..

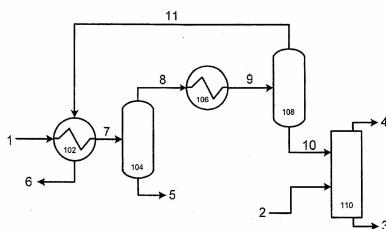
(72) Inventor(es): DEREK MCPHEE.

(86) Pedido PCT: PCT US2010025826 de 02/03/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/101855 de 10/09/2010

(85) Data da Fase Nacional: 05/09/2011

(57) Resumo: ISOPRENO DE ORIGEM MICROBIANA E MÉTODOS PARA SUA FABRICAÇÃO. Método para produzir isopreno que compreende um meio aquoso que inclui células hospedeiras modificadas geneticamente capazes de produzir isopreno, sendo que a composição de isopreno resultante é processada através de, pelo menos um processo de separação e/ou purificação para fornecer um composição enriquecida com isopreno e um system para fazer o mesmo.



**"ISOPRENO DE ORIGEM MICROBIANA E MÉTODOS PARA SUA FABRICAÇÃO"**

**REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS**

O presente pedido reivindica o benefício da  
5 prioridade decorrente do Pedido Provisório N° U.S.  
61/202.474, depositado em 3 de março de 2009. O pedido de  
prioridade, em sua totalidade, é incorporado ao mesmo por  
meio de citação.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

10 O isopreno é um hidrocarboneto de cinco carbonos  
(2-metil-1,3-butadieno), que é uma substância química  
industrial utilizada em uma gama de aplicações industriais  
tais como pneus, calçados, artigos esportivos, látex,  
fitas, etiquetas, e produtos médicos descartáveis. O  
15 isopreno também é um composto natural fabricado em sistemas  
biológicos. Apesar de o isopreno ser fabricado naturalmente  
em vários organismos, desde micróbios a animais, a maior  
parte do isopreno de ocorrência natural tem sido  
tradicionalmente extraído de plantas da borracha. No  
20 entanto, os rendimentos da extração são baixos e essas  
quantidades estão significativamente abaixo das requeridas  
a muitas aplicações comerciais. Em consequência disso, o  
isopreno é primordialmente produzido sinteticamente a  
partir de fontes do petróleo, com mais frequência a partir  
25 do etileno utilizando um processo de craqueamento a vapor.

Em virtude da crescente atenção às mudanças  
climáticas e, portanto, a uma demanda em fabricar os  
produtos que necessitamos de forma mais sustentável, urge a  
necessidade de isopreno de origem biológica ou renovável o  
30 que colaborará em atender as demandas globais de isopreno,

mas que possam ser produzidos de forma mais amigável ao meio ambiente. A presente invenção aborda esta necessidade.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona composições de isopreno de origem microbiana e métodos para fabricar e purificar essas composições.

Em um aspecto da invenção, é fornecida uma composição de isopreno gasoso que compreende: isopreno e água em que a água está presente em uma quantidade superior a cerca de 70% de sua quantidade de saturação e em que a composição de isopreno gasoso compreende 1 parte por milhão ou menos que 1 parte por milhão de qualquer uma das seguintes impurezas: alcinos  $C_2-C_5$ , ciclopentadieno, piperileno, e 1,4-pentadieno.

Em outro aspecto é fornecida uma composição de isopreno líquido que compreende: ao menos 65% de isopreno em peso e em que a composição de isopreno compreende 1 parte por milhão ou inferior a 1 parte por milhão de qualquer uma das seguintes impurezas: alcinos  $C_2-C_5$ , ciclopentadieno, piperileno, e 1,4-pentadieno.

Em outro aspecto, é fornecido um método para fabricar e purificar o isopreno.

O método compreende:

a. obter uma primeira composição gasosa que compreende isopreno e água, em que a composição gasosa compreende um montante igual ou inferior a 1 parte por milhão de alcinos  $C_2-C_5$ ;

b. fluir a primeira composição gasosa através de um primeiro resfriador em que o primeiro resfriador tem uma temperatura entre cerca de  $10^{\circ}C$  e cerca de  $-15^{\circ}C$ ,

resultando desta forma em uma segunda composição gasosa e em que a segunda composição gasosa compreende menos água que a primeira composição gasosa;

c. fluir a segunda composição gasosa através de um segundo resfriador, em que o segundo resfriador tem uma temperatura inferior a  $-35^{\circ}\text{C}$ ; e

d. coletar a composição de isopreno líquido resultante.

Em outro aspecto, é fornecido um método adicional. O método compreende:

a. cultivar uma pluralidade de células hospedeiras capazes de fabricar o isopreno;

b. criar uma primeira composição gasosa que compreende isopreno e água, em que a água está presente em uma quantidade superior a cerca de 70% de sua quantidade de saturação;

c. submeter a primeira composição gasosa a uma primeira etapa de resfriamento, e dessa forma substancialmente toda a água é removida da primeira composição gasosa, resultando na segunda composição gasosa; e

d. submeter a segunda composição gasosa a uma segunda etapa de resfriamento e desse modo a composição de isopreno líquido é coletada.

Em outro aspecto, é fornecido outro método. O método compreende:

a. cultivar uma pluralidade de células hospedeiras capazes de fabricar isopreno;

b. criar uma primeira composição gasosa que compreende isopreno e água, em que a água está presente em

uma quantidade superior a cerca de 70% de sua quantidade de saturação;

c. submeter a primeira composição gasosa a uma primeira etapa de resfriamento e desse modo  
5 substancialmente toda a água é removida da primeira composição gasosa resultando na segunda composição gasosa;

d. submeter a segunda composição gasosa a uma segunda etapa de resfriamento e desse modo a composição de isopreno líquido é coletada; e

10 e. opcionalmente, colocar a primeira composição gasosa, a segunda composição gasosa e/ou a composição de isopreno líquido em contato com uma membrana contendo zeólitos modificados ou peneira molecular para proporcionar uma composição de isopreno purificada.

15 Em outro aspecto, outro método é fornecido. O método compreende:

a. contatar uma pluralidade de células hospedeiras capazes de fabricar isopreno em um meio aquoso, em que o meio aquoso está em contato com um líquido  
20 orgânico imiscível e o meio aquoso, as células hospedeiras, e o líquido orgânico imiscível estão em um receptáculo fechado; e

b. cultivar as células hospedeiras no meio aquoso e desse modo as células hospedeiras fabricam o isopreno e o  
25 isopreno é capturado no líquido orgânico imiscível.

Em outro aspecto, é fornecido um método adicional. O método compreende:

a. obter uma primeira composição gasosa que compreende:

- i. isopreno em uma quantidade entre cerca de 0,1% e cerca de 15% em volume;
- ii. dióxido de carbono em uma quantidade entre cerca de 0,04% e cerca de 35% em volume;
- 5       iii. oxigênio em uma quantidade entre cerca de 1% e cerca de 20% em volume;
- iv. nitrogênio em uma quantidade superior a cerca de 50% em volume;
- v. argônio em uma quantidade inferior a cerca de 10   0,9% em volume;
- vi. água em uma quantidade superior a cerca de 70% de sua quantidade de saturação;
- vii. um montante igual ou inferior a 1 parte por milhão de alcino C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, ciclopentadieno, piperileno, e 1,4-  
15   pentadieno; e
- viii. etanol;
- b. fluir a primeira composição gasosa através de um primeiro resfriador e de um tambor de vaporização conectado de forma operacional, em que o primeiro  
20   resfriador tem uma temperatura entre cerca de 10°C e cerca de -15°C resultando desta forma em uma segunda composição gasosa e em que A segunda composição gasosa compreende menos água que a primeira composição gasosa;
- c. fluir a segunda composição gasosa através de  
25   um segundo resfriador e de um tambor de vaporização conectado de forma operacional, em que o segundo resfriador tem uma temperatura entre cerca de 35°C e cerca de -85°C; e
- d. coletar a composição de isopreno líquido resultante.

Um sistema de produção de isopreno que compreende: a. um biorreator capaz de cultivar uma pluralidade de células hospedeiras;

b. um primeiro resfriador e um tambor de vaporização conectado de forma operacional à corrente superior do biorreator, o primeiro resfriador sendo capaz de operar em uma faixa de temperatura entre 10°C e -15°C; e

c. um segundo resfriador e tambor de vaporização conectado de forma operacional à corrente superior de saída do primeiro resfriador e tambor de vaporização, o segundo resfriador sendo capaz de operar em uma temperatura inferior a -35°C.

Em ainda outro aspecto, é fornecido um sistema de produção de isopreno. O sistema compreende:

a. um receptáculo fechado;

b. um meio aquoso, no interior do receptáculo, criando uma primeira fase;

c. uma pluralidade de células hospedeiras, no interior do meio aquoso, capaz de fabricar isopreno; e,

d. uma segunda fase orgânica líquida, capaz de capturar o isopreno fabricado pelas células hospedeiras, em contato com a primeira fase.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A Figura 1 é uma representação esquemática de um sistema de separação exemplificativo.

A Figura 2 é outra representação esquemática de outro sistema de separação exemplificativo.

A Figura 3 é uma representação esquemática da via do mevalonato ("MEV") para a produção de difosfato de isopentila ("IPP").

A Figura 4 é uma representação esquemática da via do DXP para a produção de IPP e pirofosfato de dimetilalila ("DMAPP"). Dxs é a 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase; Dxr é 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato redutoisomeroase

5 (também denominada IspC); IspD é 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintase; IspE é 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintase; IspF é 2C-metil-D-eritritol

2,4-ciclodifosfato sintase; IspG é 1-hidroxi-2-  
10 metil-2-(E)-butenil 4-difosfato sintase (IspG); e ispH é isopentenil/dimetilalil difosfato sintase.

A Figura 5 mostra a recuperação de isopreno a partir de um líquido orgânico imiscível (miristato de isopropila) oriundo de um sistema de fermentação fechado.

15 A Figura 6 mostra um mapa do plasmídeo pAM1547.

As Figuras 7A-G mostram mapas dos insertos dos vetores pAM489, pAM491, pAM493, pAM495, pAM497, e pAM584, e do cassete de integração  $\text{natA-P}_{\text{CR3}}^{-1}$  a  $-734$ .

20 A Figura 8 mostra um mapa do vetor de Entrada pMULE.

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

### Definições

A menos que seja definido em contrário, todos os  
25 termos técnicos e científicos utilizados neste documento assumem o significado idêntico ao comumente entendido por um indivíduo versado na técnica básica a que pertence esta invenção. São citados diversos termos que serão definidos e que adotarão os significados adiante:

"Composto bio-orgânico" se refere a um composto orgânico que tem ao menos cinco átomos de carbono que pode ser fabricado por uma célula hospedeira assimilando uma fonte de carbono carboidrato e convertendo a fonte de carbono carboidrato no produto desejado.

"Via da deoxixilulose 5-fosfato" ou "via do DXP" é aqui utilizada para se referir à via que converte o gliceraldeído-3-fosfato e piruvato em IPP e DMAPP. A via do DXP é ilustrada esquematicamente na Figura 4.

10 "Endógeno" se refere a uma substância ou processo capaz de ocorrer naturalmente, por exemplo, em uma célula hospedeira não recombinante.

"Ácido nucléico heterólogo" como usado neste documento se refere a um ácido nucléico em que ao menos uma  
15 das seguintes afirmações é verdadeira: (a) o ácido nucléico é estranho ("exógeno") a (ou seja, não é naturalmente encontrado em) uma dada célula hospedeira; (b) o ácido nucléico compreende uma sequência de nucleotídeo que é naturalmente encontrada em (ou seja, é "endógeno a") uma  
20 dada célula hospedeira, mas a sequência de nucleotídeo é produzida em quantidades artificiais (por exemplo, superior à esperada ou maior que a encontrada naturalmente) na célula; (c) o ácido nucléico compreende uma sequência de nucleotídeo que difere da sequência de uma sequência de  
25 nucleotídeo endógena, mas sequência de nucleotídeo encodifica a mesma proteína (possui uma sequência de aminoácidos idêntica ou substancialmente idêntica) e é produzida em quantidades artificiais (por exemplo, superior à esperada ou maior que a encontrada naturalmente) na  
30 célula; ou (d) o ácido nucléico compreende duas ou mais

sequências de nucleotídeo que não são encontradas na mesma relação entre si na natureza (por exemplo, o ácido nucléico é recombinante).

"Célula hospedeira" e "microorganismo" são  
5 utilizados de forma intercambiável para se referir à célula viva Archae, bacteriana, ou eucariótica na qual um ácido nucléico heterólogo pode ser ou foi inserido. O termo também se refere à progênie da célula original, cuja morfologia pode não ter necessariamente uma morfologia ou  
10 complemento de DNA total ou gênico totalmente idênticos à matriz original, em decorrência de mutação natural, acidental, ou deliberada.

"Isoprenóide" e "composto isoprenóide" são  
utilizados de forma intercambiável e se referem a um  
15 composto derivável do difosfato de isopentila.

"Isolado" e "isolar" quando citados em relação a um composto bio-orgânico é o enriquecimento da quantidade de composto bio-orgânico em uma composição. Consequentemente, a quantidade do composto bio-orgânico em  
20 uma composição depois de o composto bio-orgânico ter sido isolado ou submetido a uma etapa de isolamento é maior que a quantidade presente na composição antes de tal etapa.

"Via do mevalonato" ou "via NEV" é utilizada para denominar uma via Biosintética que converte a acetil-CoA em  
25 IPP. A via NEV é ilustrada esquematicamente na Figura 3.

"Ocorrência natural" como aplicada a um ácido nucléico, uma enzima, uma célula, ou um organismo, se refere a um ácido nucléico, enzima, célula, ou organismo que é encontrado na natureza. Por exemplo, um polipeptídeo  
30 ou sequência de polinucleotídeo que está presente em um

organismo passível de ser isolado de uma fonte na natureza e que não foi voluntariamente modificado pelo homem em laboratório é de ocorrência natural.

"Opcional" ou "opcionalmente" significa que a  
5 estrutura ou atributo descrito posteriormente pode ou não estar presente, ou que o evento ou circunstância descrito posteriormente pode ou não ocorrer, e que a descrição inclui casos em que um atributo ou estrutura particular está presente e casos em que o atributo ou estrutura está  
10 ausente, ou casos em que o evento ou circunstância ocorre e casos em que o evento ou circunstância não ocorre.

"Pirofosfato" é utilizado de forma intercambiável com "difosfato".

Como usado neste documento, uma composição que é  
15 um composto "substancialmente puro" está substancialmente isenta de um ou mais compostos adicionais, isto é, a composição contém mais que 80% em volume, mais que 90% em volume, mais que 95% em volume, mais que 96% em volume, mais que 97% em volume, mais que 98% em volume, mais que  
20 99% em volume, mais que 99,5% em volume, mais que 99,6% em volume, mais que 99,7% em volume, mais que 99,8% em volume, mais que 99,9% em volume do composto; ou menos que 20% em volume, menos que 10% em volume, menos que 5% em volume, menos que 4% em volume, menos que 3% em volume, menos que  
25 2% em volume, menos que 1% em volume, menos que 0,5% em volume, menos que 0,1% em volume, ou menos que 0,01% em volume de um ou mais compostos adicionais, com base no volume total da composição.

Na descrição adiante, todos os números aqui  
30 divulgados são valores aproximados, não importando se as

palavras "cerca de" ou "aproximado" forem utilizadas em associação. Esses valores podem variar em 1 por cento, 2 por cento, 5 por cento, ou, certas vezes, 10 a 20 por cento. Sempre que uma faixa numérica com um limite, RL e um limite superior, RU, for divulgada, qualquer número confinado nesta faixa é especificamente divulgado. Em particular, os números adiante contidos na faixa são especificamente divulgados:  $R = RL + k * (RU - RL)$ , em que k é uma variável com variações de 1 por cento a 100 por cento com incrementos de 1 por cento, isto é, k é 1 por cento, 2 por cento, 3 por cento, 4 por cento, 5 por cento, ..., 50 por cento, 51 por cento, 52 por cento, ..., 95 por cento, 96 por cento, 97 por cento, 98 por cento, 99 por cento, ou 100 por cento. Mais ainda, qualquer faixa numérica definida por dois números R como definido acima também é especificamente divulgado.

Além das definições acima, determinados compostos descritos neste pedido têm um ou mais ligações duplas que podem existir como o isômero Z ou E. A invenção em determinadas modalidades engloba esses compostos como isômeros individuais em uma forma substancialmente pura, bem como misturas de vários isômeros, por exemplo, misturas racêmicas de estereoisômero.

#### **Fontes Atuais de Isopreno**

O isopreno é naturalmente fabricado pelas plantas da borracha (tipicamente *Hevea brasiliensis*) ou é fabricado sinteticamente a partir das fontes do petróleo. Quando fabricado naturalmente, o extrato semelhante à seiva (conhecida como látex e é uma versão polimerizada do isopreno) é coletado das plantas da borracha e é a fonte

primária da borracha natural. Como o látex e a borracha natural podem ser de qualidade variável (distribuição molecular irregular), os análogos sintéticos da borracha natural ou polisopreno frequentemente é preferido em função  
5 de sua maior uniformidade.

O isopreno sintetizado quimicamente é fabricado basicamente pelas fontes do petróleo. O método mais corriqueiro envolve o craqueamento a vapor de um fluxo de petróleo para fabricar o etileno, que por sua vez é em  
10 seguida convertido em isopreno. Outros métodos para fabricação do isopreno incluem carbonilação do isobutileno e a desidrogenação do isopentano. O isopreno resultante é produzido e vendido em diferentes concentrações. O isopreno bruto tem uma pureza entre 15% e 65%. O isopreno refinado é  
15 definido como um isopreno dotado de uma pureza entre 65% e 95%. O isopreno de elevada pureza é definido como o isopreno que tem uma pureza entre 95% e 99,5%. O isopreno de classificação polimérica é o isopreno com uma pureza superior a 99,5%.

20 Em consequência de seu modo de fabricação, isopreno sintético contém uma série de impurezas, inclusive diversos acetilenos e dienos, tais como ciclopentadieno e piperileno. Muito embora esses catalisadores sejam indesejáveis por inibirem a polimerização, em geral é  
25 antieconômico eliminá-los completamente e a pureza do isopreno é compatibilizada com o produto final desejado. Por exemplo, a pureza do isopreno pureza requerida para fabricar a borracha de butila é substancialmente inferior à requerida para fabricar polímeros SIS (classificação  
30 polimérica).

Composições de Isopreno Gasoso de Origem Microbiana

A presente invenção proporciona composições de isopreno de origem microbiana e métodos para sua fabricação e purificação. Composições de isopreno de origem microbiana diferem das fontes derivadas do petróleo pelo fato de as composições praticamente não incluírem nenhum das seguintes impurezas: alcinos  $C_2-C_5$ ; ciclopentadieno, piperileno e 1,4-pentadieno.

Em um aspecto da invenção, é fornecida uma composição de isopreno gasoso. A composição compreende isopreno e água, sendo que a água está presente em uma quantidade que é ao menos cerca de 70% de sua quantidade de saturação e a composição compreende um montante igual ou inferior a 1 parte por milhão de alcinos  $C_2-C_5$ . Exemplos ilustrativos de alcinos  $C_2-C_5$  incluem acetileno, isopropilacetileno, 1-pentino, 2-pentino, e 2-butino.

Em outro aspecto da invenção, é fornecida outra composição de isopreno gasoso. A composição compreende isopreno e água, sendo que a água está presente em uma quantidade que é ao menos cerca de 70% de sua quantidade de saturação e a composição compreende um montante igual ou inferior a 1 parte por milhão de ciclopentadieno.

Em outro aspecto da invenção, outra composição de isopreno gasoso é fornecida. A composição compreende isopreno e água, sendo que a água está presente em uma quantidade que é ao menos cerca de 70% de sua quantidade de saturação e a composição compreende um montante igual ou inferior a 1 parte por milhão de piperileno.

Em outro aspecto d invenção, outra composição de isopreno gasoso é fornecida. A composição compreende isopreno e água, sendo que a água está presente em uma quantidade que é ao menos cerca de 70% de sua quantidade de saturação e a composição compreende um montante igual ou inferior a 1 parte por milhão de 1,4-pentadieno.

Em outro aspecto da invenção, é fornecida outra composição de isopreno gasoso. A composição compreende isopreno e água, sendo que a água está presente em uma quantidade que é ao menos cerca de 70% de sua quantidade de saturação e a composição compreende um montante igual ou inferior a 1 parte por milhão de alcinos  $C_2-C_5$ , ciclopentadieno, piperileno, e 1,4-pentadieno individualmente.

Em algumas modalidades, a composição de isopreno gasoso compreende isopreno que está presente entre cerca de 0,1% e cerca de 15% em volume. Em outras modalidades, o isopreno está presente entre cerca de 1 e 10% em volume. Em outras modalidades mais, o isopreno está presente entre cerca de 1 e 5% em volume. Em outras modalidades ainda, o isopreno está presente entre cerca de 5% e cerca de 10% em volume. Em modalidades adicionais, o isopreno está presente entre em uma quantidade superior a cerca de 10% em volume.

Em outras modalidades, a composição de isopreno gasoso compreende água em uma quantidade que é superior a cerca de 70%; 75%, 80%, 85%, 90%, 95% e 99% de sua quantidade de saturação. Em outras modalidades mais, a composição de isopreno gasoso compreende água saturada.

Em outras modalidades, a composição de isopreno gasoso compreende ainda dióxido de carbono que está

presente em uma quantidade que é superior a cerca de 0,04% em volume. Em outras modalidades mais, o dióxido de carbono está presente em uma quantidade que é superior a cerca de 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1,0%, e 5% em volume. Em modalidades  
5 adicionais, o dióxido de carbono está presente em uma quantidade que é superior a cerca de 10%, cerca de 20%, cerca de 30% em volume. Em outras modalidades complementares, o dióxido de carbono está presente em uma quantidade que está entre cerca de 1% e cerca de 35% em  
10 volume. Em outras modalidades mais, o dióxido de carbono está presente em uma quantidade que está entre cerca de 10% e cerca de 30% em volume.

Em outras modalidades, a composição de isopreno gasoso compreende ainda oxigênio. Em algumas modalidades, o  
15 oxigênio está presente em uma quantidade que é inferior a cerca de 20,9% em volume. Em outras modalidades, o oxigênio está presente em uma quantidade que está entre cerca de 1% em volume e cerca de 20% em volume. Em outras modalidades, o oxigênio está presente em uma quantidade que está entre  
20 cerca de 8% e cerca de 15% em volume. Em outras modalidades, o oxigênio está presente em uma quantidade que é inferior a cerca de 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, e 2%. Em outras modalidades mais, o oxigênio está presente em uma quantidade que é inferior a cerca de 1% em  
25 volume. Em modalidades adicionais, o oxigênio está presente entre cerca de 1% e cerca de 15% em volume. Em outras modalidades ainda, o oxigênio está presente entre cerca de 5% e cerca de 15% em volume.

Em outras modalidades, a composição de isopreno  
30 gasoso compreende adicionalmente nitrogênio. Em algumas

modalidades, o nitrogênio está presente em uma quantidade entre cerca de 50% e cerca de 75% em volume. Em modalidades adicionais, o nitrogênio está presente em uma quantidade que é superior a cerca de 70%. Em outras modalidades, o  
5 nitrogênio está presente em uma quantidade que é superior a cerca de 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, e 80%.

Em outras modalidades, a composição de isopreno gasoso compreende adicionalmente argônio. Em algumas modalidades, o argônio está presente em uma quantidade que  
10 é inferior a cerca de 0,9% em volume. Em outras modalidades, o argônio está presente em uma quantidade que é inferior a cerca de 1,0% em volume.

Em outras modalidades, a composição de isopreno gasoso compreende adicionalmente etanol. Em algumas  
15 modalidades, o etanol está presente em uma quantidade que é inferior a cerca de 0,5% em volume. Em outras modalidades, o etanol está presente em uma quantidade que é superior a cerca de 1% em volume.

Em outras modalidades, a composição de isopreno  
20 gasoso de origem microbiana pode compreender: isopreno em uma quantidade entre cerca de 0,1% e cerca de 15% em volume; água em uma quantidade que é superior a cerca de 70% de sua quantidade de saturação; dióxido de carbono em uma quantidade que está entre cerca de 0,04% e cerca de 35%  
25 em volume; oxigênio em uma quantidade que está entre cerca de 1% e cerca de 20% em volume; nitrogênio em uma quantidade que é superior a cerca de 50% em volume; argônio em uma quantidade que é inferior a cerca de 0,9% em volume; etanol em uma quantidade que é inferior a cerca de 0,5% em  
30 volume; um montante igual ou inferior a 1 parte por milhão

de alcinos  $C_2-C_5$ ; um montante igual ou inferior a 1 parte por milhão de ciclopentadieno; um montante igual ou inferior a 1 parte por milhão de piperileno; e um montante igual ou inferior a 1 parte por milhão de 1,4-pentadieno.

5               Em outras modalidades, a composição de isopreno gasoso de origem microbiana pode compreender: isopreno em uma quantidade entre cerca de 0,1% e cerca de 15% em volume; água em uma quantidade que é superior a cerca de 70% de sua quantidade de saturação; dióxido de carbono em  
10 uma quantidade que está entre cerca de 0,04% e cerca de 35% em volume; oxigênio em uma quantidade que está entre cerca de 1% e cerca de 20% em volume; nitrogênio em uma quantidade que é superior a cerca de 50% em volume; argônio em uma quantidade que é superior a cerca de 1.0% em volume;  
15 etanol em uma quantidade que é superior a cerca de 1% em volume; um montante igual ou inferior a 1 parte por milhão de alcinos  $C_2-C_5$ ; um montante igual ou inferior a 1 parte por milhão de ciclopentadieno; um montante igual ou inferior a 1 parte por milhão de piperileno; e um montante  
20 igual ou inferior a 1 parte por milhão de 1,4-pentadieno.

Em determinadas outras modalidades, é fornecida outra composição de isopreno gasoso. Esta composição compreende:

- a. isopreno em uma quantidade entre cerca de 0,1%  
25 e 15% em volume;
- b. dióxido de carbono em uma quantidade entre cerca de 1% e 35% em volume; e,
- c. água em uma quantidade que é superior a cerca de 70% de sua quantidade de saturação e em que a composição  
30 de isopreno gasoso compreende um montante igual ou inferior

a 1 parte por milhão de alcinos  $C_2-C_5$ . Em outras modalidades, a composição de isopreno gasoso compreende um montante igual ou inferior a 1 parte por milhão de cada um dos seguintes alcinos  $C_2-C_5$ , ciclopentadieno, piperileno, e 1,4-pentadieno. Em outras modalidades mais, a composição de isopreno gasoso compreende água saturada. Em outras modalidades ainda, a composição de isopreno gasoso compreende adicionalmente oxigênio em uma quantidade entre cerca de 8% e cerca de 15% em volume ou nitrogênio em uma quantidade entre cerca de 50% e 75% em volume ou ambos.

A temperatura das composições gasosas descritas acima é ao menos  $30^{\circ}C$ . Em alguns casos, a temperatura está entre cerca de  $30^{\circ}C$  e cerca de  $60^{\circ}C$ . Em outros casos, a temperatura está entre cerca de  $30^{\circ}C$  e cerca de  $38^{\circ}C$ .

A pressão das composições gasosas descritas acima está entre cerca de 1 e cerca de 2,5 atmosferas.

Para algumas das composições gasosas descritas acima, a temperatura está entre cerca de  $30^{\circ}C$  e cerca de  $35^{\circ}C$  e está a uma pressão entre cerca de 1 e cerca de 2,5 atmosferas.

#### Composições de Isopreno Líquido de Origem Microbiana

Empregando os métodos aqui descritos, as composições de isopreno gasoso da presente invenção podem ser adicionalmente purificadas ao isopreno líquido. Portanto, em outro aspecto da invenção, é fornecida uma composição de isopreno líquido que resulta dos métodos inventivos. A composição de isopreno líquido resultante compreende ao menos 65% de isopreno em peso e a composição de isopreno líquido compreende um montante igual ou

inferior a 1 parte por milhão de alcinos  $C_2-C_5$ , ciclopentadieno, piperileno, e 1,4-pentadieno.

Em algumas modalidades, a composição de isopreno líquido compreende ao menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, e 5 90% de isopreno em peso. Em outras modalidades, o isopreno líquido compreende ao menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98%, 99% e 99,5% de isopreno em peso. Em outras modalidades mais, a composição de isopreno líquido compreende isopreno em uma quantidade que é superior a cerca de 99,5% em peso.

10 Em outras modalidades, a composição de isopreno líquido compreende adicionalmente dióxido de carbono. Em algumas modalidades, o dióxido de carbono está presente em uma quantidade que está entre cerca de 0,01% em peso e cerca de 1% em peso. Em outras modalidades, o dióxido de 15 carbono está presente em uma quantidade que está entre cerca de 0,05% e cerca de 1% em peso. Em modalidades adicionais, o dióxido de carbono está presente em uma quantidade que está entre cerca de 0,1% e cerca de 1% em peso. Em outras modalidades ainda, o dióxido de carbono 20 está presente em uma quantidade que está entre cerca de 0,2% e cerca de 0,7% em peso.

Em outras modalidades, a composição de isopreno líquido compreende adicionalmente nitrogênio. Em algumas modalidades, o nitrogênio está presente em uma quantidade 25 que está entre cerca de 0,001% em peso e cerca de 1% em peso. Em outras modalidades, o dióxido de carbono está presente em uma quantidade que está entre cerca de 0,01% e cerca de 0,5% em peso. Em modalidades adicionais, o dióxido de carbono está presente em uma quantidade que está entre 30 cerca de 0,05% e cerca de 0,5% em peso.

Em outras modalidades, a composição de isopreno líquido compreende adicionalmente etanol. Em algumas modalidades, o etanol está presente em uma quantidade que é superior a cerca de 0,01% em peso. Em outras modalidades, o etanol está presente em uma quantidade que é superior a cerca de 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, e 0,9% em peso. Em modalidades adicionais, o etanol está presente em uma quantidade que é superior a cerca de 1% em peso.

Em outras modalidades, a composição de isopreno líquido pode compreender água em uma quantidade que é inferior a cerca de 1%, 0,5%, 0,1%, e 0,05% em peso. Em outras modalidades, a composição de isopreno líquido pode compreender água em uma quantidade que é inferior a cerca de 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, e 50 ppm em peso. Em outras modalidades, a composição de isopreno líquido pode compreender água em uma quantidade, em peso, que está abaixo do nível de detecção.

Em outras modalidades, a composição de isopreno líquido de origem microbiana pode compreender: isopreno em uma quantidade de ao menos cerca de 65% até uma quantidade superior a cerca de 99,5% em peso; dióxido de carbono em uma quantidade que está entre cerca de 0,01% e cerca de 1% em peso; nitrogênio em uma quantidade que está entre cerca de 0,001% e cerca de 1% em peso; etanol em uma quantidade superior a cerca de 0,01% até uma quantidade superior a cerca de 1% em peso; água em uma quantidade que é inferior a cerca de 1% em peso até uma quantidade que está abaixo do nível de detecção; alcinos C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> em uma quantidade igual ou inferior a 1 parte por milhão; ciclopentadieno em uma

quantidade igual ou inferior a 1 parte por milhão; piperileno em uma quantidade igual ou inferior a 1 parte por milhão; e 1,4-pentadieno em uma quantidade igual ou inferior a 1 parte por milhão.

5           Em determinadas outras modalidades, outra composição de isopreno líquido é fornecida. Esta composição compreende:

a. isopreno em uma quantidade superior a cerca de 65% em peso;

10           b. etanol em uma quantidade superior a cerca de 0,01% em peso; e,

c. dióxido de carbono em uma quantidade entre cerca de 0,01% e cerca de 1% em peso em que a composição de isopreno líquido compreende um montante igual ou inferior a  
15 1 parte por milhão de alcinos  $C_2-C_5$ , ciclopentadieno e piperileno alcinos  $C_2-C_5$ . Em algumas modalidades, o isopreno está presente em uma quantidade superior a cerca de 85% em peso; Em outras modalidades mais, o isopreno está presente em uma quantidade superior a cerca de 90% em peso.  
20 Em modalidades adicionais, o isopreno está presente em uma quantidade superior a cerca de 90% em peso e etanol está presente em uma quantidade que está entre cerca de 0,01% e cerca de 1% em peso.

Para algumas das composições de isopreno líquido  
25 descritas acima, as composições tem uma temperatura abaixo de  $-35^{\circ}\text{C}$  e a pressão entre 0,01 e cerca de 2 atmosferas. Em outras modalidades, as composições têm uma temperatura entre  $-45^{\circ}\text{C}$  e cerca de  $-85^{\circ}\text{C}$  e a pressão abaixo cerca de 1 atmosfera. Em mais modalidades ainda, as composições têm

uma temperatura abaixo -45°C e uma pressão abaixo cerca de 0,5 atmosfera.

### Células Hospedeiras Microbianas

Quaisquer células hospedeiras microbianas capazes  
5 de produzir isopreno podem ser utilizadas nos presentes métodos, as quais resultariam nas composições de isopreno da invenção.

Exemplos ilustrativos de células hospedeiras adequadas são micróbios que demonstraram fabricar o  
10 isopreno naturalmente. Essas cepas incluem aquelas descritas na Patente N° U.S. 5.849,970 e incluem: *Bacillus amyloliquiefaciens*; *Bacillus cereus*; *Bacillus subtilis* 6051; *Basillus substillis* 23059; *Bacillus subtilis* 23856; *Micrococcus luteus*; *Rhococcus rhodochrous*; *Acinetobacter*  
15 *calcoacetiucus*; *Agrobacterium rhizogenes*; *Escherichia coli*; *Erwinia herbicola*; *Pseudomonas aeruginosa*; e *Psuedomonas citronellolis*. No entanto, os micróbios que fabricam isopreno naturalmente são produzidos em níveis extremamente baixos.

20 O isopreno é fabricado a partir de pirofosfato de isopentenila (IPP) através da isopreno sintase. Como todas as células hospedeiras microbianas são capazes de fabricar o IPP, quaisquer células hospedeiras podem ser fabricadas para a fabricação do isopreno através da inserção da  
25 isopreno sintase em seu genoma. Exemplos ilustrativos das sequências de nucleotídeo adequadas incluem, entre outras, : (EF638224, *Populus alba*); (AJ294819, *Populus alba* x *Populus tremula*); (AM410988, *Populus nigra*); (AY341431, *Populus tremuloides*); (EF147555, *Populus trichocarpa*); e (AY316691,  
30 *Pueraria montana* var. *lobata*). A adição de uma isopreno

sintase heteróloga às células hospedeiras microbianas que fabricam o isopreno naturalmente aperfeiçoarão também os rendimentos dos produtores de isopreno natural.

Qualquer célula hospedeira microbiana adequada  
 5 pode ser geneticamente modificada para fabricar o isopreno. Uma célula hospedeira geneticamente modificada é aquela em que as moléculas de ácido nucléico foram inseridas, excluídas ou modificadas (isto é, mutadas; por exemplo, por inserção, deleção, substituição, e/ou inversão de  
 10 nucleotídeos), para produzir isopreno. Exemplos ilustrativos de células hospedeiras adequadas incluem qualquer célula de Archae, bacteriana, ou eucariótica. Exemplos de células Archae incluem, sem fins limitantes, aquelas pertencentes aos gêneros: *Aeropyrum*, *Archaeoglobus*,  
 15 *Halobacterium*, *Methanococcus*, *Methanobacterium*, *Pirococcus*, *Sulfolobus*, e *Thermoplasma*. Exemplos ilustrativos de espécies de Archae incluem, sem fins limitantes: *Aeropyrum* *pernix*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Pirococcus abyssi*,  
 20 *Pirococcus horikoshii*, *Thermoplasma acidophilum*, *Thermoplasma volcanium*.

Exemplos de células bacterianas incluem, sem fins limitantes aquelas pertencentes aos gêneros: *Agrobacterium*, *Alicyclobacillus*, *Anabaena*, *Anacystis*, *Arthrobacter*,  
 25 *Azobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Chromatium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Mesorhizobium*, *Metilobacterium*, *Microbacterium*, *Phormidium*, *Pseudomonas*, *Rhoddbacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodococcus*,

*Salmonella*, *Scenedesmun*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphlococcus*, *Streptomyces*, *Synnecoccus*, e *Zymomonas*.

Exemplos espécies bacterianas incluem, sem fins limitantes: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefacines*,  
 5 *Brevibacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium immariophilum*,  
*Clostridium beigerinckii*, *Enterobacter sakazakii*,  
*Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Mesorhizobium loti*,  
*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mevalonii*, *Pseudomonas*  
*pudica*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*,  
 10 *Rhodospirillum rubrum*, *Salmonella enterica*, *Salmonella*  
*typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*,  
*Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*,  
 e outras similares.

De modo geral, se uma célula hospedeira  
 15 bacteriana for utilizada, é preferencial que seja uma cepa  
 não patogênica. Exemplos ilustrativos de espécies com cepas  
 não patogênicas incluem, sem fins limitantes: *Bacillus*  
*subtilis*, *Escherichia coli*, *Lactibacillus acidophilus*,  
*Lactobacillus helveticus*, *Pseudomonas aeruginosa*,  
 20 *Pseudomonas mevalonii*, *Pseudomonas pudita*, *Rhodobacter*  
*sphaeroides*, *Rodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum*,  
 e outras similares.

Exemplos de células eucarióticas incluem, sem  
 fins limitantes, células fúngicas. Exemplos de células  
 25 fúngicas incluem, sem fins limitantes aquelas pertencentes  
 aos gêneros: *Aspergillus*, *Candida*, *Chrysosporium*,  
*Cryotococcus*, *Fusarium*, *Kluyveromyces*, *Neotyphodium*,  
*Neurospora*, *Penicillium*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Trichoderma*  
 e *Xanthophyllomyces* (anteriormente *Phaffia*).

Exemplos ilustrativos de células eucarióticas incluem, sem fins limitantes: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida albicans*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium*  
 5 *venenatum*, *Kluyveromyces lactis*, *Neurospora crassa*, *Pichia angusta*, *Pichia finlandica*, *Pichia kodamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia metanolica*, *Pichia opuntiae*, *Pichia pastoris*, *Pichia pijperi*, *Pichia quercuum*, *Pichia salictaria*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia trehalophila*,  
 10 *Pichia stipitis*, *Streptomyces ambofaciens*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces aureus*, *Saccaromyces bayanus*, *Saccaromyces boulandi*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces fungicidicus*, *Streptomyces griseochromogenes*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces*  
 15 *olivogriseus*, *Streptomyces rameus*, *Streptomyces tanashiensis*, *Streptomyces vinaceus*, *Trichoderma reesei* e *Xanthophyllomyces dendrorhous* (anteriormente *Phaffia rhodozyma*).

De modo geral, se uma célula eucariótica for  
 20 utilizada, é preferível que seja uma cepa não patogênica. Exemplos ilustrativos de espécies com cepas não patogênicas incluem, sem fins limitantes: *Fusarium graminearum*, *Fusarium venenatum*, *Pichia pastoris*, *Saccaromyces boulandi*, e *Saccaromyces cerevisiae*.

25 Em algumas modalidades, as células hospedeiras da presente invenção foram designadas pela Food and Drug Administration como GRAS ou Geralmente Consideradas Seguras. Exemplos ilustrativos de tais cepas incluem: *Bacillus subtilis*, *Lactibacillus acidophilus*, *Lactobacillus*  
 30 *helveticus*, e *Saccharomyces cerevisiae*.

Além do ácido nucléico heterólogo que encodifica uma isopreno sintase, a célula hospedeira microbiana pode ser ainda modificada para aumentar os rendimentos de isopreno. Essas modificações incluem, entre outras, a  
 5 expressão de uma ou mais moléculas do ácido nucléico heterólogo que encodifica uma ou mais enzimas na via do mevalonato ou via do DXPs.

#### Via MEV

Uma representação esquemática da via NEV é  
 10 descrita na Figura 3. Em termos gerais, a via compreende seis etapas.

Na primeira etapa, duas moléculas de acetil-coenzima A são enzimaticamente combinadas para formar acetoacetil-CoA. Uma enzima conhecida por catalisar esta  
 15 etapa, por exemplo, é a acetil-CoA tiolase (também denominada acetil-CoA acetiltransferase). Exemplos ilustrativos das sequências de nucleotídeo incluem, sem contudo limitar-se a, os números de acesso do GenBank a seguir e o organismo do qual as sequências derivaram: (NC  
 20 000913 REGION: 2324131..2325315; *Escherichia coli*), (D49362; *Paracoccus denitrificans*), e (L20428; *Saccharomyces cerevisiae*).

Na segunda etapa da via do MEV, acetoacetil-CoA é enzimaticamente condensado com outra molécula de acetil-CoA  
 25 para formar 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, HMG-CoA sintase. Exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem, mas não estão limitadas a: (NC\_001145. complemento 19061..20536; *Saccharomyces cerevisiae*),  
 30 (X96617; *Saccharomyces cerevisiae*), (X83882; *Arabidopsis*

*thaliana*), (AB037907; *Kitasatospora griseola*), (BT007302; *Homo sapiens*), e (NC\_002758, Locus tag SAV2546, GeneID 1122571; *Staphylococcus aureus*).

Na terceira etapa, HMG-CoA é enzimaticamente  
 5 convertido em mevalonato. Uma enzima conhecida por  
 catalisar esta etapa é, por exemplo, HMG-CoA reductase.  
 Exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem,  
 mas não estão limitados a: (NM 206548; *Drosophila*  
*melanogaster*), (NC\_002758, Locus tag SAV2545, GeneID  
 10 1122570; *Staphylococcus aureus*), (NM\_204485; *Gallus*  
*gallus*), (AB01 5627; *Streptomyces* sp. KO 3988), (AF542543;  
*Nicotiana attenuata*), (AB037907; *Kitasatospora griseola*),  
 (AX128213, ao fornecer a encodificação de sequência de um  
 HMGR truncado; *Saccharomyces cerevisiae*), e (NC\_001 145:  
 15 complemento (115734..118898; *Saccharomyces cerevisiae*).

Na quarta etapa, o mevalonato é enzimaticamente  
 fosforilado para formar mevalonato 5-fosfato. Uma enzima  
 conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo,  
 mevalonato quinase. Exemplos ilustrativos de sequências de  
 20 nucleotídeo incluem, mas não estão limitados a: (L77688;  
*Arabidopsis thaliana*), e (X55875; *Saccharomyces*  
*cerevisiae*).

Na quinta etapa, um segundo grupo fosfato é  
 enzimaticamente adicionado ao mevalonato 5-fosfato para  
 25 formar mevalonato 5-pirofosfato. Uma enzima conhecida por  
 catalisar esta etapa é, por exemplo, fosfomevalonato  
 quinase. Exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo  
 incluem, mas não estão limitados a: (AF429385; *Hevea*  
*brasiliensis*), (NM\_006556; *Homo sapiens*), e (NC\_001145.  
 30 complemento 712315..713670; *Saccharomyces cerevisiae*).

Na sexta etapa, o mevalonato 5-pirofosfato é enzimaticamente convertido em IPP. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, mevalonato pirofosfato descarboxilase. Exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem, mas não estão limitados a: (X97557; *Saccharomyces cerevisiae*), (AF290095; *Enterococcus faecium*), e (U49260; *Homo sapiens*).

#### Via de DXP

Uma representação esquemática da via de DXP é descrito na Figura 4. Em general, a via de DXP compreende sete etapas. Na primeira etapa, o piruvato é condensado com D-gliceraldeído 3-fosfato para produzir 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase. Exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem, mas não estão limitados a: (AF035440; *Escherichia coli*), (NC 002947, locus tag PP0527; *Pseudomonas putida* KT2440), (CP000026, locus tag SPA2301; *Salmonella enterica Paratyphi*, ver ATCC 9150), (NC\_007493, locus tag RSP\_0254; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1), (NC\_005296, locus tag RPA0952; *Rhodopseudomonas palustris* CGA009), (NC 004556, locus tag PD1293; *Xylella fastidiosa* Temeculal), e (NC\_003076, locus tag AT5G11380; *Arabidopsis thaliana*).

Na segunda etapa, 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato é convertido em 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato reductoisomerase. Exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem, mas não estão limitados a: (ABO 13300; *Escherichia coli*), (AF 148852; *Arabidopsis thaliana*), (NC\_002947, locus tag PP

1597; *Pseudomonas putida* KT2440), (AL939124, locus tag SC05694; *Streptomyces coelicolor* A3(2)), (NC 007493, locus tag RSP\_2709; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1), e (NC\_007492, locus tag PFI\_1107; *Streptomyces coelicolor* PfO-1).

5           Na terceira etapa, 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato é convertido em 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintase. Exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem, mas não  
10       estão limitados a: (AF230736; *Escherichia coli*), (NC\_007493, locus tag RSP\_2835; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1), (NC\_003071, locus tag AT2G02500; *Arabidopsis thaliana*), e (NC\_002947, locus tag PP1614; *Pseudomonas putida* KT2440).

15           Na quarta etapa, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol é convertido em 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol quinase. Exemplos ilustrativos de sequências de  
20       nucleotídeo incluem, mas não estão limitados a: (AF216300; *Escherichia coli*) e (NC\_007493, locus tag RSP\_1779; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1).

          Na quinta etapa, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato é convertido em 2C-metil-D-eritritol  
25       2,4-ciclodifosfato. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, 2C-metil-D-eritritol 2, 4-ciclodifosfato sintase. Exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem, mas não estão limitados a: (AF230738; *Escherichia coli*), (NC\_007493, locus tag RSP

6071; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1), e (NC\_002947, locus tag PP1618; *Pseudomonas putida* KT2440).

Na sexta etapa, 2C-metil-D-eritritol 2, 4-ciclodifosfato é convertido em 1-hidróxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, 1-hidróxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato sintase. Exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem, mas não estão limitados a: (AY033515; *Escherichia coli*), (NC\_002947, locus tag PP0853; *Pseudomonas putida* KT2440), e (NC\_007493, locus tag RSP\_2982; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1).

Na sétima etapa, 1-hidróxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato é convertido em IPP ou em seu isômero, DMAPP. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, isopentil/dimetilalil difosfato sintase. Exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem, mas não estão limitados a: (AY062212; *Escherichia coli*) e (NC\_002947, locus tag PP0606; *Pseudomonas putida* KT2440).

Em algumas modalidades, "troca de sinais" (ou interferência) entre os próprios processos metabólicos da célula hospedeira e aqueles processos envolvidos com a produção de IPP como fornecido pela presente invenção são totalmente minimizados ou eliminados. Por exemplo, a troca de sinais é totalmente minimizada ou eliminada quando o microrganismo hospedeiro conta exclusivamente com a via de DXP para sintetizar IPP, e uma via do MEV é introduzida para fornecer IPP adicional. Tais organismos hospedeiros não seriam equipados para alterar a expressão das enzimas de via do MEV ou processar os intermediários associados com a via do MEV. Os organismos que contam exclusivamente ou

predominantemente com a via de DXP incluem, por exemplo, *Escherichia coli*.

Em algumas modalidades, a célula hospedeira produz IPP pela via do MEV, seja exclusivamente ou em  
5 combinação com a via de DXP. Em outras modalidades, uma via de DXP hospedeira é funcionalmente incapacitada tal que a célula hospedeira produz IPP exclusivamente através de um via do MEV heterologamente introduzida. A via de DXP pode ser funcionalmente incapacitada ao incapacitar a expressão  
10 de gene ou ao neutralizar a função de uma ou mais das enzimas de via de DXP que ocorrem naturalmente.

Em outras modalidades, a célula hospedeira produz IPP por meio da via de DXP, seja exclusivamente ou em  
combinação com a via do MEV. Em outras modalidades, uma via  
15 do MEV hospedeira é funcionalmente incapacitada tal que a célula hospedeira produz IPP exclusivamente através de uma via de DXP heterologamente introduzida. A via do MEV pode ser funcionalmente incapacitada ao incapacitar expressão de gene ou ao neutralizar a função uma ou mais das enzimas de  
20 via de DXP que ocorrem naturalmente.

Os métodos para modificar geneticamente organismos hospedeiros e sua cultura foram previamente descrita. Exemplos ilustrativos incluem Patentes dos Estados Unidos nº 6.689.593; 7.172.886; 7.183.089;  
25 Publicação de Patente dos Estados Unidos nº US 2008/0171378; US 2008/0274523; e US 2009/0203102 e Publicações PCT nº WO 2007/139924; WO 2009/076676; WO 2010/003007; e WO 2009/132220, que são todas incorporadas a esta invenção por referência integralmente. Métodos  
30 adicionais para modificar organismos hospedeiros para

produzir isoprene são também fornecidos nos Exemplos abaixo.

Purificação e Recuperação de Isoprene Gasoso Derivado Microbialmente

5           A presente invenção fornece métodos para lidar com uma composição de isoprene gasoso produzido a partir das células microbianas hospedeiras. Quando as composições de isoprene gasoso resultantes ou as composições de isoprene gasoso descritas acima são tratadas com os  
10 seguintes métodos, então os resultados são as composições de isoprene líquido descritas acima.

Em um aspecto, um sistema para purificar isoprene sem destilação extrativa é fornecido. A destilação extrativa é definida como destilação na presença de um  
15 solvente que formam no azeótropo com outros componentes na mistura e é utilizada para separar misturas que não podem ser separadas por destilação simples devido à volatilidade de pelo menos dois dos componentes na mistura ser quase a mesma, fazendo com que evaporem praticamente na mesma  
20 temperatura em uma taxa similar. Em geral miscível, com alto ponto de ebulição, e relativamente não-volátil, o solvente de destilação de extração interage diferentemente com os componentes na mistura, permitindo que a mistura seja separada por destilação normal. A destilação extrativa  
25 é quase sempre utilizada para purificar isoprene derivado de petróleo. Uma vez que a destilação extrativa exige equipamento especial e requer inerentemente grande energia, é parte substancial dos custos associados com a produção de isoprene. Em muitas modalidades da presente invenção, as  
30 composições de isoprene resultantes não incluem quantidades

vestigiais de uma solvente de destilação de extração porque os solventes de destilação extrativa não são utilizados. Exemplos ilustrativos de tais solventes incluem, mas não estão limitados a acetonitrila e dimetilformamida.

5           A Figura 1 é uma representação esquemática de um sistema exemplificativo de separação. As células hospedeiras são cultivadas em um biorreator e o isoprene produzido pelas células vaporiza e forma uma composição de isoprene gasoso (1). De forma opcional, a composição de  
10 isoprene gasoso pode passar através de um processo de secagem para remover parte do vapor d'água (não mostrado). A composição de isoprene gasoso (1) é direcionada para um primeiro resfriador 102 que resfria a composição de isoprene gasoso até uma temperatura entre cerca de 10°C e  
15 cerca de -15°C. A composição de isoprene gasoso resfriada (7) então passa através de tambor 104, onde o vapor d'água na composição de isoprene gasoso se condensa em um líquido e é descarregado do processo (5). A composição de isoprene gasoso (8) de saída pode passar através de um processo de  
20 secagem para remover qualquer água remanescente (não mostrado). A composição de isoprene gasoso (8) é direcionada para um segundo resfriador 106 resfriando ainda mais a composição até uma temperatura abaixo de -35°C. A composição de isoprene líquido (9) resultante flui para o  
25 tambor 108. De forma opcional, a corrente de fundo (10) do tambor 108 pode então ser passada para o separador de nitrogênio 110 enquanto a corrente de topo (11) é reciclada de volta ao primeiro resfriador 102 para ajudar em (ou para servir como um refrigerante para) resfriar isoprene gasoso  
30 (1) que chega e então liberar uma corrente de subproduto

(6). O nitrogênio substancialmente puro (2) é introduzido no separador de nitrogênio 110 pelo qual a composição de isoprene líquido (3) é recuperada e o subproduto de gás de nitrogênio (4) pode ser descarregado ou recuperado em uma  
5 subsequente etapa de recuperação (não mostrada).

Em outra modalidade, o sistema compreende:

- a. um biorreator capaz de cultivar uma pluralidade de células hospedeiras, preferivelmente o biorreator tem um capacidade maior do que 100 litros;
- 10 b. um primeiro resfriador e tambor de vaporização operavelmente conectados à corrente suspensa do biorreator, o primeiro resfriador preferivelmente capaz de operar em uma faixa de temperatura entre 10°C e -15°C;
- c. um segundo resfriador e tambor de vaporização  
15 operavelmente conectados à corrente suspensa que deixa o primeiro resfriador e tambor de vaporização, o segundo resfriador preferivelmente capaz de operar em uma temperatura abaixo de -35°C, por exemplo, entre cerca de -65°C e cerca de -85°C;
- 20 d. de forma opcional, a corrente suspensa que deixa o segundo resfriador e tambor de vaporização pode ser operavelmente conectada à entrada do refrigerante ou corrente de resfriamento do primeiro resfriador; e
- e. de forma opcional, a corrente condensado que  
25 deixa o segundo resfriador e tambor de vaporização pode ser operavelmente conectada a um separador de nitrogênio.

Em outro aspecto, o método para recuperar isoprene ao utilizar tal um sistema é fornecido. O método compreende:

a. obter uma primeira composição gasosa que compreende isoprene e água em que a composição gasosa compreende 1 parte por milhão ou menos de  $C_2-C_3$  alcinos;

b. fluir a primeira composição gasosa através de um primeiro resfriador em que o primeiro resfriador tem uma temperatura entre cerca de  $10^{\circ}C$  e cerca de  $-15^{\circ}C$ , com isso resultando em uma segunda composição gasosa e em que a segunda composição gasosa compreende menos água do que a primeira composição gasosa, por exemplo a segunda composição de gás compreende cerca de 3% por peso ou menos de água;

c. fluir a segunda composição gasosa através de um segundo resfriador em que o segundo resfriador tem uma temperatura abaixo de  $-35^{\circ}C$ ; e

d. coletar a composição de isoprene líquido resultante.

Em outras modalidades, o método para recuperar isoprene compreende reduzir o teor de água presente na primeira composição gasosa ao fluir a primeira composição gasosa através de um primeiro resfriador em que o primeiro resfriador tem uma temperatura entre cerca de  $10^{\circ}C$  e cerca de  $-15^{\circ}C$ , com isso resultando em uma segunda composição gasosa e em que a segunda composição gasosa compreende menos água do que a primeira composição gasosa, por exemplo a segunda composição de gás compreende menos do que cerca de 3% por peso de água. Em outras modalidades, a segunda composição de gás compreende menos do que cerca de 2% por peso de água, menos do que 1%, 0,5%, 0,1%, e 0,05% por peso. Em outras modalidades, a segunda composição de gás

compreende menos do que cerca de 500 ppm por peso de água, menos do que 250 ppm, 100 ppm e 50 ppm por peso.

Em outro aspecto, o método para recuperar isoprene ao utilizar tal sistema é fornecido. O método  
5 compreende:

a. obter uma primeira composição gasosa que compreende isoprene e água em que a composição gasosa compreende 1 parte por milhão ou menos de  $C_2-C_5$  alcinos;

b. fluir a primeira composição gasosa através de  
10 um primeiro resfriador em que o primeiro resfriador tem uma temperatura entre cerca de  $10^{\circ}C$  e cerca de  $-15^{\circ}C$ , com isso resultando em uma segunda composição gasosa e em que a segunda composição gasosa compreende menos água do que a primeira composição gasosa, por exemplo a segunda  
15 composição de gás compreende cerca de 3% por peso ou menos de água;

c. fluir a segunda composição gasosa através de um segundo resfriador em que o segundo resfriador tem uma temperatura abaixo de  $-35^{\circ}C$  com isso resultando em uma  
20 composição de isoprene líquido, em que a composição de isoprene líquido compreende menos de um ou mais dos seguintes componentes do que a segunda composição gasosa, que compreende:

i. água em quantidade menor do que cerca de  
25 1% por peso ou menos;

ii. dióxido de carbono em quantidade menor do que 1% por peso;

iii. nitrogênio em quantidade menor do que 1% por peso; e

d. coletar a composição de isoprene líquido resultante.

Em algumas modalidades, o método compreende ainda separação de nitrogênio da composição de isoprene líquido.

5 Esta separação de nitrogênio pode ser executada por qualquer método adequado incluindo passar um corrente de nitrogênio substancialmente pura através da composição enriquecida de isoprene líquido. Esta corrente de nitrogênio serve para remover adicionalmente gases  
10 dissolvidos (tal, como por exemplo, oxigênio, dióxido de carbono, nitrogênio, e argônio) e ou/água remanescente. Em outras modalidades, a separação de nitrogênio da composição de isoprene líquido pode compreender remover: oxigênio dissolvido a níveis menores do que cerca de 1%, 0,5%, 0,1%,  
15 e 0,05% por peso; dióxido de carbono dissolvido a níveis menores do que cerca de 1%, 0,5%, 0,1%, e 0,05% por peso; nitrogênio dissolvido a níveis menores do que cerca de 1%, 0,5%, 0,1%, e 0,05% por peso; argônio dissolvido a níveis menores do que cerca de 1%, 0,5%, 0,1%, e 0,05% por peso; e  
20 qualquer água remanescente a níveis menores do que cerca de 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% por peso a níveis menores do que o nível de detecção.

Em algumas modalidades, o método compreende ainda extrair impurezas de hidrocarboneto em algum ponto no  
25 processo de purificação de isoprene. Esta extração de hidrocarboneto pode ser executada ao passar uma porção ou toda a primeira composição gasosa, a segunda composição gasosa e/ou a composição de isoprene líquido por ou através de uma membrana de zeólito modificada e/ou peneira  
30 molecular. A membrana de zeólito e/ou peneiras moleculares

pode ser modificada adsorver seletivamente apenas isoprene e não os outros hidrocarbonetos presentes na composição tratada ou vice-versa (adsorver outros hidrocarbonetos na composição tratada e não isoprene). Em algumas modalidades, 5 os zeólitos e/ou peneiras moleculares são modificados por carbonização para fornecer a adsorvidade selecionada. Em algumas modalidades, os zeólitos podem ser tipo-L, tipo-Y, ZSM-5, e/ou tipo-beta. Em algumas modalidades um método para aprimorar a seletividade de um zeólito por 10 carbonização controlada como detalhado na Patente dos Estados Unidos nº 7.041.616, que é incorporada aqui integralmente por referência, pode ser utilizado.

Em outras modalidades, a primeira composição gasosa compreende ainda dióxido de carbono. Ainda em outras 15 modalidades, a primeira composição gasosa compreende ainda oxigênio. Ainda em outras modalidades, a primeira composição gasosa compreende ainda nitrogênio.

Em outras modalidades, a primeira composição gasosa compreende 1 parte por milhão ou menos de  $C_2-C_5$  alcinos e ciclopentadieno, Em modalidades adicionais, a 20 primeira composição gasosa compreende ainda 1 parte por milhão ou menos de  $C_2-C_5$  alcinos e piperileno. Ainda em outras modalidades, a primeira composição gasosa compreende 1 parte por milhão ou menos de  $C_2-C_5$  alcinos e 1,4- 25 pentadieno. Ainda em outras modalidades, a primeira composição gasosa compreende 1 parte por milhão ou menos de  $C_2-C_5$  alcinos, ciclopentadieno, piperileno, e 1,4-pentadieno.

Em outras modalidades, a primeira composição 30 gasosa é fluída através de um secador antes de fluir

através do primeiro resfriador. Ainda em outras modalidades, a primeira composição gasosa é fluída através de um secador após fluir através do primeiro resfriador, mas antes de fluir através do segundo resfriador.

5           Em outras modalidades, o primeiro resfriador tem uma temperatura de cerca de  $-5^{\circ}\text{C}$ .

          Em outras modalidades, o primeiro resfriador é resfriado ao utilizar um sistema de refrigeração de propileno. Ainda em outras modalidades, o primeiro  
10 resfriador é resfriado ao utilizar um sistema de refrigeração de amônio.

          Em outras modalidades, o segundo resfriador tem uma temperatura menos do que cerca de  $-50^{\circ}\text{C}$ . Em outras modalidades, o segundo resfriador tem uma temperatura de  
15 cerca de  $-60^{\circ}\text{C}$  a cerca de  $-85^{\circ}\text{C}$ . Ainda em outras modalidades, o segundo resfriador tem uma temperatura de menos do que cerca de  $-65^{\circ}\text{C}$ . Ainda em outras modalidades, o segundo resfriador tem uma temperatura entre cerca de  $-35^{\circ}\text{C}$  e cerca de  $-85^{\circ}\text{C}$ .

20           Em outras modalidades, a composição de isoprene líquido compreende pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, e 90% isoprene por peso. Em outras modalidades, o isoprene líquido compreende pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98%, 99% e 99,5% isoprene por peso. Ainda em outras modalidades,  
25 a composição de isoprene líquido compreende isoprene em uma quantidade que é maior do que cerca de 99,5% por peso.

          Em outras modalidades, o segundo resfriador é resfriado ao utilizar um sistema de refrigeração de etileno.

Em outro aspecto, outro método é fornecido. O método compreende:

- a. cultivar uma pluralidade de células hospedeiras capaz de produzir isoprene;
- 5 b. formar uma primeira composição gasosa que compreende isoprene e água em que a água está presente em uma quantidade maior do que cerca de 70% de sua quantidade de saturação;
- c. expor a primeira composição gasosa a uma  
10 primeira etapa de resfriamento pela qual substancialmente toda a água é removida a partir da primeira composição gasosa resultando em uma segunda composição gasosa;
- d. expor a segunda composição gasosa a uma  
segunda etapa resfriamento pela qual uma composição de  
15 isoprene líquido é coletada.

Em algumas modalidades, o método compreende ainda separação de nitrogênio da composição de isoprene líquido.

Em outras modalidades, a primeira composição gasosa compreende ainda dióxido de carbono. Ainda em outras  
20 modalidades, a primeira composição gasosa compreende ainda oxigênio. Ainda em outras modalidades, a primeira composição gasosa compreende ainda nitrogênio.

Em outras modalidades, a primeira composição gasosa compreende 1 parte por milhão ou menos de  $C_2-C_5$   
25 alcinos e ciclopentadieno. Em modalidades adicionais, a primeira composição gasosa compreende ainda 1 parte por milhão ou menos de  $C_2-C_5$  alcinos e piperileno. Ainda em outras modalidades, a primeira composição gasosa compreende 1 parte por milhão ou menos de  $C_2-C_5$  alcinos e 1,4-  
30 pentadieno. Ainda em outras modalidades, a primeira

composição gasosa compreende 1 parte por milhão ou menos de C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> alcinos, ciclopentadieno, piperileno, e 1,4-pentadieno.

Em outras modalidades, a primeira composição gasosa é exposta através de um secador antes da primeira etapa de resfriamento. Ainda em outras modalidades, a primeira composição gasosa é exposta através de um secador após a primeira etapa de resfriamento, mas antes da segunda etapa de resfriamento.

Em outras modalidades, a primeira etapa de resfriamento resfria a primeira composição de isoprene gasoso para uma temperatura entre cerca de 10°C e cerca de -15°C, entre cerca de 10°C e cerca de -10°C, cerca de 5°C e cerca de -5°C, e cerca de 5°C e cerca de -10°C.

Em outras modalidades, a primeira etapa de resfriamento utiliza um sistema de refrigeração de propileno. Ainda em outras modalidades, a primeira etapa de resfriamento utiliza resfriador em um sistema de refrigeração de amônio.

Em outras modalidades, a segunda etapa de resfriamento resfria a segunda composição de isoprene gasoso até uma temperatura menor do que -35°C. Em outras modalidades, a segunda etapa de resfriamento resfria a segunda composição de isoprene gasoso até uma temperatura menor do que cerca de -50°C. Ainda em outras modalidades, a segunda etapa de resfriamento resfria a segunda composição de isoprene gasoso até uma temperatura cerca de -60°C a cerca de -85°C. Ainda em modalidades adicionais, a segunda etapa de resfriamento resfria a segunda composição de

isoprene gasoso até uma temperatura de menos do que cerca de -65°C.

Em outras modalidades, a segunda etapa de resfriamento utiliza um sistema de refrigeração de etileno.

5           Em outras modalidades, a composição de isoprene líquido compreende pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, e 90% de isoprene por peso. Em outras modalidades, o isoprene líquido compreende pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98%, 99% e 99,5% de isoprene por peso. Ainda em outras  
10 modalidades, a composição de isoprene líquido compreende isoprene em uma quantidade que é maior do que cerca de 99,5% por peso.

Em outras modalidades, as células hospedeiras são selecionadas a partir do gênero *Bacillus*, *Escherichia* ou  
15 *Acinetobacter*. Ainda em outras modalidades, as células hospedeiras são *Escherichia coli*. Em modalidades adicionais, as células hospedeiras são levedura. Ainda em modalidades adicionais, as células hospedeiras são *Saccharomyces cerevisiae*.

20           Em outro aspecto, outro método é fornecido. O método compreende:

a. colocar em contato uma pluralidade de células hospedeiras capaz de produzir isoprene em um meio aquoso em que o meio aquoso está em contato com um líquido orgânico  
25 imiscível e o meio aquoso, as células hospedeiras, e o líquido orgânico imiscível é em um recipiente fechado; e

b. cultivar as células hospedeiras no meio aquoso pela qual as células hospedeiras produzem isoprene e o isoprene é capturado no líquido orgânico imiscível.

Em algumas modalidades, o método compreende ainda separar o líquido orgânico imiscível do meio aquoso e separar o isoprene do líquido orgânico imiscível.

Em outras modalidades, o líquido orgânico  
5 imiscível é selecionado a partir de acetato de butila, acetato de etila, miristato de isopropila, isobutil cetona de metila, oleato de metila, e tolueno. Em certas modalidades, o solvente é acetato de butila. Em outras modalidades, o líquido orgânico imiscível é isopropil  
10 miristrato.

Em outras modalidades, o isoprene é separado do líquido orgânico imiscível ao aquecer o líquido orgânico imiscível até uma temperatura acima de 34°C.

A composição de isoprene gasoso resultante pode  
15 então ser adicionalmente purificada ao utilizar os métodos descritos acima.

Em outro aspecto, um sistema para produzir isoprene microbiano é fornecido. Um exemplo ilustrativo de tal sistema é mostrado na Figura 2. O biorreator 202 é um  
20 sistema fechado onde as células hospedeiras capazes de produzir isoprene são cultivadas em um meio aquoso e com um líquido orgânico imiscível no topo do meio aquoso. Uma vez que o biorreator 202 é um sistema fechado, o isoprene produzido pelas células hospedeiras é capturado pelo  
25 líquido orgânico imiscível. O líquido orgânico imiscível enriquecido com isoprene (A) pode então direcionado para qualquer método de separação gás-líquido adequado. Neste exemplo, o líquido orgânico imiscível enriquecido com isoprene é direcionado para um aquecedor 204 que volatiliza o  
30 isoprene em uma composição de isoprene gasoso (1). Esta

composição de isoprene gasoso (1) pode então ser purificada ainda ao utilizar os sistemas e métodos descritos acima. O líquido orgânico imiscível (B) pode opcionalmente ser reciclado e utilizado em biorreações subsequentes para  
5 produzir isoprene.

Em outra modalidade, o sistema compreende:

- a. um recipiente fechado;
- b. um meio aquoso, dentro do recipiente, que forma uma primeira fase;
- 10 c. uma pluralidade de células hospedeiras, dentro do meio aquoso, capaz de produzir isoprene; e
- d. uma segunda fase orgânica líquida, capaz de capturar o isoprene produzido pelas células hospedeiras, em contato com a primeira fase.

15 Em algumas modalidades, o líquido orgânico imiscível é selecionado a partir de acetato de butila, acetato de etila, miristato de isopropila, isobutil cetona de metila, oleato de metila, e tolueno. Em certas modalidades, o solvente é acetato de butila. Em outras  
20 modalidades, o líquido orgânico imiscível é isopropil miristrato.

Em outras modalidades, as células hospedeiras são selecionadas a partir do gênero *Bacillus*, *Escherichia* ou *Acinetobacter*. Ainda em outras modalidades, as células  
25 hospedeiras são *Escherichia coli*. Em modalidades adicionais, as células hospedeiras são levedura. Ainda em modalidades adicionais, as células hospedeiras são *Saccharomyces cerevisiae*.

### EXEMPLOS

A prática da presente invenção pode empregar, exceto se indicado em contrário, técnicas convencionais da indústria biossintética e similares, que fazem parte da habilidade na técnica. Assim sendo, tais técnicas não são descritas integralmente nesta invenção, a pessoa pode encontrar ampla referência a elas na literatura científica.

Nos seguintes exemplos, esforços foram feitos para garantir precisão com relação aos números utilizados (por exemplo, quantidades, temperatura, e demais), mas variação e desvio podem ser mencionados, e no caso de um erro crucial nos números relatados nesta invenção existir, a pessoa de habilidade comum na técnica a qual esta invenção pertence pode deduzir a quantidade correta em vista da descrição remanescente nesta invenção. Exceto se indicado em contrário, a temperatura é relatada em graus Celsius, e pressão está em ou próxima à pressão atmosférica ao nível do mar. Todos os reagentes, exceto se indicado em contrário, foram obtidos comercialmente. Os seguintes exemplos se prestam para propósitos ilustrativos apenas e não limitam de qualquer forma o escopo da presente invenção.

#### Exemplo 1

Este exemplo descreve métodos para detectar aprisionado isoprene em um líquido orgânico imiscível em um sistema fechado de fermentação.

Neste exemplo, o miristato de isopropila (IPM) e soluções de IPM com adição de 103 mg/L, 10,3 mg/L e 0 mg/L isoprene foram preparados e armazenados em garrafas de meio tampadas de 100 ml.

125 ml frascos não-defletidos com tampas/divisórias de parafuso foram ajustados triplamente. Os frascos continham meio de 40 ml (meios de Base Nitrogenada de Levedura com 4% de galactose, 0.2% glicose, 5 Leu) inoculado com cultura de levedura de um dia para o outro (o que não produz isoprene) cultivado em um OD = 0,05 com 8 ml de soluções IPM com as várias concentrações de isoprene. Os frascos selados foram incubados por 72 horas a 30°C e 200 rpm.

10 Após a incubação, a cobertura de IPM teve suas fases separadas por transferência manual para ampolas GC primárias, então transferida para ampolas GC secundárias e encaminhada não-diluída em GC-FID. Em adição às amostras dos frascos, as soluções originais de 103 e 10,3 mg/L de 15 isoprene em IPM (não sacudido por 72 horas a 200 rpm, 30°C) foram também analisadas.

Como mostrado pela Figura 5, mais de 90% do isoprene adicionado foi recuperado a partir da camada de IPM. O crescimento de células para culturas com 103, 10,3, 20 e 0 mg/L de isoprene na camada de IPM foi indistinguível.

#### Exemplo 2

Este exemplo descreve métodos para produzir ácidos nucleicos para expressar em isoprene sintases heterólogas de *Saccharomyces cerevisiae*.

25 O DNA genômico foi isolado a partir de *Saccharomyces cerevisiae* cepas Y002 (CEN.PK2 background MATA ura3-52 trp1-289 Ieu2-3,112 his3Δ1 MAL2-8C SUC2) (van Dijken et al. (2000) Enzyme and Microbial Technology 26:706-714), Y007 (S288C background MATA trp1Δ63) (ATCC 30 número 200873), Y051 (S288C background), e EG123 (ATCC

número 204278). As cepas foram cultivadas de um dia para o outro em meio líquido contendo 1% de extrato de levedura, 2% de Bacto-peptona, e 2% de Dextrose (meio de YPD). As células foram isoladas a partir de culturas líquidas 10 mL por centrifugação a 3.100 rpm, lavagem de pelotas de célula em 10 mL água ultra-pura, e re-centrifugação. O DNA genômico foi extraído ao utilizar o conjunto de extração de DNA de levedura Y-DER (Pierce Biotechnologies, Rockford, IL) pelo protocolo sugerido pelo fabricante. O DNA genômico extraído foi ressuspensão em 100 µL 10 mM Tris-Cl, pH 8,5, e leituras OD<sub>260/280</sub> foram tomadas em um espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) para determinar a concentração e pureza do DNA genômico.

A amplificação de DNA por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi efetuada em um Termociclador Applied Biosystems 2720 (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA) ao utilizar o sistema de Polimerase de DNA Phusion De Alta Fidelidade (Finnzymes OY, Espoo, Finlândia) pelo protocolo sugerido pelo fabricante. Após a conclusão de uma amplificação de PCR de um fragmento de DNA que foi designado para ser inserido no vetor pCR®4Blunt-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA), cadeias secundárias de nucleotídeo foram criadas ao adicionar 1 µL de Polimerase Qiagen Taq (Qiagen, Valencia, CA) à mistura de reação e realizar uma etapa adicional de extensão de PCR por 10 minutos, a 72°C, seguida por resfriamento até 4°C. Após a conclusão de uma amplificação de PCR, 8 µL de uma solução 50% de glicerol foi adicionada à mistura de reação.

Eletroforese de gel de agarose foi realizada ao utilizar um gel de agarose de 1% TBE (0,89 M Tris, 0,89 M

de ácido bórico, 0,02 M EDTA de sal de sódio) contendo 0,5 µg/mL brometo de etídio, a 120 V, 400 mA por 30 minutos. As fitas de DNA foram visualizadas ao utilizar luz ultravioleta. As fitas de DNA foram removidas do gel com  
5 uma lâmina de navalha estéril, e o DNA removido foi purificado com gel ao utilizar o Conjunto de Remoção de DNA em Gel Zymoclean (Zymo Research, Orange, CA) de acordo com os protocolos sugeridos pelo fabricante. O DNA purificado foi eluído em 10 µL água ultra-pura, e leituras OD<sub>260/280</sub>  
10 foram tomadas em um espectrofotômetro ND-1000 para determinar a concentração e pureza do DNA.

As ligações foram realizadas ao utilizar 100-500 µg de produto de PCR purificado e Ligase de DNA T4 de Alta Concentração (New England Biolabs, Ipswich, MA) pelo  
15 protocolo sugerido pelo fabricante. Para propagação de plasmídeo, construtos ligados foram transformados em células quimicamente competentes de *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen, Carlsbad, CA) pelo protocolo sugerido pelo fabricante. Os transformantes positivos foram selecionados  
20 em meios sólidos contendo 1,5% de Bacto Agar, 1% de Triptona, 0,5% Extrato de Levedura, 1% NaCl, e uma antibiótico apropriado. Os transformantes isolados foram cultivados por 16 horas em meio líquido LB contendo 50 µg/mL de antibiótico carbenicilina ou canamicina a 37°C, e  
25 o plasmídeo foi isolado e purificado ao utilizar um conjunto Miniprep Spin QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Valencia, CA) pelo protocolo sugerido pelo fabricante. Os construtos foram verificados ao realizar digestões de enzima de restrição de diagnóstico, resolver os fragmentos  
30 de DNA em um gel agarose, e visualizar as fitas ao utilizar

luz ultravioleta. Os construtos selecionados foram também verificados por sequenciamento de DNA, que foi efetuado por Elim Biopharmaceuticals Inc. (Hayward, CA).

O plasmídeo de expressão pAM353 foi gerado ao  
5 inserir uma encodificação de sequência de nucleotídeo uma sintase  $\beta$ -farnesene no vetor pRS425-Gall (Mumberg et. al. (1994) Nucl. Acids. Res. 22(25): 5767-5768). A sequência de nucleotídeo inserida foi gerada sinteticamente, ao utilizar como um modelo a sequência de codificação da sintase  $\beta$ -  
10 farnesene de gene de *Artemisia annua* (GenBank número de catalogação AY835398) otimizado em códon para expressão em *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO: 1). A sequência de nucleotídeo sinteticamente gerada foi flanqueado pelos locais de restrição 5' *Bam*HI e 3' *Xho*I, e pode então ser  
15 clonada em locais de restrição compatíveis de um vetor de clonagem como um vetor original padrão pUC ou pACYC. A sequência de nucleotídeo sinteticamente gerada foi isolada pela digestão total do construto ao utilizar endonucleases de restrição *Bam*HI e *Xho*I. A mistura de reação foi  
20 resolvida por eletroforese de gel, o fragmento de DNA de aproximadamente 1,7 kb que compreende a sintase  $\beta$ -farnesene de sequência de codificação foi purificada com gel, e o fragmento isolado de DNA foi ligado no local de restrição *Bam*HI *Xho*I do veto pRS425-Gall, produzindo plasmídeo de  
25 expressão pAM353.

O plasmídeo de expressão pAM404 foi gerado ao inserir uma encodificação de sequência de nucleotídeo na sintase  $\beta$ -farnesene de *Artemisia annua* (GenBank número de catalogação AY835398) otimizado em códon para expressão em  
30 *Saccharomyces cerevisiae* no vetor pAM178 (SEQ ID NO: 2). A

encodificação de sequência de nucleotídeo da sintase  $\beta$ -farnesene foi amplificada por PCR a partir de pAM353 ao utilizar os iniciadores 52-84 pAM326 *BamHI* (SEQ ID NO: 21) e 52-84 pAM326 *NheI* (SEQ ID NO: 22). O resultante produto de PCR foi digerido integralmente ao utilizar as endonucleases de restrição *BamHI* e *NheI*, a mistura de reação foi resolvida por eletroforese de gel, o fragmento de DNA de aproximadamente 1,7 kb que compreende a sequência de codificação de sintase  $\beta$ -farnesene foi purificada por gel, e o fragmento de DNA isolado foi ligado no local de restrição *BamHI* *NheI* do vetor pAM 178, produzindo o plasmídeo de expressão pAM404.

O plasmídeo Genetrix2080 foi gerado ao inserir uma encodificação de sequência de nucleotídeo em um isoprene sintase no vetor pUC19. A inserção foi gerada sinteticamente como dois fragmentos de DNA de tamanhos aproximadamente idênticos, fragmento 2080\_1 (SEQ ID NO: 3) e fragmento 2080\_2 (SEQ ID NO: 4), ao utilizar como um modelo a sequência de codificação do isoprene sintase o gene *Kudzu* otimizado em códon para expressão em *Saccharomyces cerevisiae*. Cada fragmento de DNA foi flanqueado por locais de restrição *LguI*, e compreende uma sequência de sobreposição de par de 40 bases em uma extremidade. Os fragmentos de DNA sinteticamente gerados foram ligados em extremidade cega no local de restrição *SmaI* do vetor de clonagem pUC19, a partir do qual as duas inserções foram removidas novamente ao digerir integralmente 500  $\mu$ g do construto ao utilizar a endonuclease de restrição *LguI* (Fermentas, Glen Burnie, MD). A endonuclease de restrição foi neutralizada por calor

por 20 minutos a 65°C, e os fragmentos de DNA foram costurados juntos por uma primeira rodada de amplificação de PCR (um ciclo de desnaturação a 98°C por 2 minutos; 5 ciclos de desnaturação a 98°C por 30 segundos e 5 temperatura/extensão a 72°C por 30 segundos por produto de PCR quilobase; nenhum iniciador foi utilizado). As amostras foram colocadas em gelo, 0,5 µM de cada iniciador terminal TRIX\_L\_494 (SEQ ID NO: 79) e TRIX\_L\_495 (SEQ ID NO: 80) foram adicionados à mistura de reação, e uma segunda rodada de amplificação de PCR foi realizada (um ciclo de desnaturação a 98°C por 2 minutos; 35 rodadas de desnaturação a 98°C por 12 segundos e temperatura/extensão a 72°C por 20 segundos por produto de PCR quilobase; um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos; e uma retenção 15 final a 4°C). A mistura de reação foi resolvida por eletroforese de gel, o fragmento de DNA reunido foi purificado por gel, tratada com quinase de polinucleotídeo T4 (PNK) (New England Biolabs, Ipswich, MA), e ligado em extremidade cega no local de restrição *Sma*I do vetor pUC19, 20 produzindo plasmídeo Genetrix2080.

O plasmídeo Genetrix2081 foi gerado ao inserir uma encodificação de sequência de nucleotídeo um isoprene sintase no vetor pUC19. A inserção foi gerada sinteticamente como dois fragmentos de DNA de tamanhos 25 aproximadamente idênticos, fragmento 2081\_1 (SEQ ID NO: 5) e fragmento 2081\_2 (SEQ ID NO: 6), ao utilizar como um modelo a sequência de codificação do gene isoprene sintase de *Populus nigra* otimizado em códon para expressão em *Saccharomyces cerevisiae*. Cada fragmento de DNA foi 30 flanqueado por locais de restrição *Lgu*I, e compreende uma

sequência de sobreposição de par de 30 bases em uma extremidade. Os fragmentos de DNA sinteticamente gerados foram ligados em extremidade cega no local de restrição *Sma*I do vetor de clonagem pUC19, a partir do qual as duas  
5 inserções foram removidas novamente por digestão completa de 500 µg do construto ao utilizar endonuclease de restrição *Lgu*I (Fermentas, Glen Burnie, MD). A endonuclease de restrição foi neutralizada por calor por 20 minutos a 65°C, e os fragmentos de DNA foram costurados juntos por  
10 uma primeira rodada de amplificação de PCR (um ciclo de desnaturação a 98°C para 2 minutos; 5 ciclos de desnaturação a 98°C para 30 segundos e têmpera/extensão a 72°C para 30 segundos por produto de PCR quilobase; nenhum iniciador foi utilizado). As amostras foram colocadas em  
15 gelo, 0,5 µM de cada iniciador terminal TRIX\_L\_497 (SEQ ID NO: 81) e TRIX\_L\_498 (SEQ ID NO: 82) foi adicionado à mistura de reação, e uma segunda rodada de amplificação de PCR foi realizada (um ciclo de desnaturação a 98°C por 2 minutos; 35 rodadas de desnaturação a 98°C por 12 segundos  
20 e têmpera/extensão a 72°C por 20 segundos por produto de PCR quilobase; um ciclo de final extensão a 72°C por 7 minutos; e uma retenção final a 4°C). A mistura de reação foi resolvida por eletroforese de gel, o fragmento de DNA reunido foi purificado por gel, tratado com quinase de  
25 polinucleotídeo T4 (PNK) (New England Biolabs, Ipswich, MA), e ligado em extremidade cega no local de restrição *Sma*I do vetor pUC19, produzindo o plasmídeo Genetrix2081.

O plasmídeo Genetrix2082 foi gerado inserindo-se uma sequência de nucleotídeo que codifica uma isopreno  
30 sintase no vetor pUC19. A inserção foi gerada

sinteticamente como dois fragmentos de DNA de tamanho aproximadamente igual, o fragmento 2082\_1 (SEQ ID NO: 7) e o fragmento 2082 2 (SEQ ID NO: 8), usados como um modelo da sequência de codificação do gene da isopreno sintase of *Populus alba* x *Populus tremula* otimizado por códon para expressão em *Saccharomyces cerevisiae*. Cada fragmento de DNA foi flanqueado por locais de restrição Lgl, e compreendeu uma sequência de sobreposição de 40 pares de base em uma extremidade. Os fragmentos de DNA sinteticamente gerados foram ligados por embotamento no local de restrição *Sma* do vetor de clonagem pUC19, a partir do qual duas inserções foram excisadas novamente por digestão por completo de 500 µg do construto com uso de endonuclease de restrição Lgl (Fermentas, Glen Burnie, MD). A endonuclease de restrição foi inativada por calor por 20 minutos a 65°C, e os fragmentos de DNA foram unidos juntos por uma primeira sessão de amplificação por PCR (um ciclo de desnaturação a 98°C por 2 minutos; 5 ciclos de desnaturação a 98°C por 30 segundos e recozimento/extensão a 72°C por 30 segundos por quilobase de produto PCR; nenhum iniciador foi usado). As amostras foram colocadas em gelo, 0,5 µM de cada iniciador terminal TRIX\_L\_500 (SEQ ID NO:83) e TRIX L 501 (SEQ ID NO: 84) foram adicionados à mistura de reação, e uma segunda sessão de amplificação por PCR foi realizada (um ciclo de desnaturação a 98°C por 2 minutos; 35 sessões de desnaturação a 98°C por 12 segundos e recozimento/extensão a 72°C por 20 segundos por quilobase de produto PCR; um ciclo de final estendido a 72°C por 7 minutos; e uma manutenção final a 4°C). A mistura de reação foi separada por eletroforese em gel, o fragmento de DNA

montado foi purificado em gel, tratado com polinucleotídeo quinase T4 (PNK) (New England Biolabs, Ipswich, MA), e ligados por embotamento no local de restrição *Sma*I do vetor pUC19, rendendo o plasmídeo Genetrix2082.

5           O plasmídeo de expressão pAM1 547 foi gerado substituindo-se a sequência de codificação da  $\beta$ -farneseno sintase de expressão do plasmídeo pAM404 pela sequência de codificação da isopreno sintase do plasmídeo Genetrix2080. O fragmento de DNA IS2080 foi gerado por amplificação por  
10   PCR do plasmídeo Genetrix2080 com uso dos iniciadores YD-198-70A (SEQ ID NO: 85) e YD-198-70B (SEQ ID NO: 86), digestão do produto de PCR por completo com uso de endonucleases de restrição *Bam*HI e *Nhe*I, resolvendo a mistura de reação por eletroforese em gel, e purificando em  
15   gel o fragmento de DNA de aproximadamente 1,8 kb que compreende a sequência de codificação de isopreno sintase. O plasmídeo de expressão pAM404 foi digerido por completo com uso de endonucleases de restrição *Bam*HI e *Nhe*I, a mistura de reação foi separada por eletroforese em gel, a  
20   cadeia principal do vetor de aproximadamente 7,3 kb (sem a sequência de codificação de  $\beta$ -farneseno sintase) foi purificada em gel, e a cadeia principal do vetor purificada foi ligada ao fragmento de DNA IS2080, rendendo pAM1547 (vide a Figura 6 para um mapa de plasmídeo).

25           O plasmídeo de expressão pAM1 548 foi gerado substituindo-se a sequência de codificação de  $\beta$ -farneseno sintase do plasmídeo de expressão pAM404 por uma versão truncada da sequência de codificação da isopreno sintase do plasmídeo Genetrix2080. O fragmento de DNA IS2080T foi  
30   gerado por amplificação por PCR do plasmídeo Genetrix2080

com uso de iniciadores YD-198-70B (SEQ ID NO: 86) e YD-198-70G (SEQ ID NO: 91), digestão do produto de PCR por completo com uso de endonucleases de restrição *BamHI* e *NheI*, separação da mistura de reação por eletroforese em gel, e purificação em gel do fragmento de DNA de aproximadamente 1,65 kb que compreende a sequência de codificação truncada da isopreno sintase. O pAM404 foi digerido por completo com uso de endonucleases de restrição *BamHI* e *NheI*, a mistura de reação foi separada por eletroforese em gel, a cadeia principal de aproximadamente 7,3 kb (sem a sequência de codificação de  $\beta$ -farneseno sintase) foi purificada em gel, e a cadeia principal do vetor purificada foi ligada ao fragmento de DNA amplificado IS2080T, rendendo pAM1548.

O plasmídeo de expressão pAM1 549 foi gerado por substituição da sequência de codificação de  $\beta$ -farneseno sintase do plasmídeo de expressão pAM404 pela sequência de codificação de isopreno sintase do plasmídeo Genetrix2081. O fragmento de DNA IS2081 foi gerado por amplificação por PCR do plasmídeo Genetrix2081 com uso dos iniciadores YD-198-70C (SEQ ID NO: 87) e YD-198-70D (SEQ ID NO: 88), digestão do produto de PCR por completo com uso de endonucleases de restrição *BamHI* e *NheI*, separação da mistura de reação por eletroforese em gel, e purificação em gel do fragmento de DNA de aproximadamente 1,8 kb que compreende a sequência de codificação de isopreno sintase. O plasmídeo de expressão pAM404 foi digerido por completo com uso de endonucleases de restrição *BamHI* e *NheI*, a mistura de reação foi separada por eletroforese em gel, a cadeia principal do vetor de aproximadamente 7,3 kb (sem a

sequência de codificação de  $\beta$ -farneseno sintase) foi purificada em gel, e a cadeia principal do vetor purificada foi ligada ao fragmento de DNA IS2081, rendendo pAM1549.

O plasmídeo de expressão pAM1 550 foi gerado por substituição da sequência de codificação de  $\beta$ -farneseno sintase do plasmídeo de expressão pAM404 por uma versão truncada da sequência de codificação de isopreno sintase do plasmídeo Genetrix2081. O fragmento de DNA IS2081T foi gerado por amplificação por PCR do plasmídeo Genetrix2081 com uso dos iniciadores YD-198-70D (SEQ ID NO: 88) e YD-198-70H (SEQ ID NO: 92), digestão do produto de PCR por completo com uso de endonucleases de restrição *BamHI* e *NheI*, separação da mistura de reação por eletroforese em gel, e purificação em gel do fragmento de DNA de aproximadamente 1,6 kb que compreende a sequência de codificação de isopreno sintase truncada. O plasmídeo de expressão pAM404 foi digerido por completo com uso de endonucleases de restrição *BamHI* e *NheI*, a mistura de reação foi separada por eletroforese em gel, cadeia principal do vetor de aproximadamente 7,3 kb (sem a sequência de codificação de  $\beta$ -farneseno sintase) foi purificada em gel, e a cadeia principal do vetor purificada foi ligada ao fragmento de DNA IS2081T, rendendo pAM1550.

O plasmídeo de expressão pAM1 551 foi gerado por substituição da sequência de codificação de  $\beta$ -farneseno sintase do plasmídeo de expressão pAM404 pela sequência de codificação de isopreno sintase do plasmídeo Genetrix2082. O fragmento de DNA IS2082 foi gerado por amplificação por PCR do plasmídeo Genetrix2082 com uso dos iniciadores YD-198-70E (SEQ ID NO: 89) e YD-198-70F (SEQ ID NO: 90),

digestão do produto de PCR por completo com uso de endonucleases de restrição *BamHI* e *NheI*, separação da mistura de reação por eletroforese em gel, e purificação em gel do fragmento de DNA de aproximadamente 1,8 kb que  
5 compreende a sequência de codificação de isopreno sintase. O plasmídeo de expressão pAM404 foi digerido por completo com uso de endonucleases de restrição *BamHI* e *NheI*, a mistura de reação foi separada por eletroforese em gel, a cadeia principal do vetor de aproximadamente 7,3 kb (sem a  
10 sequência de codificação de  $\beta$ -farneseno sintase) foi purificada em gel, e a cadeia principal do vetor purificada foi ligada ao fragmento de DNA IS2082, rendendo pAM1551.

O plasmídeo de expressão pAM1 552 foi gerado por substituição da sequência de codificação de  $\beta$ -farneseno  
15 sintase do plasmídeo de expressão pAM404 por uma versão truncada da sequência de codificação de isopreno sintase do plasmídeo Genetrix2082. O fragmento de DNA IS2082T foi gerado por amplificação por PCR do plasmídeo Genetrix2082 com uso dos iniciadores YD-198-70F (SEQ ID NO: 90) e YD-  
20 198-701 (SEQ ID NO: 93), digestão do produto de PCR por completo com uso de endonucleases de restrição *BamHI* e *NheI*, separação da mistura de reação por eletroforese em gel, e purificação em gel do fragmento de DNA de aproximadamente 1,64 kb que compreende a sequência de  
25 codificação de isopreno sintase truncada. O plasmídeo de expressão pAM404 foi digerido por completo com uso de endonucleases de restrição *BamHI* e *NheI*, a mistura de reação foi separada por eletroforese em gel, a cadeia principal do vetor de aproximadamente 7,3 kb (sem a  
30 sequência de codificação de  $\beta$ -farneseno sintase) foi

purificada em gel, e a cadeia principal do vetor purificada foi ligada ao fragmento de DNA IS2082T, rendendo pAM1552.

O plasmídeo pAM840 foi gerado por inserção da sequência de codificação do gene *MsG* no vetor pCR(R)2.1-  
 5 TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). A sequência de codificação do gene *hisG* foi amplificada por PCR com uso dos iniciadores KB34 (SEQ ID NO: 75) e KB39 (SEQ ID NO: 76) e o plasmídeo pNKY51 (Alani et al. (1987) *Genetics* 116(4):541-555) como modelo. O fragmento de DNA amplificado foi ligado  
 10 ao vetor Topo conforme pelo protocolo sugerido do fabricante, rendendo pAM840.

O Plasmídeo pAM728 foi gerado introduzindo-se a sequência de codificação do gene da farneseno sintase da *Artemisia annua* (número de acesso do GenBank AY835398)  
 15 otimizado por códon para expressão na *Saccharomyces cerevisiae* e sob o controle do promotor do gene *GAL7* da *Sacharomyces cerevisiae* ( $P_{GAL7}$ ) no plasmídeo pRS425 (Christianson et al. (1992) *Gene* 110(1): 119-122). Um fragmento de DNA de aproximadamente 0,5 kb que compreende  
 20  $P_{GAL7}$  foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico Y002 usando os iniciadores GW-110-26-pGAL7-PstI F (SEQ ID NO: 119) e GW-1 10-26-pGAL7 R (SEQ ID NO: 120) e foi purificado em gel. Um fragmento de DNA de aproximadamente 2 kb que compreende a sequência de codificação do gene da farneseno  
 25 sintase foi amplificado por PCR usando os iniciadores GW-110-26- pGAL7-FS F (SEQ ID NO: 121) e GW-110-26-FS-BamHI R (SEQ ID NO: 122). Os dois fragmentos de DNA foram alinhados juntos usando iniciadores PCR GW-110-26-pGAL7-PstI F (SEQ ID NO: 119) e GW-1 10-26-FS-BamHI R (SEQ ID NO: 122) para  
 30 criar uma inserção  $P_{GAL7}$ - FS-tCYCl. A inserção  $P_{GAL7}$ -FS-tCYCl

e o plasmídeo pRS425 foram digeridos por completo usando as endonucleases de restrição *Pst*I e *Bam*HI e os dois fragmentos de DNA foram ligados, que rende o pAM728.

O Plasmídeo pAM940 foi gerado introduzindo-se a  
 5 sequência da farneseno sintase do plasmídeo pAM728 no plasmídeo pRS426 (Christianson et al. (1992) Gene 110(1): 119 a 122). Os Plasmídeos pAM728 e pRS426 foram digeridos por completo usando as endonucleases de restrição *Xho*I e *Bam*HI, a reação das misturas foram separadas por eletroforese em  
 10 gel, a cadeia principal do vetor pRS426 de aproximadamente 5,7 kb e a inserção  $P_{GAL7}$ -FS-tCYC1 de aproximadamente 2,5 kb do pAM728 foram purificadas em gel e os dois fragmentos de DNA foram ligados, que rende o plasmídeo pAM940.

O Plasmídeo pAM489 foi gerado inserindo-se a  
 15 inserção  $ERG20$ - $P_{GAL}$ -tHMGR do vetor pAM471 no vetor pAM466. O vetor pAM471 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA  $ERG20$ - $P_{GAL}$ -tHMGR, que compreende o quadro de leitura aberto (ORF) do gene *ERG20* da *Saccharomyces cerevisiae* (posições de nucleotídeo *ERG20* 1 a 1208; o A do códon de início ATG é  
 20 o nucleotídeo 1) (*ERG20*), o lócus genético que contém os promotores divergentes *GAL1* e *GAL10* da *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo *GAL1* -1 a -668) ( $P_{GAL}$ ) e um ORF cortado do gene *HMG1* da *Saccharomyces cerevisiae* (posições de nucleotídeo *HMG1* 1586 a 3323) (tHMGR), no  
 25 vetor de clonagem TOPO Zero Blunt II (Invitrogen, Carlsbad, CA). O vetor pAM466 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA  $TRP1^{-856}$  a  $+548$ , que compreende um segmento do lócus de tipo selvagem *TRP1* da *Saccharomyces cerevisiae* que se estende da posição de nucleotídeo -856 para a posição 548 e  
 30 abriga um local de restrição de *Xma*I interno não nativo

entre as bases -226 e -225, no vetor de clonagem TOPO TA pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os fragmentos de DNA ERG20- P<sub>GAL</sub>-tHMGR e TRP1<sup>-856 a +548</sup> foram gerados por amplificação por PCR como esquematizado Tabela 1. Para a

5 construção do pAM489, 400 ng de pAM471 e 100 ng de pAM466 foram digeridos por completo usando a enzima de restrição *Xma*I (New England Biolabs, Ipswich, MA), os fragmentos de DNA que correspondem à inserção ERG20-P<sub>GAL</sub>-tHMGR e o vetor pAM466 linearizado foram purificados em gel e 4 mola-

10 equivalentes das inserções foram ligados 1 molar equivalente do vetor linearizado purificado, que rende pAM489. A Figura 7 A mostra um mapa da inserção ERG20-P<sub>GAL</sub>-tHMGR, e SEQ ID NO: 9 mostra a sequência de nucleotídeo do fragmento de DNA e as sequências de TRP1 de flaqueamento.

Tabela 1 - Amplificações por PCR realizadas para gerar pAM489

| Sessão | Modelo                       | Iniciador 1                       | Iniciador 2                       | Produto de PCR              |
|--------|------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| 1      | 100 ng de DNA genômico Y051  | 61-67-CPK001-G<br>(SEQ ID NO: 23) | 61-67-CPK002-G<br>(SEQ ID NO: 24) | TPR1 <sup>-856 a -226</sup> |
|        |                              | 61-67-CPK003-G<br>(SEQ ID NO: 25) | 61-67-CPK004-G<br>(SEQ ID NO: 26) | TPR1 <sup>-225 a +548</sup> |
|        | 100 ng de DNA genômico EG123 | 61-67-CPK025-G<br>(SEQ ID NO: 47) | 61-67-CPK050-G<br>(SEQ ID NO: 55) | ERG20                       |

|   |                              |                 |                 |                          |
|---|------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
|   | 100 ng de DNA                | 61-67-          | 61-67-          | P <sub>GAL</sub>         |
|   | genômico Y002                | CPK051-G        | CPK052-G        |                          |
|   |                              | (SEQ ID NO: 56) | (SEQ ID NO: 57) |                          |
|   |                              | 61-67-          | 61-67-          | tHMGR                    |
|   |                              | CPK053-G        | CPK031-G        |                          |
|   |                              | (SEQ ID NO: 58) | (SEQ ID NO: 48) |                          |
| 2 | 100 ng cada de               | 61-67-          | 61-67-          | TPR1 <sup>-225</sup> a   |
|   | produtos de                  | CPK001-G        | CPK004-G        | +548                     |
|   | PCR TPR1 <sup>-856</sup> a - | (SEQ ID NO: 23) | (SEQ ID NO: 26) |                          |
|   | 226 e TPR1 <sup>-225</sup> a |                 |                 |                          |
|   | +548                         |                 |                 |                          |
|   | 100 ng cada de               | 61-67-          | 61-67-          | ERG20-P <sub>GAL</sub>   |
|   | produtos de                  | CPK025-G        | CPK052-G        |                          |
|   | PCR ERG20 e                  | (SEQ ID NO: 47) | (SEQ ID NO: 57) |                          |
|   | P <sub>GAL</sub>             |                 |                 |                          |
| 3 | 100 ng cada de               | 61-67-          | 61-67-          | ERG20-P <sub>GAL</sub> - |
|   | produtos de                  | CPK025-G        | CPK031-G        | tHMGR                    |
|   | PCR ERG20-P <sub>GAL</sub>   | (SEQ ID NO: 47) | (SEQ ID NO: 48) |                          |
|   | e tHMGR                      |                 |                 |                          |

O plasmídeo pAM491 foi gerado inserindo-se a inserção ERG13-P<sub>GAL</sub>-tHMGR do vetor pAM472 no vetor pAM467. O vetor pAM472 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA

5 ERG13-P<sub>GAL</sub>-tHMGR, que compreende o ORF do gene ERG13 da *Saccharomyces cerevisiae* (posições de nucleotídeo ERG13 1 a 1626) (ERG13), o lócus genético que contém os promotores divergentes GAL1 e GAL10 da *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo GAL1 -1 a -668) (P<sub>GAL</sub>), e um ORF

cortado do gene HMG1 da *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo HMG1 1586 a 3323) (tHMGR), no vetor de clonagem TOPO Zero Blunt II. O vetor pAM467 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA URA3<sup>-723 a 701</sup>, que compreende

5 um segmento do locus URA3 de tipo selvagem da *Saccharomyces cerevisiae* que se estende da posição de nucleotídeo -723 para a posição -224 e abriga um local de restrição de *Xma*I interno não entre as bases -224 e -223, no vetor de clonagem TOPO TA pCR2.1. Os fragmentos de DNA ERG13-P<sub>GAL</sub>-

10 tHMGR e URA3<sup>-723 a 701</sup> foram gerados por amplificação por PCR como esquematizado na Tabela 2. Para a construção do pAM491, 400 ng de pAM472 e 100 ng de pAM467 foram digeridos por completo usando a enzima de restrição *Xma*I, os fragmentos de DNA que correspondem à inserção ERG13-P<sub>GAL</sub>-

15 tHMGR e o vetor pAM467 linearizado foram purificados em gel e 4 molaes equivalentes da inserção purificada foram ligados com 1 molar equivalente do vetor linearizado purificado, que rende o pAM491. A Figura 7B mostra um mapa da inserção ERG13-P<sub>GAL</sub>-tHMGR e a SEQ ID NO: 10 mostra a

20 sequência de nucleotídeo do fragmento de DNA e as sequências de URA3 de flanqueamento.

Tabela 2 - Amplificações por PCR realizadas para gerar pAM491

| Sessão de PCR | Modelo                      | Iniciador 1                           | Iniciador 2                           | Produto de PCR                                            |
|---------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1             | 100 ng de DNA genômico Y007 | 61-67-<br>CPK005-G<br>(SEQ ID NO: 27) | 61-67-<br>CPK006-G<br>(SEQ ID NO: 28) | URA3 <sup>-723 a -224</sup><br>URA3 <sup>-223 a 701</sup> |

|   |                                                                                                  |                                   |                                   |                                   |
|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|   |                                                                                                  | CPK007-G                          | CPK008-G                          |                                   |
|   |                                                                                                  | (SEQ ID NO: 29)                   | (SEQ ID NO: 30)                   |                                   |
|   | 100 ng de DNA genômico Y002                                                                      | 61-67-CPK032-G                    | 61-67-CPK054-G                    | ERG13                             |
|   |                                                                                                  | (SEQ ID NO: 49)                   | (SEQ ID NO: 59)                   |                                   |
|   |                                                                                                  | 61-67-CPK052-G                    | 61-67-CPK055-G                    | P <sub>GAL</sub>                  |
|   |                                                                                                  | (SEQ ID NO: 57)                   | (SEQ ID NO: 60)                   |                                   |
|   |                                                                                                  | 61-67-CPK031-G                    | 61-67-CPK053-G                    | tHMGR                             |
|   |                                                                                                  | (SEQ ID NO: 48)                   | (SEQ ID NO: 58)                   |                                   |
| 2 | 100 ng cada de produtos de PCR URA3 <sup>-723</sup> a -<br>701 e URA3 <sup>-223</sup> a -<br>701 | 61-67-CPK005-G<br>(SEQ ID NO: 27) | 61-67-CPK008-G<br>(SEQ ID NO: 30) | URA3 <sup>-723</sup> a -<br>701   |
|   | 100 ng cada de produtos de PCR ERG13e P <sub>GAL</sub>                                           | 61-67-CPK032-G<br>(SEQ ID NO: 49) | 61-67-CPK052-G<br>(SEQ ID NO: 57) | ERG13-P <sub>GAL</sub>            |
| 3 | 100 ng cada de produtos de PCR ERG13-P <sub>GAL</sub><br>e tHMGR                                 | 61-67-CPK031-G<br>(SEQ ID NO: 48) | 61-67-CPK032-G<br>(SEQ ID NO: 49) | ERG13-P <sub>GAL</sub> -<br>tHMGR |

O plasmídeo pAM493 foi gerado inserindo-se a inserção IDI 1 -P<sub>GAL</sub>-tHMGR do vetor pAM473 no vetor pAM468. O vetor pAM473 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA IDI1-P<sub>GAL</sub>-tHMGR, que compreende o ORF do gene da

5 *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo IDI1 1 a 1017) (IDI1), o locus genético que contém os promotores divergentes GAL1 e GAL10 da *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo GAL1 -1 a -668) (P<sub>GAL</sub>), e um ORF cortado do gene HMGl da *Saccharomyces cerevisiae* (posições

10 de nucleotídeo HMGl 1586 a 3323) (tHMGR), no vetor de clonagem TOPO Zero Blunt II. O vetor pAM468 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA ADE1<sup>-825 a 653</sup>, que compreende um segmento do locus ADE1 de tipo selvagem da *Saccharomyces cerevisiae* que se estende da posição de nucleotídeo -225

15 para a posição 653 e abriga um local de restrição de XmaI interno não nativo a entre as bases -226 e -225, no vetor de clonagem TOPO TA pCR2.1. Os fragmentos de DNA IDI1-P<sub>GAL</sub>-tHMGR e ADE 1<sup>-825 a 653</sup> foram gerados por amplificação por PCR como esquematizado na Tabela 3. Para a construção do

20 pAM493, 400 ng de pAM473 e 100 ng epAM468 foram digeridos por completo usando a enzima de restrição XmaI, os fragmentos de DNA que correspondem à inserção IDI1-P<sub>GAL</sub>-tHMGR e o vetor pAM468 linearizado foram purificados em gel, e 4 molares equivalentes da inserção purificada foram

25 ligados com 1 molar equivalente do vetor linearizado purificado, que rende o pAM493. A Figura 7C mostra um mapa da inserção IDI1-P<sub>GAL</sub>-tHMGR, e a SEQ ID NO: 11 mostra a sequência de nucleotídeos do fragmento de DNA e as sequências de ADE1 de flanqueamento.

Tabela 3 - Amplificações por PCR realizadas para gerar pAM493

| Sessão | Modelo                                                                                   | Iniciador 1     | Iniciador 2     | Produto de PCR               |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------------------|
| 1      | 100 ng de DNA genômico Y007                                                              | 61-67-          | 61-67-          | ADEI <sup>-825</sup> a - 226 |
|        |                                                                                          | CPK009-G        | CPK010-G        |                              |
|        |                                                                                          | (SEQ ID NO: 31) | (SEQ ID NO: 32) |                              |
|        |                                                                                          | 61-67-          | 61-67-          | ADEI <sup>-225</sup> a 653   |
|        |                                                                                          | CPK011-G        | CPK012G         |                              |
|        |                                                                                          | (SEQ ID NO: 33) | (SEQ ID NO: 34) |                              |
|        | 100 ng de DNA genômico Y002                                                              | 61-67-          | 61-67-          | IDI1                         |
|        |                                                                                          | CPK047-G        | CPK064-G        |                              |
|        |                                                                                          | (SEQ ID NO: 54) | (SEQ ID NO: 69) |                              |
|        |                                                                                          | 61-67-          | 61-67-          | P <sub>GAL</sub>             |
|        |                                                                                          | CPK052-G        | CPK065-G        |                              |
|        |                                                                                          | (SEQ ID NO: 57) | (SEQ ID NO: 70) |                              |
|        | 100 ng cada de produtos de PCR ADEI <sup>-825</sup> a - 226 e ADEI <sup>-225</sup> a 653 | 61-67-          | 61-67-          | tHMGR                        |
|        |                                                                                          | CPK031-G        | CPK053-G        |                              |
|        |                                                                                          | (SEQ ID NO: 48) | (SEQ ID NO: 58) |                              |
|        |                                                                                          | 61-67-          | 61-67-          | ADEI <sup>-825</sup> a - 226 |
|        |                                                                                          | CPK009-G        | CPK012-G        |                              |
|        |                                                                                          | (SEQ ID NO: 31) | (SEQ ID NO: 34) |                              |
| 2      | 100 ng cada de                                                                           | 61-67-          | 61-67-          | IDI1-P <sub>GAL</sub>        |
|        | 100 ng cada de                                                                           | 61-67-          | 61-67-          | IDI1-P <sub>GAL</sub>        |

|   |                             |             |             |                         |       |
|---|-----------------------------|-------------|-------------|-------------------------|-------|
|   | produtos                    | de          | CPK047-G    | CPK052-G                |       |
|   | PCR IDI1 e P <sub>GAL</sub> | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |                         |       |
|   |                             | 54)         | 57)         |                         |       |
| 3 | 100 ng cada de              | 61-67-      | 61-67-      | IDI1-P <sub>GAL</sub> - |       |
|   | produtos                    | de          | CPK031-G    | CPK047-G                | tHMGR |
|   | PCR IDI1-P <sub>GAL</sub> e | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |                         |       |
|   | tHMGR                       | 48)         | 54)         |                         |       |

O plasmídeo pAM495 foi gerado inserindo-se a inserção ERG10-P<sub>GAL</sub>-ERG12 do pAM474 no vetor pAM469. O vetor pAM474 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA ERG10-P<sub>GAL</sub>-ERG12, que compreende o ORF do gene ERG10 da *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo ERG10 1 a 1347) (ERG10), o locus genético que contém promotores divergentes GAL1 e GAL10 da *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo GAL1 -1 a -668) (P<sub>GAL</sub>), e o ORF do gene ERG 12 da *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo ERG 12 1 a 1482) (ERG 12), no vetor de clonagem TOPO Zero Blunt II. O vetor pAM469 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA HIS3<sup>-32</sup> a <sup>-1000</sup>-HISMx- HIS3<sup>504</sup> a <sup>-1103</sup>, que compreende dois segmentos do locus HIS da *Saccharomyces cerevisiae* que se estende da posição de nucleotídeo -32 para a posição - 1000 e da posição de nucleotídeo 504 para a posição 1103, um marcador HISMX e um local de restrição de *Xma*I não nativo entre a sequência HIS3<sup>504</sup> a <sup>-1103</sup> e o marcador HISMX, no vetor de clonagem TOPO TA PCR2.1. Os fragmentos de DNA ERG10-P<sub>GAL</sub>-ERG12 e HIS3<sup>-32</sup> a <sup>-1000</sup>-HISMx- HIS3<sup>504</sup> a <sup>-1103</sup> foram gerados por amplificação por PCR como esquematizado na Tabela 4. Para a construção do pAM495, 400 ng de pAM474 e 100 ng de pAM469 foram digeridos por completo

usando a enzima de restrição *Xma*I, os fragmentos de DNA que correspondem à inserção ERG10-P<sub>GAL</sub>-ERG12 e o vetor pAM469 linearizado foram purificados em gel, 4 molaes equivalentes da inserção purificada foram ligados com 1 5 molar equivalente do vetor linearizado, que rende o vetor pAM495. A Figura 7D mostra um mapa da inserção ERG10-P<sub>GAL</sub>-ERG12 e a SEQ ID NO: 12 mostra a sequência de nucleotídeos do fragmento de DNA e as sequências de HIS3 de flaqueamento.

Tabela 4 - Amplificações por PCR realizadas para gerar pAM495

| Sessão | Modelo                      | Iniciador 1                       | Iniciador 2                          | Produto de PCR                  |
|--------|-----------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| 1      | 100 ng de DNA genômico Y007 | 61-67-CPK013-G<br>(SEQ ID NO: 35) | 61-67-CPK014alt-G<br>(SEQ ID NO: 36) | HIS3 <sup>-32</sup> a -<br>1000 |
|        |                             | 61-67-CPK017-G<br>(SEQ ID NO: 39) | 61-67-CPK0018G<br>(SEQ ID NO: 40)    | HIS3 <sup>504</sup> a -<br>1103 |
|        |                             | 61-67-CPK03-G<br>(SEQ ID NO: 50)  | 61-67-CPK056-G<br>(SEQ ID NO: 61)    | ERG10                           |
|        |                             | 61-67-CPK057-G<br>(SEQ ID NO: 62) | 61-67-CPK058-G<br>(SEQ ID NO: 63)    | P <sub>GAL</sub>                |
|        |                             | 61-67-                            | 61-67-                               | ERG12                           |

|   |                              |                 |                 |                          |
|---|------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
|   |                              | CPK040-G        | CPK059-G        |                          |
|   |                              | (SEQ ID NO: 51) | (SEQ ID NO: 64) |                          |
|   | 100 ng de DNA                | 61-67-          | 61-67-          | HISMX                    |
|   | de plasmídeo                 | CPK015alt-G     | CPK016-G        |                          |
|   | pAM330**                     | (SEQ ID NO: 37) | (SEQ ID NO: 38) |                          |
| 2 | 100 ng cada de               | 61-67-          | 61-67-          | HIS3 <sup>504</sup> a -  |
|   | produtos de                  | CPK015alt-G     | CPK018-G        | 1103                     |
|   | PCR HIS3 <sup>504</sup> a -  | (SEQ ID NO: 37) | (SEQ ID NO: 40) |                          |
|   | 1103 e HISMX                 |                 |                 |                          |
|   | 100 ng cada de               | 61-67-          | 61-67-          | ERG10-P <sub>GAL</sub>   |
|   | produtos de                  | CPK035-G        | CPK058-G        |                          |
|   | PCR ERG10 e                  | (SEQ ID NO: 50) | (SEQ ID NO: 63) |                          |
|   | P <sub>GAL</sub>             |                 |                 |                          |
| 3 | 100 ng cada de               | 61-67-          | 61-67-          | HIS3 <sup>-32</sup> a -  |
|   | produtos de                  | CPK013-G        | CPK018-G        | 1000 -HISMX-             |
|   | PCR HIS3 <sup>-32</sup> a -  | (SEQ ID NO: 35) | (SEQ ID NO: 40) | HIS3 <sup>-32</sup> a -  |
|   | 1000 e HISMX-                |                 |                 | 1000                     |
|   | HIS3 <sup>-32</sup> a - 1000 |                 |                 |                          |
|   | 100 ng cada de               | 61-67-          | 61-67-          | ERG10 - P <sub>GAL</sub> |
|   | produtos de                  | CPK035-G        | CPK040-G        | - ERG12                  |
|   | PCR ERG10 -                  | (SEQ ID NO: 50) | (SEQ ID NO: 51) |                          |
|   | P <sub>GAL</sub> e ERG12     |                 |                 |                          |

\*\* O marcador HISMX em pAM330 originado a partir do pFA6a-HISMX6-PGAL1 conforme descrito por van Dijken ET AL. ((2000) Enzyme Microb. Technol. 26(9 a 10): 706 a 714).

O plasmídeo pAM497 foi gerado inserindo-se a inserção ERG8-P<sub>GAL</sub>-ERG19 do pAM475 no vetor pAM470. O vetor pAM475 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA ERG8-P<sub>GAL</sub>-

ERG19, que compreende o ORF do gene ERG8 da *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo ERG8 1 a 1512) (ERG8), o lócus genético que contém os promotores divergentes GAL1 e GAL10 da *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo

5 GAL1 -1 a -668) ( $P_{GAL}$ ), e o ORF do gene ERG19 da *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo ERG19 1 a 1341) (ERG19), no vetor de clonagem TOPO Zero Blunt II. O vetor pAM470 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA LEU2<sup>-100 a 450</sup> -HISMX- LEU2<sup>1096 a 1770</sup>, que compreende dois

10 segmentos do lócus LEU2 da *Saccharomyces cerevisiae* que se estende da posição de nucleotídeo -100 para a posição 450 e da posição de nucleotídeo 1096 para a posição 1770, um marcador HISMX, e um local de restrição de *Xma*I não nativo entre a sequência LEU2<sup>1096 a 1770</sup> e o marcador HISMX, no vetor

15 de clonagem TOPO TA pCR2.1. Os fragmentos de DNA LEU2<sup>-100 a 450</sup> -HISMX- LEU2<sup>1096 a 1770</sup> foram gerados por amplificação por PCR como esquematizado na Tabela 5. Para a construção do pAM497, 400 ng de pAM475 e 100 ng de pAM470 foram digeridos por completo usando a enzima de restrição *Xma*I, os

20 fragmentos de DNA que correspondem à inserção ERG8- $P_{GAL}$ -ERG19 e ao vetor pAM470 linearizado foram purificados e 4 molaes equivalentes da inserção purificada foram ligados com 1 molar equivalente do vetor linearizado, que rende o vetor pAM497. A Figura 7E para um mapa da inserção ERG8-

25  $P_{GAL}$ -ERG19, e a SEQ ID NO: 13 mostra a sequência de nucleotídeos do fragmento de DNA e as sequências de LEU2 de flaqueamento.

Tabela 5 - Amplificações por PCR realizadas para gerar pAM495

| Sessão | Modelo                              | Iniciador 1     | Iniciador 2     | Produto de PCR              |
|--------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|
| 1      | 100 ng de DNA genômico Y007         | 61-67-          | 61-67-          | LEU2 <sup>-100 a 450</sup>  |
|        |                                     | CPK019-G        | CPK020-G        |                             |
|        |                                     | (SEQ ID NO: 41) | (SEQ ID NO: 41) |                             |
|        |                                     | 61-67-          | 61-67-          | LEU2 <sup>1096 a 1770</sup> |
|        | 100 ng de DNA de plasmídeo pAM330** | CPK023-G        | CPK024G         |                             |
|        |                                     | (SEQ ID NO: 45) | (SEQ ID NO: 46) |                             |
|        |                                     | 61-67-          | 61-67-          | HISMX                       |
|        |                                     | CPK021-G        | CPK022-G        |                             |
|        |                                     | (SEQ ID NO: 43) | (SEQ ID NO: 44) |                             |
|        | 100 ng de DNA genômico Y007         | 61-67-          | 61-67-          | ERG8                        |
|        |                                     | CPK041-G        | CPK022-G        |                             |
|        |                                     | (SEQ ID NO: 52) | (SEQ ID NO: 65) |                             |
|        |                                     | 61-67-          | 61-67-          | P <sub>GAL</sub>            |
|        |                                     | CPK061-G        | CPK062-G        |                             |
|        |                                     | (SEQ ID NO: 66) | (SEQ ID NO: 67) |                             |
|        |                                     | 61-67-          | 61-67-          | ERG19                       |
|        |                                     | CPK046-G        | CPK063-G        |                             |
|        |                                     | (SEQ ID NO: 53) | (SEQ ID NO: 68) |                             |
| 2      | 100 ng cada de produtos de          | 61-67-          | 61-67-          | HISMX-                      |
|        |                                     | CPK021-G        | CPK024-G        | LEU2 <sup>1096 a</sup>      |

PCR LEU2<sup>1096</sup> a (SEQ ID NO: (SEQ ID NO: 1770  
 1770 e HISMX 43) 46)  
 100 ng cada de 61-67- 61-67- ERG8-P<sub>GAL</sub>  
 produtos de CPK041-G CPK062-G  
 PCR ERG8 e P<sub>GAL</sub> (SEQ ID NO: (SEQ ID NO:  
 52) 67)  
 3 100 ng cada de 61-67- 61-67- LEU2<sup>-100</sup> a 450  
 produtos de CPK019-G CPK024-G - HISMX-  
 PCR LEU2<sup>-100</sup> a (SEQ ID NO: (SEQ ID NO: LEU2<sup>1096</sup> a  
 450 e HISMX- 41) 46) 1770  
 LEU2<sup>1096</sup> a 1770  
 100 ng cada de 61-67- 61-67- ERG8 - P<sub>GAL</sub>  
 produtos de CPK041-G CPK046-G - ERG19  
 PCR ERG8 - P<sub>GAL</sub> (SEQ ID NO: (SEQ ID NO:  
 e ERG19 52) 53)

\*\* O marcador HISMX em pAM330 originado a partir do pFA6a-  
 HISMX6-PGAL1 conforme descrito por van Dijken ET AL. ((2000)  
 Enzyme Microb. Technol. 26(9 a 10): 706 a 714).

O plasmídeo pAM584 foi gerado inserindo-se o  
 fragmento de DNA GAL7<sup>4</sup> a 1021-HPH-GAL1<sup>1637</sup> a 2587 no vetor de  
 clonagem TOPO ZERO Blunt II (Invitrogen, Carlsbad, CA). O  
 5 fragmento de DNA GAL7<sup>4</sup> a 1021-HPH-GAL1<sup>1637</sup> a 2587 compreende um  
 segmento do ORF do gene GAL7 da *Saccharomyces cerevisiae*  
 (posições de nucleotídeo GAL7 4 a 1021) (GAL7<sup>4</sup> a 1021), o  
 cassete de resistência a higromicina (HPH) e um segmento da  
 região não traduzida 3' (UTR) do gene GAL1 da *Saccharomyces*  
 10 *cerevisiae* (posição de nucleotídeos GAL1 1637 a 2587). O  
 fragmento de DNA foi gerado por amplificação por PCR como  
 esquematizado na Tabela 6. A Figura 7F mostra um mapa e a

SEQ ID NO: 102 a sequência de nucleotídeo do fragmento de DNA GAL7<sup>4</sup> a 1021-HPH-GAL1<sup>1637</sup> a 2587.

Tabela 6 - Amplificações por PCR realizadas para gerar pAM495

| Sessão de PCR | Modelo                                                                                | Iniciador 1                         | Iniciador 2                         | Produto de PCR                                               |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 1             | 100 ng de DNA genômico Y002                                                           | 91-014-CPK236-G<br>(SEQ ID NO: 126) | 91-014-CPK237-G<br>(SEQ ID NO: 127) | GAL7 <sup>4</sup> a 1021                                     |
|               |                                                                                       | 91-014-CPK232-G<br>(SEQ ID NO: 124) | 91-014-CPK233-G<br>(SEQ ID NO: 125) | GAL1 <sup>1637</sup> a 2587                                  |
|               | 100 ng de DNA de plasmídeo pAM330**                                                   | 91-014-CPK231-G<br>(SEQ ID NO: 123) | 91-014-CPK238-G<br>(SEQ ID NO: 128) | HPH                                                          |
| 2             | 100 ng cada de produtos de PCR GAL7 <sup>4</sup> a 1021 e HPH                         | 91-014-CPK231-G<br>(SEQ ID NO: 123) | 91-014-CPK236-G<br>(SEQ ID NO: 126) | GAL7 <sup>4</sup> a 1021 - HPH                               |
| 3             | 100 ng cada de produtos de PCR GAL1 <sup>1637</sup> a 2587 e GAL7 <sup>4</sup> a 1021 | 91-014-CPK233-G<br>(SEQ ID NO: 125) | 91-014-CPK236-G<br>(SEQ ID NO: 126) | GAL1 <sup>1637</sup> a 2587 - GAL7 <sup>4</sup> a 1021 - HPH |
|               |                                                                                       | - HPH                               |                                     |                                                              |

\*\* O plasmídeo pAM547 foi gerado sinteticamente e compreende o cassete HPH, que consiste da sequência de codificação para a higromicina B fosfotransferase de *Escherichia coli*

flanqueada pelo promotor e terminador do gene *Tef1* de *Kluyveromyces lactis*.

O cassete integração  $\text{natA-P}_{\text{CTR3}}^{-1}$  a  $-734$  foi gerado amplificando-se por PCR o marcador *natA* usando os iniciadores PW287-002-CPK1217 (SEQ ID NO: 104) e DE\_PW91-027-CPK262-G (SEQ ID NO: 99) e usando o DNA de plasmídeo  
 5 que compreende o promotor TEF1 e o terminator do *Kluyveromyces lactis* (acesso do GenBank CR382122 REGIONS:788874..789380 e 787141..787496, respectivamente) e o marcador de resistência nat. Em adição, o promotor do gene CTR3 gene da *Saccharomyces cerevisiae* foi amplificado  
 10 por PCR a partir do DNA genômico Y002 das posições -1 a -734 usando os iniciadores PW287- 002-CPK1232 (SEQ ID NO: 100) e DE\_PW91-027-CPK263-G (SEQ ID NO: 101). Os 2 produtos de PCR foram unidos em uma reação de PCR secundária usando 25 ng de cada um dos fragmentos de PCR purificados em gel e  
 15 os iniciadores PW287-002-CPK1217 e PW287- 002-CPK1232, que rende o cassete de integração  $\text{natA-P}_{\text{CTR3}}^{-1}$  a  $-734$ .

Os cassetes de integração recombinante adicionais foram gerados unindo-se os RABits. Os RABits foram gerados inserindo-se os fragmentos de DNA de interesse (MULEs) no  
 20 vetor de Entrada pMULE.

O vetor de Entrada pMULE foi amplificado por PCR usando os iniciadores Kl 62 (SEQ ID NO: 73) e Kl 63 (SEQ ID NO: 74) e o vetor de Entrada pRYSE 8 (SEQ ID NO: 14) como modelo. A mistura de reação foi separada por eletroforese  
 25 em gel e a cadeia principal do vetor de aproximadamente 2,2 kb foi purificado em gel. Um fragmento de DNA que compreende a sequência de codificação *lacZ* foi gerado digerindo-se por completo o vetor de Entrada pRYSE 8 usando

a enzima de restrição *Schl*, inativando por calor a enzima (20 min. a 65°C), separando a mistura de reação por eletroforese em gel, e purificando em gel o fragmento de DNA de aproximadamente 0,5 kb. O fragmento de DNA que  
 5 compreende a sequência de codificação *lacZ* foi ligado com a cadeia principal do vetor purificada, rendendo o vetor de Entrada pMULE (veja a Figura 8 para um mapa de plasmídeo).

Os MULEs foram amplificados PCR usando modelos e iniciadores como esquematizado na Tabela 7. As  
 10 amplificações por PCR foram feitas usando a polimerase de DNA Phusion (New England Biolabs, Ipswich, MA) conforme pelo protocolo sugerido do fabricante.

Tabela 7 - MULEs amplificados

| MULE                 | Iniciadores                                                    | Modelo       | Tamanho<br>(bp) |
|----------------------|----------------------------------------------------------------|--------------|-----------------|
| 5'ERG20-<br>pGAL1/10 | YD-198-75A (SEQ ID<br>NO: 94)<br>YD-198-75B (SEQ ID<br>NO: 95) | pAM489       | 1.012           |
| mIS2081              | YD-198-75F (SEQ ID<br>NO: 96)<br>YD-198-75H (SEQ ID<br>NO: 98) | Genetrix2081 | 1.836           |
| mIS2081T             | YD-198-75G (SEQ ID<br>NO: 97)<br>YD-198-75H (SEQ ID<br>NO: 98) | Genetrix2081 | 1.668           |
| tTDH3                | RYSE 4 (SEQ ID NO:<br>77)<br>RYSE 7 (SEQ ID NO:                | RABit63*     | 311             |

78)

|      |                             |       |
|------|-----------------------------|-------|
| Hyg  | YD-198-75L (SEQ ID RABit21* | 1.962 |
|      | NO: 105)                    |       |
|      | YD-198-75M (SEQ ID          |       |
|      | NO: 106)                    |       |
| TRP1 | YD-198-75N (SEQ ID pAM489   | 586   |
|      | NO: 107)                    |       |
|      | YD-198-75O (SEQ ID          |       |
|      | NO: 108)                    |       |

\* RABit21 compreende a SEQ ID NO: 15 e RABit63 compreende a SEQ ID NO: 16.

Os RABits foram gerados inserindo-se os MULEs no vetor de Entrada pMULE. As reações de PCR separadas por eletroforese em gel, os MULEs foram purificados em gel, os MULEs purificados foram tratados com quinase de polinucleotídeo T4 (PNK) (New England Biolabs, Ipswich, MA) conforme pelo protocolo sugerido do fabricante e a PNK foi inativada por calor a 65°C por 20 minutos. O vetor de Entrada pMULE foi digerido por completo usando a enzima de restrição *Schl*, as cadeias principais do vetor de Entrada pMULE de aproximadamente 2,2 kb (sem *lacZ*) foram purificadas em gel, a cadeia principal do vetor de Entrada pMULE foi tratada com Fosfatase Antártica (New England Biolabs, Ipswich, MA) e a fosfatase foi inativada por calor a 65°C por 20 minutos. A cadeia principal do vetor de Entrada pMULE foi ligada com cada um dos MULEs amplificados, rendendo os RABits.

Os RABits a serem unidos (Tabela 8) foram postos juntos em um tubo (333 fmole de cada RABit) e digeridos por

completo usando a enzima de restrição *Lg*ul (Fermentas, Glen Burnie, MD). A enzima de restrição foi inativada por calor por 20 minutos a 65°C. As reações de digestão do RABit foram divididas em três reações de 30 uL; água, tampão, 5 dNTPs e polimerase de DNA foram adicionados para cada mistura de reação e uma primeira sessão de amplificação por PCR foi iniciada. As amostras foram postas no gelo, 0,5 uM de cada iniciador terminal (Tabela 8) foi adicionado às misturas de reação e uma segunda sessão de amplificação por 10 PCR foi realizada. As três misturas de reação de PCR foram combinadas em um tubo, as misturas de reação foram separadas por eletroforese em gel e os produtos de PCR foram purificados em gel. A Figura 7G mostra um mapa dos cassetes de integração.

Tabela 8 - Amplificação de Cassetes de Integração

| Cassetes de Integração | RABits a serem combinados                         | Iniciadores Terminais para 2ª sessão de amplificação por PCR |
|------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| i00280                 | 5' ERG20-pGAL1/10 - mIS2081 - tTDH3 - Hyg - TRP1  | YD-198-75A (SEQ ID NO: 94)                                   |
| i00281                 | 5' ERG20-pGAL1/10 - mIS2081T - tTDH3 - Hyg - TRP1 | YD-198-750 (SEQ ID NO: 108)                                  |

A primeira sessão de amplificação por PCR foi realizada conforme segue: um ciclo de desnaturação a 98°C por 2 minutos; 5 ciclos de desnaturação a 98°C por 30 segundos e recozimento/extensão a 72°C por 30 segundos por quilibase de produto de PCR. A segunda sessão de amplificação por PCR foi realizada conforme segue: um ciclo de desnaturação a 98°C por 2

minutos; 35 sessões de desnaturação a 98°C por 12 segundos e recozimento/extensão a 72°C por 20 segundos por quilobase de produto de PCR; um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos; e uma manutenção final a 4°C.

### Exemplo 3

Este exemplo descreve os métodos para gerar cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que expressam isopreno sintase heterólogas.

5                   As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1C (Y002) (MATA; ura3-52; trp1-289; Ieu2-3,112; his3Δ1 ; MAL2-8C; SUC2) e CEN.PK2-1D (Y003) (MATα; ura3-52; trp1-289; Ieu2-3,112; his3Δ1 ; MAL2-8C; SUC2) (van Dijken et al. (2000) Enzyme Microb. Technol. 26(9-10):706 a 714) foram  
 10 preparadas por introdução dos genes de via do MEV induzíveis substituindo-se o promotor ERG9 pelo promotor MET3 *Saccharomyces cerevisiae*, e o ORF ADE1 pelo gene LEU2 *Candida glabrata* (CgLEU2). Isto foi feito amplificando-se por PCR a região KanMX-PMET3 do vetor pAM328 (SEQ ID NO:  
 15 17) usando os iniciadores 50-56-pw100-G (SEQ ID NO: 19) e 50-56-pw101-G (SEQ ID NO: 20), que incluem 45 pares de base de homologia para o promotor ERG9 nativo, transformando 10 µg do produto PCR resultante em células Y002 de Y003 de crescimento exponencial usando 40% de peso/peso de  
 20 Polietileno Glicol 3350 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 100 mM de Acetato de (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 10 µg de DNA de Esperma de Salmão (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), e incubando as células a 30°C por 30 minutos seguido por choque térmico a 42°C por 30 minutos (Schiestl and Gietz.  
 25 (1989) Curr. Genet. 16, 339-346). Recombinações positivas foram identificadas por sua habilidade de crescer em meio

rico que contém 0,5 µg/ml de Geneticina (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), e colônias selecionadas foram confirmadas por diagnóstico de PCR. Aos clones resultantes foram dadas as designações Y93 (MAT A) e Y94 (MAT alfa). O locus genético CgLEU2 de 3,5 kb foi então amplificado a partir do DNA genômico da *Candida glabrata* (ATCC, Manassas, VA) usando os iniciadores 61-67- CPK066-G (SEQ ID NO: 71) e 61-67-CPK067-G (SEQ ID NO: 72), que contêm 50 pares de base de homologia flanqueada do ORF *ADE1*, e 10 µg do produto de PCR resultante foram transformados em células Y93 e Y94 de crescimento exponencial, recombinantes positivos foram selecionados para crescimento na ausência de suplementação de leucina e aos clones selecionados foram dadas as designações Y 176 (MAT A) e Y177 (MAT alfa).

15           A cepa Y188 foi gerada digerindo-se 2 µg de DNA de plasmídeo pAM491 e pAM495 por completo usando endonuclease de restrição *PmeI* (New England Biolabs, Beverly, MA), e introduzindo a inserção de DNA purificado nas células Y176 de crescimento exponencial. Os recombinantes positivos foram selecionados por crescimento em meio sem uracila e histidina e a integração no locus genético correto foi confirmada por diagnóstico de PCR.

25           A cepa Y189 foi gerada digerindo-se 2 µg DNA de plasmídeo pAM489 e pAM497 plasmídeo DNA por completo usando endonuclease de restrição *PmeI*, e introduzindo a inserção de DNA purificado nas células Y177 de crescimento exponencial. Os recombinantes positivos foram selecionados por crescimento em meio sem triptofano e histidina e a integração no locus genético correto foi confirmada por diagnóstico de PCR.

30

A cepa Y238 foi gerada misturando-se aproximadamente  $1 \times 10^7$  células das cepas Y188 e Y189 em uma placa média YPD por 6 horas à temperatura ambiente para permitir a combinação e disposição em placa da cultura de  
 5 célula misturada para meio sem histidina, uracila e triptofano para selecionar para crescimento de células diplóides, digerindo 2 µg de DNA de plasmídeo pAM493 por completo usando a endonuclease de restrição *PmeI*, e introduzindo a inserção de DNA purificada nas células  
 10 diplóides de crescimento exponencial. Os recombinantes positivos foram selecionados por crescimento em meio sem adenina e a integração no locus genético correto foi confirmada por diagnóstico de PCR.

As cepas Y210 (Mat A) e Y211 (MAT alfa) foram  
 15 geradas esporulando-se a cepa Y238 em 2% de Acetato de Potássio e 0,02% de meio líquido de Rafinose, isolando aproximadamente 200 tétrades genéticas usando um micromanipulador Singer Instruments série MSM300 (Singer Instrument LTD, Somerset, UK), identificando isolados  
 20 genéticos independentes que contêm o complemento apropriado de material genético introduzido por sua habilidade de crescimento na ausência de adenina, histidina, uracila e triptofano e confirmando a integração de todos os DNAs introduzidos por diagnóstico de PCR.

25 A Cepa Y258 foi gerada transformando-se a cepa Y211 com o DNA de plasmídeo pAM404. Transformantes de célula hospedeira foram selecionados em meios definidos sintéticos, que contêm 2% de glicose e todos os aminoácidos exceto leucina (SM-glu). As colônias únicas foram  
 30 transferidas para ampolas de cultura que contêm 5 mL de

líquido SM-glu sem leucina, e as culturas foram incubadas por agitação 30°C até que o crescimento alcançou a fase estacionária. As células foram armazenadas a -80°C em ampolas criogênicas em 1 mL de alíquotas congeladas feitas  
 5 de 400 uL 50% de glicerol esterilizado e 600 uL de cultura líquida.

As cepas Y225 (MAT A) e Y227 (MAT alfa) foram geradas transformando-se as células Y210 e Y211 de crescimento exponencial, respectivamente, com 2 µg de  
 10 pAM426 (SEQ ID NO: 18), que compreende m promotor GAL1 promoter vinculado de maneira operável à sequência de codificação de um gene da amorfa-4,11-dieno sintase que é otimizado por códon para expressão na *Saccharomyces cerevisiae* (Merke et al. (2000) Ach. Biochem. Biophys. 381  
 15 : 173 a 180). Transformantes de célula hospedeira foram selecionados em meios definidos sintéticos completos sem leucina.

A Cepa Y337 foi gerada a partir da cepa Y227 tornando a cepa incapaz de catabolizar galactose. Para esse  
 20 fim, o DNA de plasmídeo pAM584 foi digerido por completo usando endonuclease de restrição *PmeI*, e a inserção de DNA purificada GAL7<sup>4</sup> a 1021-HPH- GAL1<sup>1637</sup> a 2587 foi introduzida nas células Y227 de crescimento exponencial. Os recombinantes positivos foram selecionados por crescimento em meio sólido  
 25 sem adenina, leucina, lisina, histidina, metionina, uracila e triptofano e que contêm 900 µg/mL de higromicina B (Sigma, St. Louis, MO). A integração no locus genético correto foi confirmada por diagnóstico de PCR e testando-se a cepa por inabilidade de usar galactose como uma fonte de  
 30 carbono.

Cepa Y615 foi gerada a partir da cepa Y337 substituindo-se a quadro de leitura aberto URA3 pelo quadro de leitura aberto hisG da *Salmonella* sp.. Um fragmento de DNA que compreende o quadro de leitura aberto hisG foi amplificado por PCR do pAM840 usando os iniciadores 100-150-KB034-G (SEQ ID NO: 109) e 100-150-KB039-G (SEQ ID NO: 110), e o fragmento de DNA purificado foi introduzido nas células Y337 de crescimento exponencial. Os recombinantes positivos foram selecionados por sua habilidade de crescimento em meio que contém ácido 5-fluorótico e por sua incapacidade de crescer em meio sem uracila. A integração no locus genético correto foi confirmada por diagnóstico de PCR.

A Cepa Y1775 foi gerada a partir da cepa Y615 substituindo-se o marcador kanMX pelo marcador URA3. Um fragmento de DNA que encodifica o marcador auxotrófico URA3 da *S. cerevisiae* foi amplificado por PCR a partir do pAM64 (SEQ ID NO: 103) usando os iniciadores PW-191-046-CPK1212-G (SEQ ID NO: 111) e PW-191-046-CPK1213-G (SEQ ID NO: 112), e o fragmento de DNA purificado foi introduzido nas células Y615 de crescimento exponencial. Os recombinantes positivos foram selecionados por crescimento em meio sem adenina, leucina, lisina, histidina, metionina, uracila e triptofano. A integração no locus genético correto foi confirmada por diagnóstico de PCR.

A Cepa Y1791 foi gerada a partir da cepa Y1775 restaurando-se o locus ERG9. Um fragmento de DNA que compreende o quadro de leitura aberto ERG9 foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico Y002 usando os iniciadores PW-191-015-CPK947-G (SEQ ID NO: 113) e PW-191-015-CPK950-G

(SEQ ID NO: 114), e o fragmento de DNA purificado foi introduzido nas células Y1775 de crescimento exponencial. Os recombinantes positivos foram selecionados por sua habilidade de crescimento em meio que contém ácido 5-fluorótico e sua inabilidade de crescer em meio sem uracila. A integração no locus genético correto foi confirmada por diagnostico de PCR.

A Cepa Y1856 foi gerada a partir da cepa Y1791 restaurando-se os locus GAL1, GAL10 e GAL7. Um fragmento de DNA que compreende a região genômica GAL1, GAL10 e GAL7 foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico Y002 usando os iniciadores PW-91-093 - CPK453-G (SEQ ID NO: 115) e PW-091-144-CPK689-G (SEQ ID NO: 116), e o fragmento de DNA purificado foi introduzido nas células Y1791 de crescimento exponencial. Os recombinantes positivos foram selecionados por crescimento em meio que contém 20 g/L de glactose e sua inabilidade de crescer em meio que contém 900 µg/mL de higromicina B.

A cepa Y1 857 foi gerada a partir da cepa Y1 856 pelo rompimento do locus  $P_{GAL10}$ -ERG20. Um fragmento de DNA que encodifica o marcador auxotrófico de *S. cerevisiae* URA3 foi amplificado por PCR a partir de pAM64 (SEQ ID NO: 130) pelo uso de iniciadores PW-287-002-CPK1215-G (SEQ ID NO: 117) e PW-287-002-CPK1216-G (SEQ ID NO: 118), e o fragmento de DNA purificado foi introduzido nas células 856 cultivadas exponencialmente. Os recombinantes positivos foram selecionados por crescimento em meio sem adenina, leucina, lisina, histidina, metionina, uracila e triptofano. A integração no locus genético correto foi confirmada pelo diagnóstico de PCR.

A cepa Yl 895 foi gerada a partir da cepa Yl 857 pela cura da cepa a partir de pAM426. A cepa Yl 857 foi propagada em um meio de Extrato de Levedura-Peptona-Dextrose (YPD) rico que contém 0,5% de leucina (p/v) por 5 dias. A cada 12 horas, novo YPD com 0,5% de LEU era inoculado a um OD<sub>600</sub> de 0,05 que utilizava as 12 horas de crescimento antecedentes. Após 5 dias, as células foram plaqueadas em meio YPD Agar com 0,5% de leucina e incubadas a 30°C por 2 dias. As células curadas foram identificadas por sua habilidade de crescer em meio mínimo que contém leucina e sua inabilidade de crescer em meio em sem leucina.

A cepa Y736 foi gerada a partir da cepa Y227 pela substituição do marcador URA3 com um marcador hisG. Para esse fim, o marcador hisG foi amplificado por PCR pelo uso de iniciadores KB34 (SEQ ID NO: 75) e KB39 (SEQ ID NO: 76) e plasmídeo pAM840 como modelo. As células Y211 de crescimento exponencial foram transformadas com a mistura PCR e foram, então, plaqueadas em YPD durante uma noite. As células hospedeiras transformadas foram selecionadas por células de replicação em placa a partir das placas YPD em meios sólidos de Meio Sintético Completo (CSM) sem metionina e leucina e que contém 0,1% 5-FOA e 0,1 mg/ml de uracila.

A cepa Y737 foi gerada a partir da cepa Y736 pela transformação de células em crescimento exponencial com pAM940, e seleção de transformantes de célula hospedeira em meios sólidos de CSM sem leucina e uracila.

A cepa Y846 foi gerada a partir da cepa Y737 pela cura da cepa de pAM426. Para essa finalidade, a cepa Y737

foi cultivada por 3 noites sucessivas em meios ricos suplementados com 6x a concentração normal de leucina, sendo diluída a cada manhã 100x. As células foram, então, plaqueadas em colônias únicas bem separadas em meios ricos e replicadas em placas em meio mínimo sem leucina. As colônias cultivadas em meio rico, mas não crescem na ausência de leucina foram coletadas, cultivadas e testadas por PCR para verificar que o plasmídeo não estava mais presente. Tal colônia positiva foi estocada como Y846.

10           A cepa Yl 858 foi gerada a partir da cepa Yl 895 por expressão heteróloga de uma sintase de isopreno. Para essa finalidade, células Yl 895 de crescimento exponencial foram transformadas com expressão de plasmídeo pAM1547. As células hospedeiras transformadas foram selecionadas em CSM  
15 com Agar sem metionina e leucina e que contém 2% de glicose.

          A cepa Yl 859 foi gerada a partir da cepa Yl 895 por expressão heteróloga de uma sintase de isopreno. Para essa finalidade, as células Yl 895 de crescimento  
20 exponencial foram transformadas com expressão de plasmídeo pAM1548. As células hospedeiras transformadas foram selecionadas em CSM com Agar sem metionina e leucina e que contém 2% de glicose.

          A cepa Yl 860 foi gerada a partir da cepa Yl 895  
25 por expressão heteróloga de uma sintase de isopreno. Para essa finalidade, as células Yl 895 de crescimento exponencial foram transformadas com expressão de plasmídeo pAM1549. As células hospedeiras transformadas foram selecionadas em CSM com Agar sem metionina e leucina e que  
30 contém 2% de glicose.

A cepa Yl 861 foi gerada a partir da cepa Yl 895 por expressão heteróloga de uma sintase de isopreno. Para essa finalidade, as células Y 1895 de crescimento exponencial foram transformadas com expressão de plasmídeo pAM1550. As células hospedeiras transformadas foram selecionadas em CSM com Agar sem metionina e leucina e que contém 2% de glicose.

A cepa Yl 713 foi gerada a partir da cepa Y846 pela substituição do gene ERG20 com a sequência de códigos por uma isopreno sintase. Para essa finalidade, células Y846 de crescimento exponencial foram transformadas com cassete de integração i00280. As células hospedeiras transformadas foram selecionadas em YPD com Agar que contém 2% de glicose e 300 [µg/mL de higromicina B (A.G. Scientific, San Diego, CA).

A cepa Yl 714 foi gerada a partir da cepa Y846 pela substituição do gene ERG20 com uma sequência de códigos para uma isopreno sintase truncada. Para essa finalidade, as células Y846 de crescimento exponencial foram transformadas com cassete de integração i00281. As células hospedeiras transformadas foram selecionadas em YPD com Agar que contém 2% glicose e 300 [µg/mL de higromicina B (A.G. Scientific, San Diego, CA).

A cepa Yl 732 foi gerada a partir da cepa Y846 por expressão heteróloga de uma isopreno sintase. Para essa finalidade, as células Y846 de crescimento exponencial foram transformadas com expressão de plasmídeo pAM1549. As células hospedeiras transformadas foram selecionadas em CSM com Agar sem metionina e leucina e que contém 2% de glicose.

A cepa Yl 733 foi gerada a partir da cepa Y846 por expressão heteróloga de uma isopreno sintase truncada. Para essa finalidade, as células Y846 de crescimento exponencial foram transformadas com expressão de plasmídeo pAM1550. As células hospedeiras transformadas foram selecionadas em CSM com Agar sem metionina e leucina e que contém 2% de glicose.

A cepa Yl 837 foi gerada pela transformação células Yl 713 de crescimento exponencial com expressão de plasmídeo pAM1549. As células hospedeiras transformadas foram selecionadas em CSM com Agar sem metionina e leucina e que contém 2% de glicose.

A cepa Y 1838 foi gerada pela transformação de células Y 1714 de crescimento exponencial com expressão de plasmídeo pAM1550. As células hospedeiras transformadas foram selecionadas em CSM com Agar sem metionina e leucina e que contém 2% de glicose.

A cepa 1907 foi gerada a partir da cepa Y 1860 pela substituição do promotor ERG20 com o marcador de resistência de nourseothricin (natA) e o promotor repressível de cobre do gene CTR3 do *Saccharomyces cerevisiae*. Para essa finalidade, células Yl 860 que de crescimento exponencial foram transformadas com 200 µg do cassete de integração natA-P<sub>CTR3-1</sub> a -734. Os transformantes de células hospedeiras foram selecionados pelo crescimento em meios de YPD ricos que contém 300 µg/mL de nourseothricin (Werner Bio Agents, Jena, Alemanha).

#### Exemplo 4

Esse exemplo descreve métodos para produzir isopreno em cepas hospedeiras de *Saccharomyces cerevisiae*.

As colônias únicas de transformantes de célula hospedeira foram transferidas para ampolas de cultura que contêm 5 mL de Meio de Semente de Pássaro que contém 0,25  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ . No dia seguinte, 20 mL de Meio de Produção de Pássaro que contém 1,8% de galactose, 0,2% de glicose e 32  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ , com 4 mL de isopropilmiristato, foi inoculado com o transformante de célula hospedeira Y1 858, Y1859, Y1860, ou Y1861 a um OD600 de 0,05. Do mesmo modo, 20 mL de Meio de Produção de Pássaro que contém 1,8% de galactose e 0,2% de glicose, com 4 mL de isopropilmiristato, foi inoculado com isolados #3, 6, ou 9 de transformante de célula hospedeira Y1 907 a um OD600 de 0,05. À cultura Y1907, 0,25  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ , 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  ou 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  foi adicionado. Os frascos agitados foram vedados para cultivo anaeróbico e incubados a 30°C em um agitador rotativo a 200 rpm.

Após 72 horas de cultivo, as culturas foram testadas em ensaio para o crescimento celular. Ao mesmo tempo, 200  $\mu\text{L}$  de isopropilmiristato foi removido de cada frasco e foram injetados diretamente em um gás Agilent 7980 equipado com cromatógrafo com um detector de ionização de chama. Para acelerar o tempo de execução, o programa de temperatura e a matriz de coluna foram modificadas para atingir uma resolução ideal e o menor tempo de execução total (15.0 minutos). Casa amostra de 2  $\mu\text{L}$  foi dividida em 10:1 e foi separada pelo uso de uma sílica fundida Varian CP-PoraBond PLOT U (25 m x 0,32 mm x 7  $\mu\text{m}$ ; comprimento x largura x espessura de filme) coluna com hidrogênio como o gás de carreira. O programa de temperatura para a análise foi o seguinte: a coluna foi inicialmente mantida a 100°C

por 1 minuto, seguida por um gradiente de temperatura de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  para um temperatura de  $14^{\circ}\text{C}$ , seguida por um gradiente de temperatura de  $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$  para uma temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , seguida pela retenção da coluna a  $25^{\circ}\text{C}$  por 6,5 5 minutos. Sob essas condições, o isopreno elui em 5,8 minutos.

### REIVINDICAÇÕES

1. Método de purificação de isopreno **caracterizado** pelo fato de compreender:

- a. obter uma primeira composição gasosa que  
5 compreende isopreno e água, sendo que a composição gasosa compreende 1 parte por milhão ou menos de C2-C5 alcino;
- b. fluir a primeira composição gasosa através de um primeiro resfriador em que o primeiro resfriador tem uma temperatura entre cerca de 10°C e cerca de -15°C, o que  
10 resulta em uma segunda composição gasosa e sendo que a segunda composição gasosa compreende menos água do que a primeira composição gasosa;
- c. fluir a segunda composição gasosa através de um segundo resfriador sendo que o segundo resfriador tem  
15 uma temperatura abaixo de -35°C; e
- d. coletar a composição de isopreno líquido resultante.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a água está presente em uma  
20 primeira composição gasosa em uma quantidade que é maior do que 70% de sua quantidade saturada.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a primeira composição de isopreno gasoso compreende adicionalmente dióxido de  
25 carbono em uma quantidade entre cerca de 0,1% e cerca de 35% em volume.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a primeira composição gasosa compreende adicionalmente 1 parte por milhão ou menos de  
30 ciclopentadieno, piperileno e 1,4-pentadieno.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o primeiro resfriador é resfriado pelo uso de um sistema de refrigeração de propileno.

5 6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o primeiro resfriador é resfriado pelo uso de um sistema de refrigeração de amônia.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a composição gasosa é  
10 escoada através de um secador antes de fluir através do primeiro resfriador.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a composição gasosa é  
15 escoada através de um secador após fluir através do primeiro resfriador.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o segundo resfriador tem uma temperatura de cerca de -60°C a cerca de -85°C.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o segundo resfriador tem uma  
20 temperatura de menos do que cerca de -65°C.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o segundo resfriador é resfriado pelo uso de um sistema de refrigeração de  
25 etileno.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de compreender adicionalmente nitrogênio que remove a composição de isopreno líquido.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de compreender adicionalmente passar  
30

a primeira composição gasosa através de uma membrana de zeólito modificada para separar impurezas de hidrocarboneto do isopreno.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
5 **caracterizado** pelo fato de compreender adicionalmente passar a segunda composição gasosa através de uma membrana de zeólito modificada para separar impurezas de hidrocarboneto do isopreno.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
10 **caracterizado** pelo fato de compreender adicionalmente passar a composição de isopreno líquido através de uma membrana de zeólito modificada para separar impurezas de hidrocarboneto do isopreno.

16. Método para produzir isopreno **caracterizado**  
15 pelo fato de compreender:

a. cultivar uma pluralidade de células hospedeiras capazes de produzir isopreno;

b. formar uma primeira composição gasosa que compreende isopreno e água, sendo que a água está presente  
20 em uma quantidade maior do que cerca de 70% de sua quantidade saturada;

c. submeter a primeira composição gasosa a um primeira etapa de resfriamento pela qual, substancialmente, toda a água é removida da primeira composição gasosa, o que  
25 resulta em uma segunda composição gasosa; e

d. submeter a segunda composição gasosa a uma segunda etapa de resfriamento pela qual uma composição de isopreno líquido é coletada.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de compreender adicionalmente nitrogênio que separa a composição de isopreno líquido.

18. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que o isopreno está presente em uma quantidade que é cerca de 0,1% e cerca de 15% em volume na primeira composição gasosa.

19. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que a primeira composição gasosa compreende adicionalmente dióxido de carbono em uma quantidade entre cerca de 1% e cerca de 35% em volume.

20. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que a primeira etapa de resfriamento resfria a primeira composição gasosa até uma temperatura entre cerca de 10°C e cerca de -15°C.

21. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que a primeira etapa de resfriamento é resfriada pelo uso de um sistema de refrigeração de propileno.

22. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que a primeira etapa de resfriamento é resfriada por um sistema de refrigeração de amônia.

23. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que a segunda etapa de resfriamento resfria a segunda composição gasosa até uma temperatura entre cerca de -60°C e cerca de -85°C.

24. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que a segunda etapa de

resfriamento é resfriada pelo uso de um sistema de refrigeração de etileno.

25. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que as células hospedeiras são selecionadas a partir dos gêneros *Bacillus*, *Escherichia* ou *Acinetobacter*.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que as células hospedeiras são *Escherichia coli*.

27. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que as células hospedeiras são levedura.

28. Método, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado** pelo fato de que as células hospedeiras são *Saccharomyces cerevisie*.

29. Composição de isopreno gasoso, **caracterizada** pelo fato de compreender isopreno e água, sendo que a água está presente em uma quantidade que é maior do que cerca de 70% de sua quantidade saturada e sendo que a composição de isopreno gasoso compreende 1 parte por milhão ou menos do que os C2-C5 alcinos.

30. Composição, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizada** pelo fato de que o isopreno está presente em uma quantidade entre cerca de 0,1% e cerca de 15% em volume.

31. Composição, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizada** pelo fato de compreender adicionalmente dióxido de carbono em uma quantidade entre cerca de 1% e cerca de 35% em volume.

32. Composição de isopreno gasoso, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizada** pelo fato de que o isopreno está presente em uma quantidade entre cerca de 0,1% e cerca de 15% em volume e a água está presente em uma  
5 quantidade que é maior do que cerca de 90% de sua quantidade saturada e sendo que a composição de isopreno gasoso compreende adicionalmente dióxido de carbono em uma quantidade entre cerca de 1% e cerca de 35% em volume e nitrogênio em uma quantidade entre cerca de 50% e cerca de  
10 75% em volume.

33. Composição de isopreno líquido **caracterizada** pelo fato de compreender, pelo menos, 65% de isopreno por peso e sendo que a composição de isopreno compreende 1 parte por milhão ou menos de C2-C5 alcinos,  
15 ciclopentadieno, piperileno e 1,4-pentadieno.

34. Composição, de acordo com a reivindicação 33, sendo que a composição é **caracterizada** pelo fato de compreender, pelo menos, 95% de isopreno por peso.

35. Composição, de acordo com a reivindicação 33, sendo que a composição é **caracterizada** pelo fato de compreender, pelo menos, 99% de isopreno por peso.  
20

36. Composição, de acordo com a reivindicação 33, sendo que a composição é **caracterizada** pelo fato de compreender, pelo menos, 99,5% de isopreno por peso.

37. Composição, de acordo com a reivindicação 33, **caracterizada** pelo fato de que a composição de isopreno líquido compreende adicionalmente dióxido de carbono dissolvido que está presente em uma quantidade maior do que  
25 cerca de 0,01% por peso.

38. Composição, de acordo com a reivindicação 33, **caracterizada** pelo fato de que a composição de isopreno líquido compreende adicionalmente dióxido de carbono dissolvido que está presente em uma quantidade maior do que  
5 cerca de 0,1% por peso.

39. Método para produzir isopreno **caracterizado** pelo fato de compreender:

a. estabelecer o contato com uma pluralidade de células hospedeiras capazes de produzir isopreno em um meio  
10 aquoso, sendo que o meio aquoso está em contato com um líquido orgânico imiscível e o meio aquoso, as células hospedeiras e o líquido orgânico imiscível estão em um recipiente fechado; e

b. cultivar as células hospedeiras no meio aquoso  
: pelo qual as células hospedeiras produzem isopreno e o  
15 isopreno é capturado no líquido orgânico imiscível.  
:

40. Método, de acordo com a reivindicação 39, **caracterizado** pelo fato de compreender adicionalmente quantificar a quantidade de isopreno no líquido orgânico  
20 imiscível.

41. Método, de acordo com a reivindicação 39, **caracterizado** pelo fato de compreender adicionalmente separar o líquido orgânico imiscível do meio aquoso e separar o isopreno do líquido orgânico imiscível.

25 42. Método, de acordo com a reivindicação 39, **caracterizado** pelo fato de que o isopreno é separado do líquido orgânico pelo aquecimento do líquido orgânico até uma temperatura acima de 34°C.

43. Método, de acordo com a reivindicação 39,  
30 **caracterizado** pelo fato de que as células hospedeiras são

selecionadas a partir dos gêneros *Bacillus*, *Escherichia* ou *Acinetobacter*.

44. Método, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que as células hospedeiras são  
5 *Escherichia coli*.

45. Método, de acordo com a reivindicação 39, **caracterizado** pelo fato de que as células hospedeiras são levedura.

46. Método, de acordo com a reivindicação 45,  
10 **caracterizado** pelo fato de que as células hospedeiras são *Saccharomyces cerevisie*.

47. Sistema de produção de isopreno, **caracterizado** pelo fato de compreender:

- a. um recipiente fechado;
- 15 b. um meio aquoso, dentro do recipiente, que  
forma uma primeira fase;
- c. uma pluralidade de células hospedeiras, dentro do meio aquoso, capazes de fazer isopreno; e
- d. uma segunda fase de líquido orgânico, capaz de  
20 capturar o isopreno produzido pelas células hospedeiras, em contato com a primeira fase.

48. Sistema de produção de isopreno **caracterizado** pelo fato de compreender:

- a. um biorreator capaz de cultivar uma  
25 pluralidade de células hospedeiras;
- b. um primeiro resfriador e um tambor de vaporização operável conectado à corrente suspensa do biorreator, sendo que o primeiro resfriador é capaz de operar em uma faixa de temperatura entre 10°C e -15°C; e

c. um segundo resfriador e tambor de vaporização operáveis conectados à corrente suspensa que sai do primeiro resfriador e do tambor de vaporização, sendo que o segundo resfriador é capaz de operar em uma temperatura  
5 abaixo de  $-35^{\circ}\text{C}$ .

49. Sistema de produção de isopreno, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que o biorreator ter uma capacidade maior do que 100 litros.

50. Sistema de produção de isopreno, de acordo  
10 com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que a corrente suspensa que sai do segundo resfriador e do tambor de vaporização é operável conectada à entrada da corrente de resfriamento do primeiro resfriador.

51. Sistema de produção de isopreno, de acordo  
15 com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que o sistema compreende adicionalmente um separador de nitrogênio operável conectado à corrente de fundo que sai do segundo resfriador e tambor de vaporização.

52. Sistema de produção de isopreno, de acordo  
20 com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que o segundo resfriador é capaz de operar entre cerca de  $-65^{\circ}\text{C}$  e cerca de  $-85^{\circ}\text{C}$ .

53. Método de purificação de isopreno **caracterizado** pelo fato de compreender:

25 a. obter uma primeira composição gasosa que compreende:

i) isopreno em uma quantidade entre cerca de 0,1% e cerca de 15% em volume;

30 ii) dióxido de carbono em uma quantidade entre cerca de 0,04% e cerca de 35% em volume;

iii) oxigênio em uma quantidade entre cerca de 1% e cerca de 20% em volume;

iv) nitrogênio em uma quantidade maior do que cerca de 50% em volume;

5 v) argônio em uma quantidade menor do que cerca de 0,9% em volume;

vi) água em uma quantidade maior do que cerca de 70% de sua quantidade saturada;

vii) 1 parte por milhão ou menos de C2-C5 alcino, 10 ciclopentadieno, piperileno e 1,4-pentadieno; e

viii) etanol;

b. fluir a primeira composição gasosa através um primeiro resfriador e um tambor de vaporização operavelmente conectado, sendo que o primeiro resfriador  
15 tem uma temperatura de entre cerca de 10°C e cerca de -15°C  
que, assim, resulta em uma segunda composição gasosa e sendo que a segunda composição gasosa compreende menos água do que a primeira composição gasosa;

c. fluir a segunda composição gasosa através de  
20 uma segundo resfriador e tambor de vaporização operavelmente conectado, sendo que o segundo resfriador tem uma temperatura entre cerca de -35°C e cerca de -85°C; e

d. coletar a composição de isopreno líquido resultante.

25 54. Método, de acordo com a reivindicação 53, **caracterizado** pelo fato de a primeira composição gasosa ser obtida pela cultura de uma pluralidade de células hospedeiras capazes de fazer isopreno.

55. Método, de acordo com a reivindicação 54, **caracterizado** pelo fato de que as células hospedeiras são levedura.

56. Método, de acordo com a reivindicação 54, **caracterizado** pelo fato de que as células hospedeiras são *Saccharomyces cerevisie*.

57. Método, de acordo com a reivindicação 53, **caracterizado** pelo fato de a segunda composição gasosa resultante compreender menos de cerca de 3% por peso de água.

58. Método, de acordo com a reivindicação 53, **caracterizado** pelo fato de que a composição de isopreno líquido resultante compreende menos do que cerca de 1% por peso de água.

59. Método, de acordo com a reivindicação 53, **caracterizado** pelo fato de que a composição de isopreno líquido resultante compreende menos do que cerca de 1% por peso de dióxido de carbono.

60. Método, de acordo com a reivindicação 53, **caracterizado** pelo fato de que a composição de isopreno líquido resultante compreende menos do que cerca de 1% por peso de nitrogênio.

61. Método, de acordo com a reivindicação 53, **caracterizado** pelo fato de que a composição de isopreno líquido resultante compreende:

- i) pelo menos 65% de isopreno por peso; e
- ii) menos do que 1% água por peso.

62. Método, de acordo com a reivindicação 53, **caracterizado** pelo fato de que a composição de isopreno

líquido resultante compreende menos do que cerca de 1% por peso de etanol.

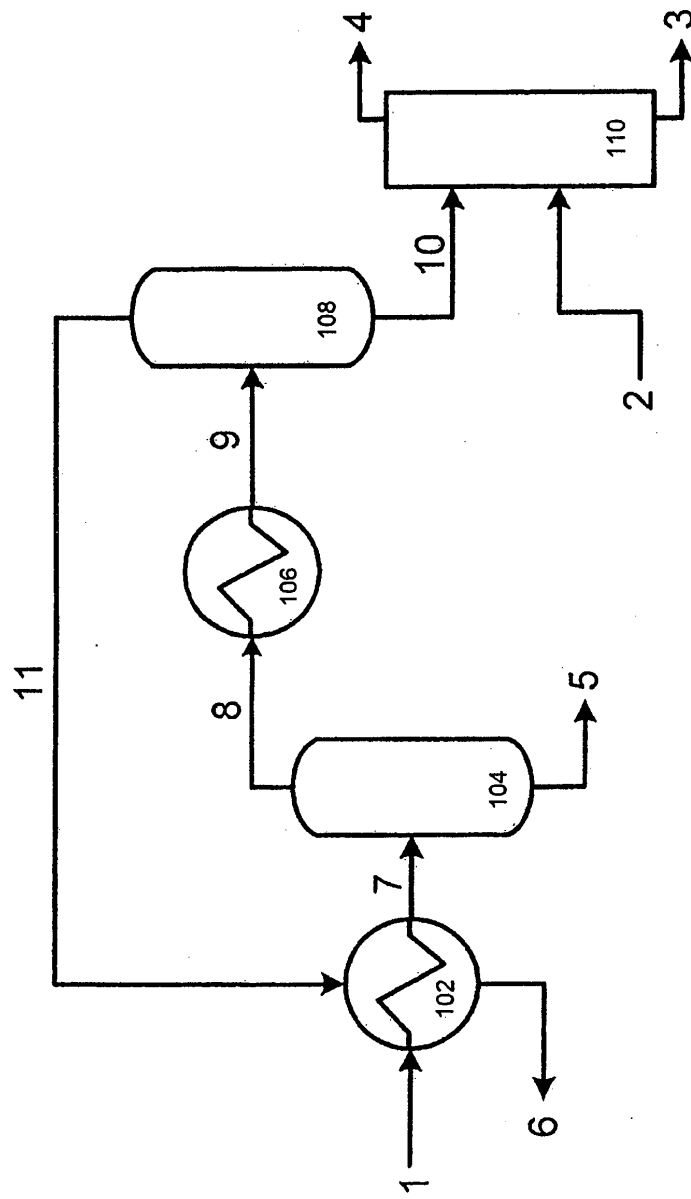
63. Método, de acordo com a reivindicação 53, **caracterizado** pelo fato de compreender adicionalmente  
5 nitrogênio que remove a composição de isopreno líquido.

64. Método, de acordo com a reivindicação 63, **caracterizado** pelo fato de que a composição de isopreno líquido compreende pelo menos 70% de isopreno por peso e menos do que 1% por peso de dióxido de carbono dissolvido.

10 65. Método, de acordo com a reivindicação 63, **caracterizado** pelo fato de que a composição de isopreno líquido compreende, pelo menos, 90% de isopreno por peso e menos do que 1% por peso de dióxido de carbono dissolvido.

15 66. Método, de acordo com a reivindicação 63, **caracterizado** pelo fato de que a composição de isopreno líquido compreende, pelo menos, 95% de isopreno por peso e menos do que 1% por peso de dióxido de carbono dissolvido.

20 67. Método, de acordo com a reivindicação 63, **caracterizado** pelo fato de que a composição de isopreno líquido compreende, pelo menos, 99% de isopreno por peso e menos do que 0,05% por peso de dióxido de carbono dissolvido.

**FIG. 1**

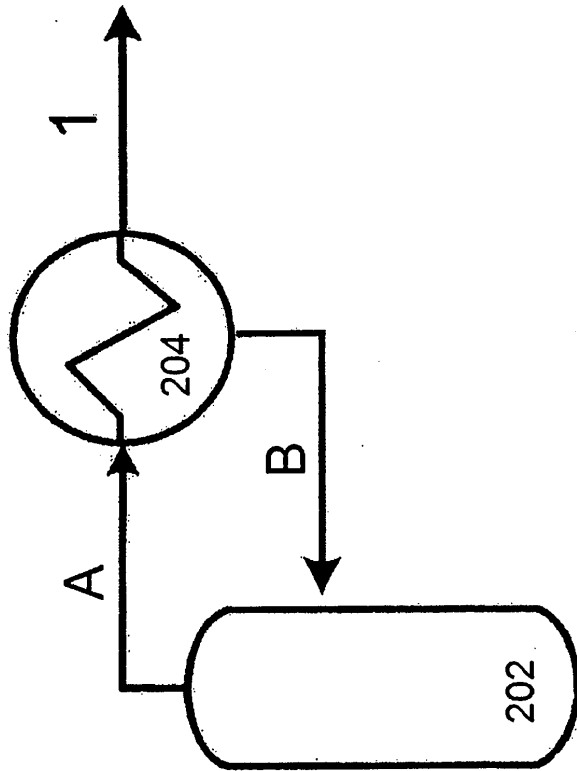
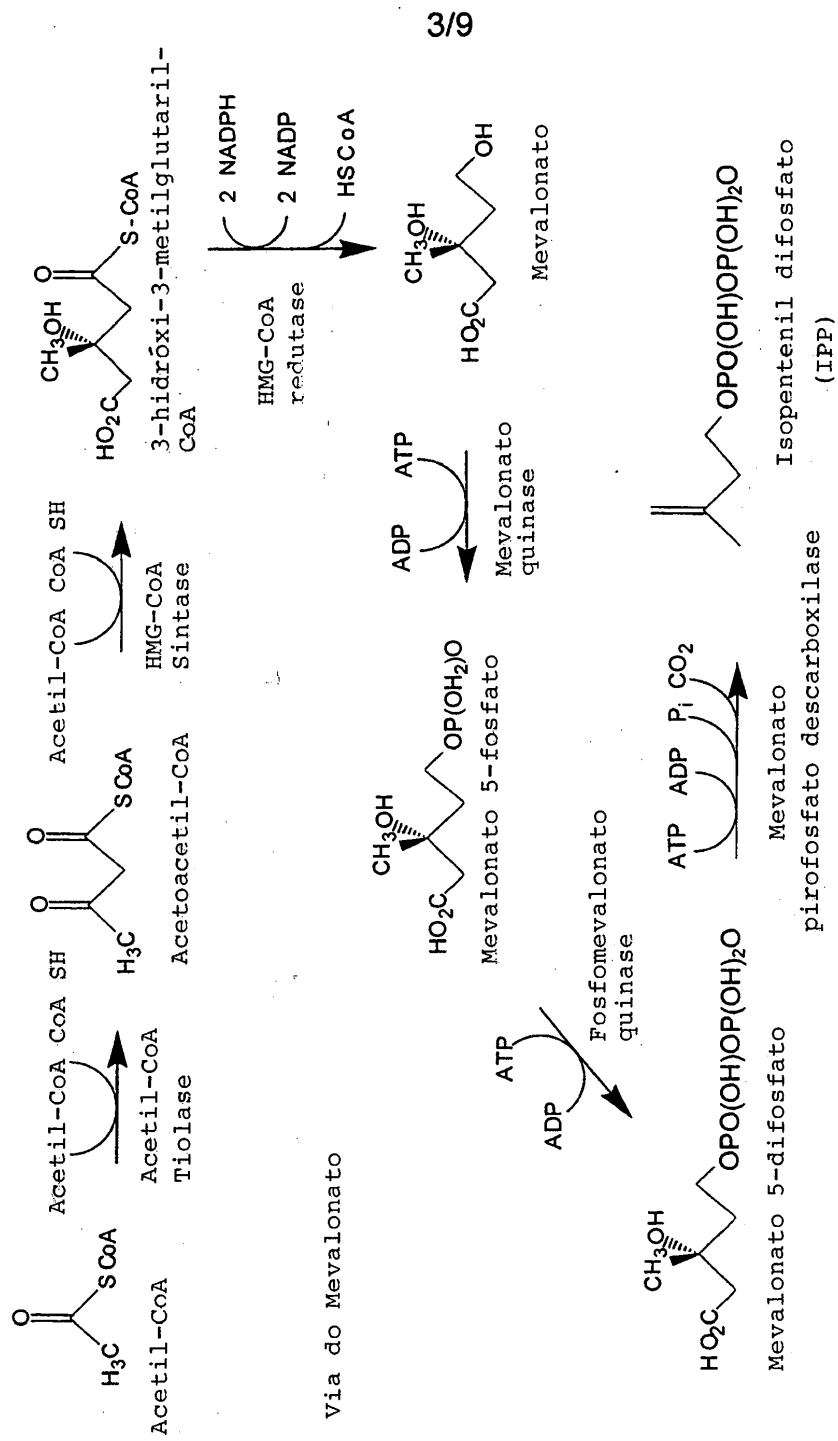


FIG. 2



**FIG. 3**



FIG. 5

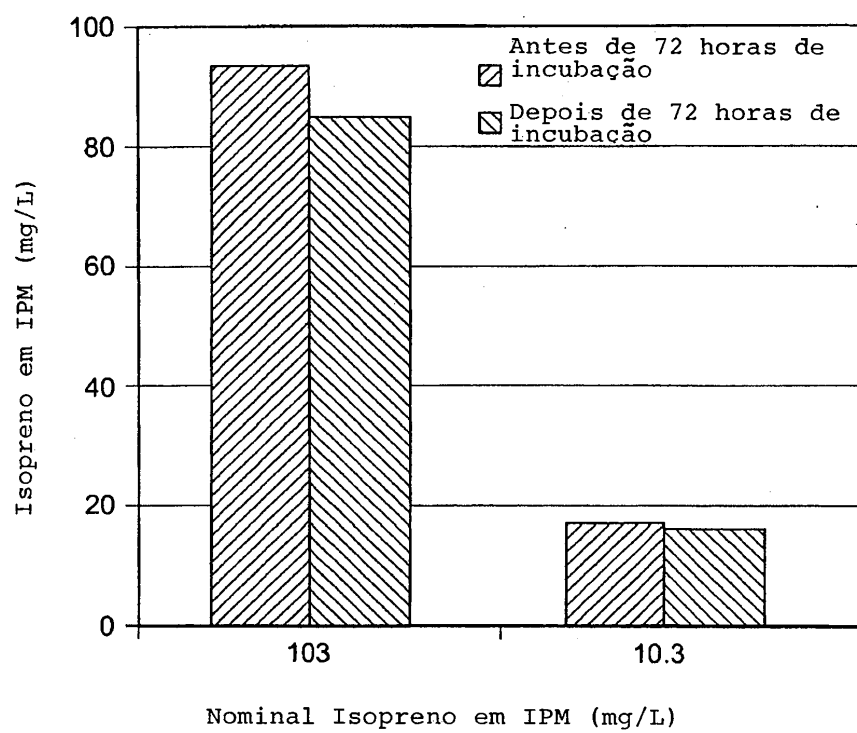


FIG. 6

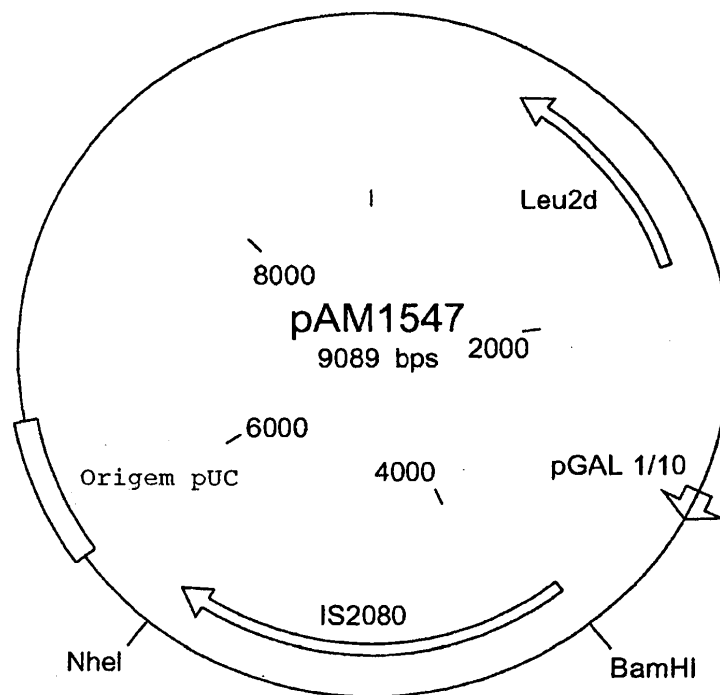


FIG. 7A

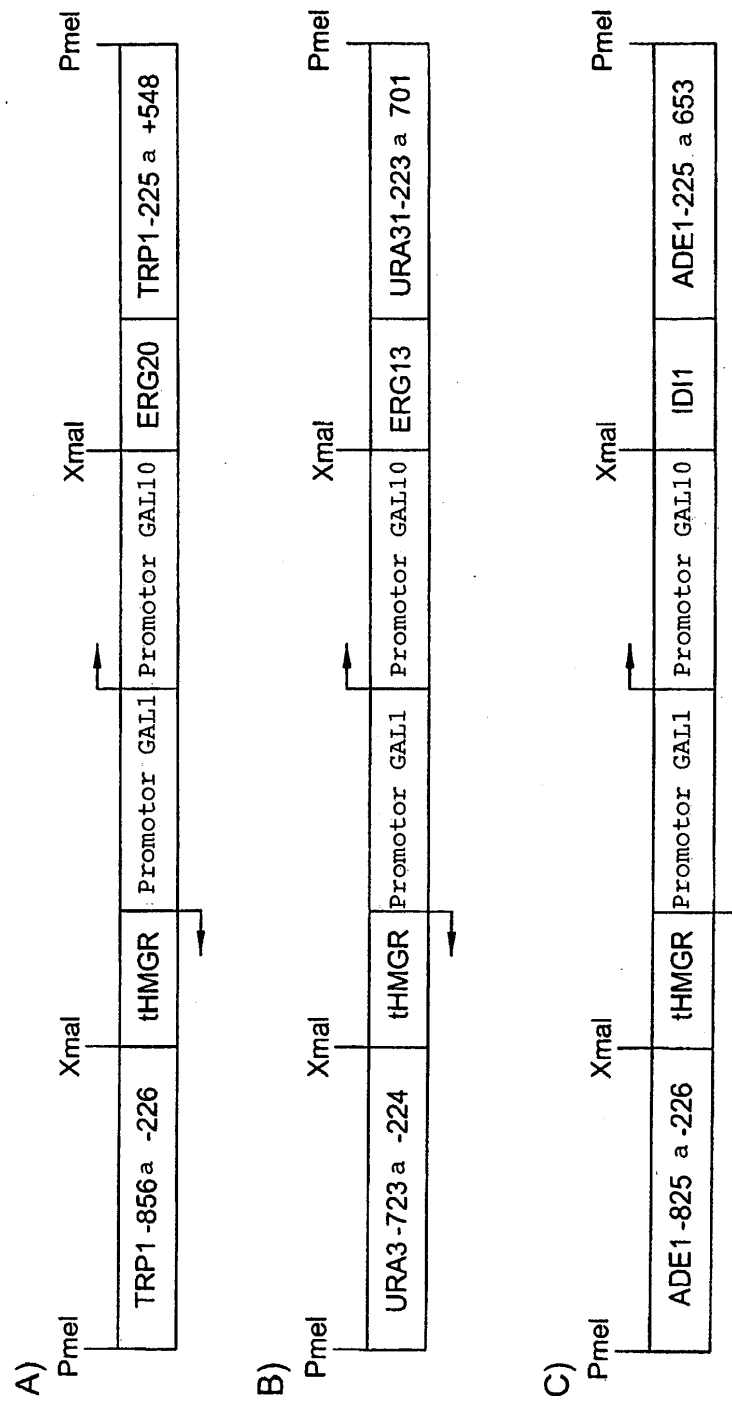


FIG. 7B

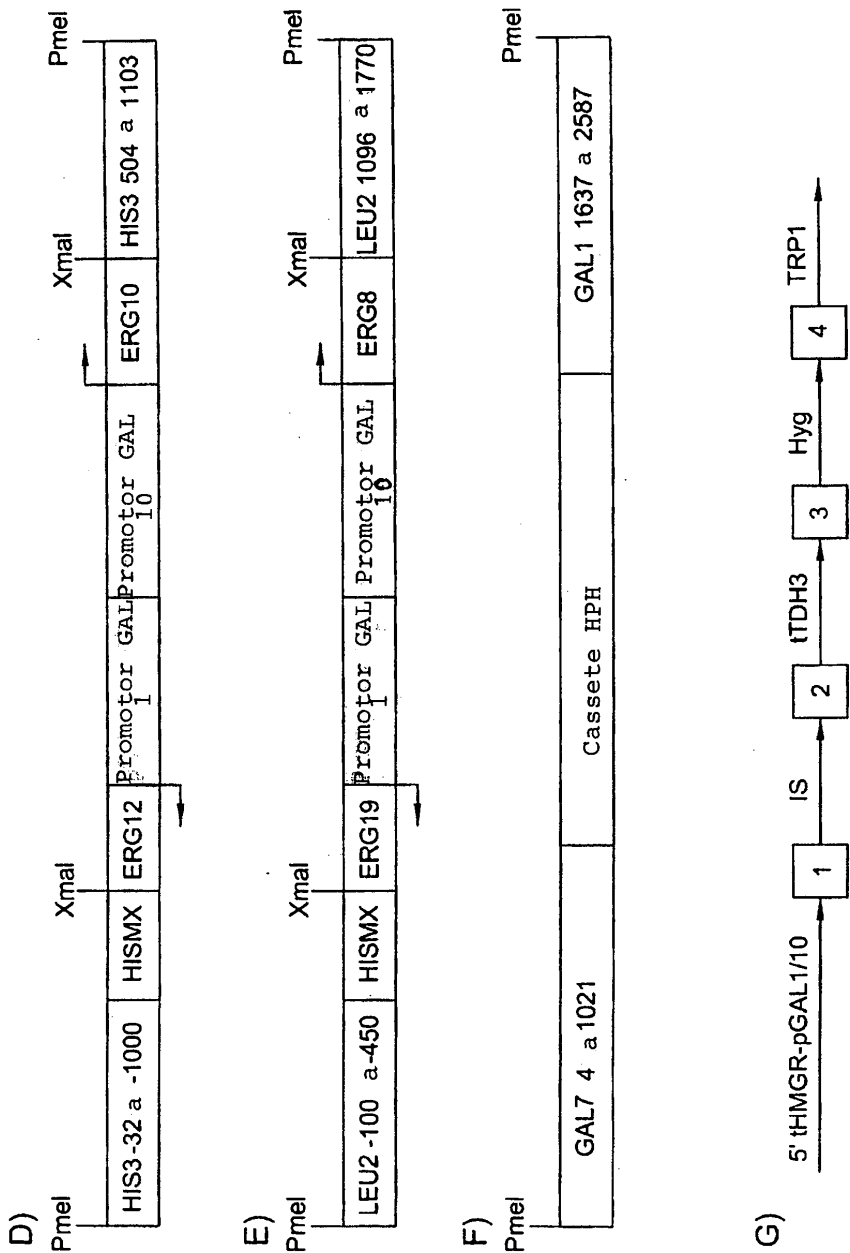
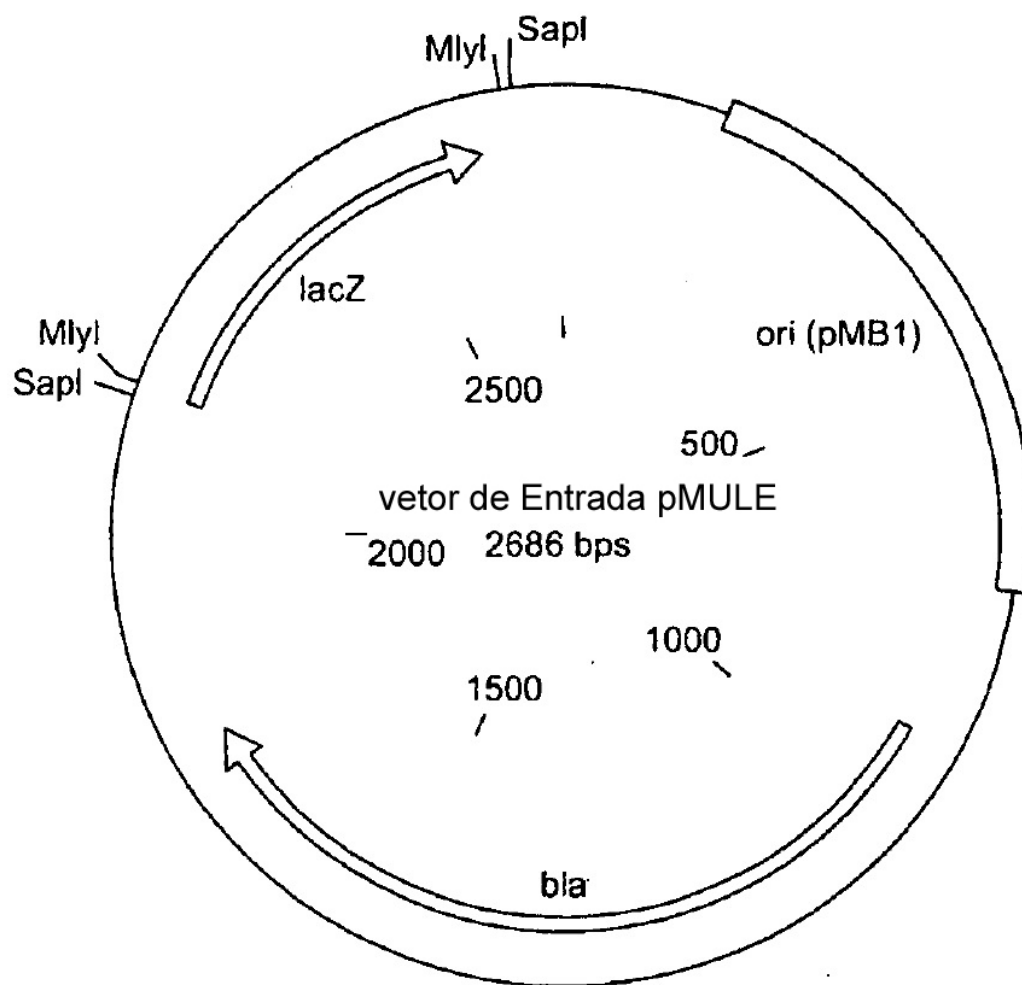


FIG. 8



## RESUMO

### **"ISOPRENO DE ORIGEM MICROBIANA E MÉTODOS PARA SUA FABRICAÇÃO"**

Método para produzir isopreno que compreende um  
5 meio aquoso que inclui células hospedeiras modificadas  
geneticamente capazes de produzir isopreno, sendo que a  
composição de isopreno resultante é processada através de,  
pelo menos, um processo de separação e/ou purificação para  
fornecer uma composição enriquecida com isopreno e um  
10 system para fazer o mesmo.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

**Código de Controle**

Campo 1



7815B7B95F137235

Campo 2



1CEEEB44CB683816

**Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: Sequence Listing.txt
- Data de Geração do Código: 05-09-2011
- Hora de Geração do Código: 11:06:37
- Código de Controle:
  - Campo 1: 7815B7B95F137235
  - Campo 2: 1CEEEB44CB683816