



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0922410-6 B1

(22) Data do Depósito: 14/12/2009

(45) Data de Concessão: 14/05/2024

(54) Título: MICRORGANISMO RECOMBINANTE GENETICAMENTE MODIFICADO PARA CONVERTER 5AMINOPENTANOATO EM UM POLÍMERO OU COPOLÍMERO DE POLI-HIDROXIALCANOATO (PHA) DO MESMO COMPREENDENDO 5-HIDRÓXI-VALERATO, E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE POLÍMEROS OU COPOLÍMEROS DE POLIHIDROXIALCANOATO (PHA) COM BASE EM CARBONOS DOS MESMOS

(51) Int.Cl.: C12N 1/21; C12N 9/00; C12N 9/02; C12N 9/04; C12N 9/10; (...).

(30) Prioridade Unionista: 12/12/2008 US 61/122,250.

(73) Titular(es): CJ CHEILJEDANG CORPORATION.

(72) Inventor(es): WILLIAM R. FARMER; JEFF BICKMEIER; CHENFENG LU; DONG-EUN CHANG; FRANK SKRALY; THOMAS MARTIN RAMSEIER.

(86) Pedido PCT: PCT US2009067943 de 14/12/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/068953 de 17/06/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 13/06/2011

(57) Resumo: ORGANISMO RECOMBINANTE GENETICAMENTE MODIFICADO PARA CONVERTER SEMIALDEÍDO DE GLUTARATO OU 5-AMINOPENTANOATO EM UM MONÔMERO, POLÍMERO OU COPOLÍMERO COM 5 CARBONOS DO MESMO, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE MONÔMEROS COM BASE EM 5 CARBONOS, POLÍMEROS OU CO-POLÍMEROS DOS MESMOS, MÉTODO PARA A SUPER PRODUÇÃO DE GLUTARATO A PARTIR DE SUBSTRATOS DE CARBONO RENOVÁVEIS, 1,5-PENTANODIOL Trata-se de hospedeiros recombinantes para a produção de poli(hidróxi alcanoatos) e de métodos de produção de poli(hidróxi alcanoatos) a partir de substratos de carbono renováveis. Também são apresentados determinados hospedeiros recombinantes que produzem substâncias químicas com 5 carbonos como o 5-amino-pentanoato (5AP), 5-hidróxi-valerato (5HV), glutarato e 1,5-pentanodiol (PDO). Uma modalidade confere um hospedeiro recombinante expressando um gene que codifica uma enzima heteróloga selecionada do grupo que consiste em uma poli(hidróxi alcanoato) sintetase e uma 5-hidróxi-valerato-CoA (5HV-CoA) transferase, em que o hospedeiro produz um polímero que contém 5-hidróxi-valerato. Preferencialmente, o hospedeiro expressa tanto uma poli(hidróxi alcanoato) sintetase quanto uma 5HV-CoA transferase. O hospedeiro pode ser procariótico ou eucariótico. Um hospedeiro procariótico preferencial é a E. coli. Os polímeros produzidos pelos hospedeiros recombinantes podem ser homopolímeros ou copolímeros de 5-hidróxi-valerato. Um copolímero preferencial é o poli(3-hidróxi-butarato-...).

**MICROORGANISMO RECOMBINANTE GENETICAMENTE MODIFICADO PARA
CONVERTER 5-AMINOPENTANOATO EM UM POLÍMERO OU COPOLÍMERO
DE POLI-HIDROXIALCANOATO (PHA) DO MESMO COMPREENDENDO 5-
HIDRÓXI-VALERATO, E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE POLÍMEROS OU
5 COPOLÍMEROS DE POLIHIDROXIALCANOATO (PHA) COM BASE EM 5
CARBONOS DOS MESMOS**

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se, em geral, a organismos transgênicos que produzem poli(hidróxi-alcenoatos) e a co-polímeros do mesmo que contêm 5-
10 hidróxi-valerato e intermediários químicos que contêm cinco átomos de carbono (substâncias químicas C5).

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDO RELACIONADO

O presente pedido reivindica o benefício da prioridade para o pedido de patente provisório nº US 61/122.250, depositado em 12 de dezembro de 2008 e
15 incorporado ao presente a título de referência a níveis admissíveis.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os poli(hidróxi alcenoatos) (PHAs) são plásticos biodegradáveis que podem ser utilizados para produzir, sem limitação, filmes (por exemplo, filme de embalagem, filme agrícolas, filme palhagem), pinos de golfe, capas e invólucros,
20 suportes agrícolas e estacas, papel e revestimentos de placa (por exemplo, para copos, pratos, caixas, etc), produtos termomoldados (por exemplo, bandejas, recipientes, potes de iogurte, potes de planta, tigela de macarrão, moldes, etc.), armações (por exemplo, para itens eletrônicos), sacolas (por exemplo, sacola de lixo, sacolas de mercearia, sacolas de comida, sacolas compostas, etc.), artigos
25 de higiene (por exemplo, fraldas, produtos de higiene feminina, produtos de incontinência, lenços descartáveis, etc.) e revestimentos para produtos pelletizados (por exemplo, fertilizante pelletizado, herbicidas, pesticidas, sementes, etc.).

PHAs têm sido também utilizados para desenvolver dispositivos
30 biomédicos incluindo suturas, dispositivos de reparo, emplastos de reparo, lingas, emplastos cardiovasculares, pinos ortopédicos, barreiras de adesão, endopróteses expansíveis (*stents*), dispositivos de reparo/regeneração de tecido guiados, dispositivos de reparo de cartilagem articular, guias de nervos, dispositivos de reparo de tendão, suportes de medula óssea e curativos de
35 feridas.

Os Poli(hidróxi alcanoatos) podem ser produzidos por um processo de fermentação. Os métodos de fermentação existentes para a produção de poli(hidróxi alcanoatos) utilizam microrganismos do tipo selvagem ou transgênicos cultivados em substratos específicos a fim de produzir a composição de polímero PHA desejada. Em muitos casos os polímeros de interesse são copolímeros do (D)-isômero de 3-hidróxi-butirato copolimerizado com outros 3, 4 ou 5-hidroxiácidos. Esses copolímeros são produzidos como inclusões granulares dentro das células e são copolímeros aleatórios. O copolímero poli(3-hidróxi-butirato-co-5-hidróxi-valerato) (PHB5HV) e o homopolímero poli(5-hidróxi-valerato) (P5HV) são industrialmente utilizáveis como materiais e plásticos com a vantagem de que são materiais biodegradáveis e bioreabsorvíveis. Para datar esses materiais têm sido produzidos alimentando-se petróleo derivado de substratos de 5 carbonos como ácido 5-hidróxi valérico (5HV) ou 1,5-pentanodiol a um microrganismo que tem a capacidade de metabolizar essas substâncias para o 5HV-Coenzima A de monômero ativado e polimerizar este pela ação de uma polimerase PHA para formar os polímeros PHB5HV ou P5HV, os polímeros PHB5HV e P5HV produzidos por esses métodos são somente parcialmente feitos a partir de recursos renováveis e são custosos devido ao alto custo dos substratos de petróleo de 5 carbonos. É altamente desejável usar substratos de carbono renováveis de não petróleo como matéria-prima para a produção de polímeros PHB5HV e P5HV ambos a custo inferior e fornecer materiais que sejam inteiramente feitos a partir de recursos renováveis. É também desejável desenvolver processos para a produção desses polímeros que reduzam a produção de fases do efeito estufa. Recursos renováveis adequados incluem matérias-primas de carboidrato disponíveis da agricultura incluindo uma ou mais matérias-primas selecionadas dentre: amido, sacarose, glicose, lactose, frutose, xilose, maltose, arabinose e matérias-primas de aminoácidos incluindo lisina e prolina.

Sendo assim, é um objetivo da invenção fornecer os organismos recombinantes e processos através dos quais genes podem ser introduzidos em produtores de poli(hidróxi alcanoato) do tipo selvagem ou geneticamente modificado para criar novas cepas que sintetizam monômeros, como 5-hidróxi-valerato, que são produzidos a partir de substratos que não são derivados de petróleo.

Um objetivo adicional da invenção é fornecer técnicas e procedimentos para projetar estavelmente os organismos recombinantes que sintetizam PHAs

que contém 5-hidróxi-valerato tanto como constituinte único quanto como um comonomero.

É outro objetivo da invenção fornecer técnicas e procedimentos para projetar de forma estável os organismos recombinantes que sintetizam substâncias químicas com 5 carbonos como 5-aminopentanoato (5AP), glutarato e 1,5 pentanodiol (PDO).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

5HV que contém Biopolímeros PHA

Hospedeiros recombinantes para a produção de poli(hidróxi alcanoatos) (PHAs) que compreendem monômeros 5-hidróxi-valerato (5HV) e métodos de produção PHAs que compreendem monômeros 5HV a partir de substratos de carbono renováveis são fornecidos. Determinados hospedeiros recombinantes que produzem substâncias químicas com 5 carbonos como 5-aminopentanoato (5AP), 5HV, glutarato e 1,5 pentanodiol (PDO) são também fornecidos.

Uma modalidade confere um hospedeiro recombinante que expressa genes que codificam a poli(hidróxi alcanoato) (PHA) sintetase e a 5-hidróxi-valerato-CoA (5HV-CoA) transferase ou 5HV-CoA sintetase e pelo menos um transgene que codificam uma enzima heteróloga envolvidas nas trajetórias catabólicas da lisina em que o hospedeiro produz um polímero PHA que contém monômeros de 5HV quando o organismo é fornecido com um substrato de carbono renovável selecionado dentre: lisina, amido, sacarose, glicose, lactose, fructose, xilose, maltose, arabinose ou combinações das mesmas e o nível de monômero de 5HV produzido é mais alto na ausência de expressão de ditos transgene(s). Um hospedeiro exemplificativo expressa um ou mais genes que codificam lisina 2-monooxigenase, 5-aminopentanomidase, 5-aminopentanoate transaminase, semialdeído de glutarato reductase, 5-hidróxi-valerato CoA-transferase e poli(hidróxi alcanoato) sintetase a fim de produzir um polímero PHA que contém monômeros de 5HV. Preferencialmente o hospedeiro tem deleções ou mutações em genes que codificam semialdeído de glutarato desidrogenase e/ou um exportador de lisina que codificam genes. Hospedeiros particularmente adequados também têm a capacidade à super produção de lisina e são resistentes a análogos da lisina tóxicos, como S-(2-aminoetil) cisteína.

Em uma modalidade adicional um ou mais dos genes que codificam PHA sintetase, 5HV-CoA transferase ou 5HV-CoA sintetase são também expressos a partir de um transgene.

Em outra modalidade, o organismo recombinante alimenta lisina em combinação com um ou mais substratos de carbono renováveis selecionados dentre: amido, sacarose, glicose, lactose, fructose, xilose, maltose, arabinose ou combinações das mesmas de tal modo que um 5HV que contém um polímero PHA seja produzido e o polímero seja recuperado a partir das células.

Em outra modalidade, o organismo recombinante alimenta um ou mais substratos de carbono renováveis selecionados dentre: amido, sacarose, glicose, lactose, frutose, xilose, maltose, arabinose ou combinações das mesmas de tal modo que um 5HV que contém polímero PHA seja produzido e o polímero seja recuperado a partir das células.

Os polímeros produzidos pelos hospedeiros recombinantes podem ser homopolímeros ou copolímeros de monômeros de 5HV. Um copolímero preferencial é PHB5HV. Outros polímeros utilizáveis produzidos pelos hospedeiros recombinantes são os copolímeros poli(3-hidróxi-propionato-co-5-hidróxi-valerato) e poli(4-hidróxi-butirato-co-5-hidróxi-valerato) e o homopolímero P5HV.

O hospedeiro pode ser procariótico ou eucariótico. Hospedeiros procarióticos preferenciais são *E. coli*, *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes lotus* e *C. glutamicum*.

Os hospedeiros recombinantes para a produção de PHA polímeros a partir de lisina, ou um ou mais substrato de carbono renovável selecionado a partir de amido, sacarose, glicose, lactose, frutose, xilose, maltose, arabinose ou uma combinações das mesmas são também fornecidos. Um hospedeiro exemplificativo expressa lisina 2-monooxigenase, 5-aminopentanomidase, 5-aminopetanoate transaminase, semialdeído de glutarato reductase, 5-hidróxi-valerato CoA-transferase e poli(hidróxi alcanoato) sintetase a fim de produzir um polímero que inclui 5HV. O polímero é produzido com uso de lisina e um ou mais substratos de carbono renovável selecionados dentre amido, sacarose, glicose, lactose, frutose, xilose, maltose e arabinose como uma matéria-prima. Preferencialmente, o hospedeiro tem deleções em semialdeído de glutarato desidrogenase e uma exportação de lisina que codificam genes.

Produção de 1,5-Pentanediol

Outro hospedeiro recombinante é geneticamente modificado para sobreexpressar 5-hidróxi-valerato CoA transferase, propionaldeído desidrogenase CoA dependente e 1,3-propanodiol desidrogenase a fim de produzir 1,5 pentanodiol. O 1,5 pentanediol é produzido com uso de 5-hidróxi-valerato, lisina

amido, sacarose, glicose, lactose, trucrrose, xilose, maltose e arabinose sozinhas ou em combinações como matéria-prima. Preferencialmente, o hospedeiro recombinante tem deleções em *adhE*, *idhA* e *ackA-pta* e expressa lisina 2-monooxigenase, 5-aminopentanamidase, 5-aminopetanoate transaminase e um
 5 ou mais glutarato ou succinato-semialdeído reductase que codificam genes. Hospedeiros particularmente adequados têm a capacidade de uma super produção de lisina e são resistentes a análogos da lisina tóxicos, como S-(2-aminoetil) cisteína. Preferencialmente, o organismo tem uma a atividade reduzida ou nenhuma atividade de desidrogenase do semialdeído de glutarato.

10 Um método para a produção de 1,5-pentanodiol a partir de substratos de carbono renováveis é fornecido onde um organismo recombinante alimenta um substrato de carbono renovável e 1,5-pentanodiol é produzido, secretado ao meio e recuperado a partir do mesmo.

15 Em outra modalidade a invenção fornece 1,5-pentandiol produzido a partir de recursos renováveis.

Produção de Ácido Glutárico

Hospedeiros recombinantes para a super produção glutarato (ácido glutárico) a partir de lisina, ou um ou mais substratos de carbono renovável selecionado dentre amido, sacarose, glicose, lactose, frutose, xilose, maltose e
 20 arabinose, ou uma combinação do mesmo são também fornecidos. Um hospedeiro exemplificativo expressa lisina 2-monooxigenase, 5-aminopentanamtdase, 5-aminopetanoate transaminase e um ou mais semialdeídos de glutarato desidrogenase que codificam genes. Hospedeiros particularmente adequados têm a capacidade para a super produção de lisina e
 25 são resistentes a análogos da lisina tóxicos, como S-(2-aminoetil) cisteína.

Um método para a super produção glutarato a partir de substratos de carbono renováveis é fornecido onde um organismo recombinante alimenta um substrato de carbono renovável selecionado a partir de lisina, amido, sacarose, glicose, lactose, frucrrose, xilose, maltose e arabinose, ou combinações das
 30 mesmas e glutarato produzido em excesso, secretado ao meio e recuperado a partir do mesmo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é um diagrama esquemático que mostra as várias moléculas de
 5 carbonos que podem ser produzidas biologicamente a partir de recursos renováveis em algumas instâncias essas moléculas baseadas em recurso
 35

renovável podem ser interconvertidas com uso de química padrão e utilizadas para produzir polímeros etc. por processos de polimerização química.

A Figura 2A é um diagrama esquemático que mostra trajetórias bioquímicas para 5-hidróxi-valerato que contém poli(hidróxi alcanoato) polímeros e substâncias químicas com 5 carbonos como 5-aminopentanoato (5-APO), glutarato, δ -valero lactona (DVL) e 1,5 pentanodiol. São também mostradas trajetórias metabólicas concorrentes que podem ter que ser removidas ou as atividades reduzidas (conforme indicado por um xis (X)) para alcançar fluxo de carbono ideal para os produtos desejados listados anteriormente. A Figura 2 B mostra enzimas que catalisam as reações biossintéticas: (1) lisina 2-monooxigenase, EC 1.13.12.2; (2) 5-aminopentanomidase (conhecido, ainda, como δ -aminovaleramidase), EC 3.5.1.30; (3) 5-aminopentanoato transaminase (conhecido, ainda, como δ -aminovalerato transaminase), EC 2.6.1.48; (4) succinato-semialdeído reductase (conhecido, ainda, como 5-oxopentanoate reductase), EC 1.1.1.61 ; (5) CoA-transferase, EC 2.8.3.n; (6) Acil-CoA sintetase, EC 6.2.1.3; (7) PHA sintetase, EC 2.3. Ln; (8) β -ceto acil-CoA tiolase, EC 2.3.1.9; (9) acetoacetil-CoA reductase, EC 1.1.1.36; (10) glutarato-semialdeído desidrogenase, EC 1.2.1.20.

A Figura 3 é um diagrama esquemático que mostra as trajetórias bioquímicas de uma rota alternativa de L-lisina a 5-aminopentanoato através da cadaverina e 5-aminopentanal.

A Figura 4 é um diagrama esquemático que mostra trajetórias bioquímicas de L-prolina a 5-aminopentanoato.

A Figura 5 é um diagrama esquemático que mostra trajetórias bioquímicas de alfa-cetoglutarato a semialdeído de glutarato, um intermediário metabólico a fim de produzir 5-hidróxi-valerato e seus derivados e glutarato.

A Figura 6 é um diagrama esquemático que mostra trajetórias bioquímicas de oxaloacetato, um intermediário do ciclo TCA, a L-lisina.

A Figura 7 é um diagrama esquemático que mostra trajetórias bioquímicas a 1,5 pentanodiol.

A Figura 8A é uma cromatografia que mostra tempo (minutos) versus abundância total de íons da cultura de célula processada da cepa 3291. A Figura 8B é um espectro de íon da cultura de célula processada da cepa 3291 que mostra a taxa de massa para carga "m/z" versus sua abundância de íon (unidades relativas).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. Definições

São empregados na presente invenção vários termos que são definidos e esclarecidos na seção a seguir.

5 O termo "copolímero PHA" refere-se a um polímero composto de pelo menos dois monômeros diferentes do ácido hidróxi-alcanóico.

O termo "PHA homopolímero" refere-se a um polímero que é composto de um único monômero do ácido hidróxi-alcanóico.

10 Conforme o uso na presente invenção, um "vetor" é uma replicação, como um plasmídeo, fago, ou cosmídeo, em cada outro segmento de DNA pode ser inserido de forma que viabilize a réplica do segmento inserido. Os vetores podem ser vetores de expressão.

Conforme o uso na presente invenção, um "vetor de expressão" é um vetor que inclui uma ou mais sequências de controle de expressão.

15 Conforme o uso na presente invenção, uma "sequência de controle de expressão" é uma sequência de DNA que controla e regula a transcrição e/ou tradução de outra sequência de DNA.

Conforme o uso na presente invenção, "ligados de forma operacional" significa incorporados em uma construção genética para que as sequências de controle de expressão de uma sequência de código de interesse.

20 Conforme o uso na presente invenção, "transformado" e "transfectado" abrangem a introdução de um ácido nucléico em uma célula por várias técnicas conhecidas na área.

25 Conforme o uso na presente invenção "produzido excessivamente" significa que o composto particular é produzido a uma quantidade alta no organismo modificado comparado ao organismo não modificado.

Conforme o uso na presente invenção os termos "matéria-prima renovável", "substrato de carbono renovável" e "substrato renovável" são todos usados de modo passível de mudança.

30 Os "Plasmídeos" são designados pela letra "p" em caixa baixa precedidos e/ou seguidos por letras maiúsculas e/ou números.

Conforme o uso na presente invenção o termo "heterólogo" significa a partir de outro hospedeiro. O outro hospedeiro pode ser de espécies iguais ou diferentes.

35 II. Trajetórias Metabólicas para a Produção de Polihidróxialcanoatos e Substâncias Químicas com 5 Carbonos

Os organismos recombinantes que têm enzimas para as trajetórias bioquímicas para produção de 5-hidróxi-valerato que contém polímeros de polihidroxialcanoato e substâncias químicas com 5 carbonos como 5-aminopentanoato (5AP), 5-hidróxi-valerato (5HV), glutarato e 1,5 pentanodiol (PDO) são fornecidos. Os hospedeiros procarióticos ou eucarióticos são geneticamente modificados a fim de expressar as enzimas necessárias a fim de produzir 5-hidróxi-valerato, polímeros do mesmo, ou as substâncias químicas com 5 carbonos reveladas das matérias-primas baseadas em fontes renováveis. As trajetórias enzimáticas para a produção dos produtos desejados são fornecidas abaixo.

A. 5-aminopentanoato

O 5-aminopentanoato (5AP) pode ser produzido em duas etapas enzimáticas da L-lisina, um α -aminoácido, com 5-aminopentanamida como o intermediário (Figura 2). A primeira destas enzimas, a lisina 2-monooxigenase é a primeira etapa enzimática na trajetória de degradação da lisina de várias cepas pseudomonas (Takeda e Hayaishi, J. Biol. Chem. 241:2.733 a 2.736; (1966); Hayaishi, Bacteriol. Rev. 30:720 a 731 (1966); Reitz e Rodwell, J. Biol Chem. 245: 3.091 a 3.096 (1970); Flashner e Massey, J. Biol. Chem. 249: 2.579 a 2.586 (1974)). O gene que codifica a lisina 2-monooxigenase foi identificado em *Pseudomonas putida* e chamado de *davB* (Revelles et al., J. Bacteriol. 187:7.500 a 7.510 (2005)). A segunda etapa enzimática converte 5-aminopentanamida em 5AP e é catalisada por 5-aminopentanomidase (Reitz et al., Anal. Biochem. 28:269 a 272 (1969); Reitz e Rodwell, J. Biol. Chem. 245: 3.091 a 3.096 (1970)), que é codificada por *davA* em *P. putida* (Revelles et al., J. Bacteriol. 187:7.500 a 7.510 (2005)).

Como mostrado na Figura 3, uma trajetória alternativa pode ser utilizada para converter L-lisina em 5 AP em três reações enzimáticas que incluem uma lisina descarboxilase a fim de produzir cadaverine, a putrescina transaminase para formar 5-aminopentanal e um γ -aminobutiraldeído desidrogenase para biossintetizar 5AP.

Como esquematizado na Figura 4, 5AP pode também ser produzido da L-prolina, ao invés da L-lisina, em duas reações enzimáticas quem incluem uma prolina racemase para biossintetizar D-prolina e uma prolina redutase para formar 5 AP.

B. 5-hidróxi-valerato

A biossíntese de outro elemento químico com 5 carbonos, 5HV, pode ocorrer do 5AP com 2 etapas enzimáticas como esquematizado na Figura 2. O 5AP é convertido em semialdeído de glutarato pela transaminase de 5AP (Reitz e Rodwell, J. Biol. Chem. 245: 3.091 a 3.096 (1970)) e um gene da *P. putida* que foi identificado e nomeado *davT* (Espinosa-Urgel e Ramos, Appl. Environ. Microbiol. 67:5.219 a 5.224 (2001)). Como esquematizado no Exemplo 7, diversos genes recombinantes de redutase semialdeído foram clonados e testados para investigar qual enzima codificada converteu de forma eficaz semialdeído de glutarato em 5HV. A proteína hipotética ATEG_00539 foi descoberta para catalisar de forma eficaz essa reação e foi, portanto, renomeada de *gsaR* para redutase semialdeído de glutarato.

Em algumas bactérias termofílicas e fungos inferiores incluindo leveduras, a lisina é sintetizada através da trajetória do α -aminocetoadipato (Xu, Cell Biochem. Biophys. 46:43-64 (2006)) em que o 2-cetoadipato é o quarto intermediário e portanto um precursor em potencial para as substâncias químicas C5 como glutarato e 5HV, assim como para 5HV que contém polímeros PHA. Esta trajetória inicia-se do α -aminocetoadipato e acetil-CoA para biossintetizar 2-cetoadipato como mostrado na Figura 5. As cepas hospedeiras de *E. coli* recombinante que expressam estas quatro enzimas foram mostradas a fim de produzir 2-cetoadipato (Andi et al, Biochem. 43:11.790 a 11.795 (2004); Jia et al., Biochem. J. 396:479 a 485 (2006); Miyazaki et al, J. Biol. Chem. 278:1.864 a 1871 (2003)). O 2-cetoadipato pode ser convertido por um α -aminocetoadipato desidrogenase em glutaril-CoA devido à similaridade estrutural de α -aminocetoadipato e 2-cetoadipato. O Glutaril-CoA pode ser convertido por um semialdeído sucínico (SSA) desidrogenase como sucinil-CoA sintetase (SucD) (Söhling e Gottschalk J. Bacterid. 178:871 a 880 (1996)), novamente devido à similaridade estrutural do sucinil-CoA e glutaril-CoA.

C. glutarato

A biossíntese da substância química com 5 carbonos, glutarato, procede do semialdeído de glutarato através de uma reação de desidrogenase (Ischihara et al, J. Biochem. (Tokyo) 49:154 a 157 (1961); Reitz e Rodwell, J. Biol. Chem. 245: 3091-3096 (1970)) como esquematizado na Figura 2. O gene *davD* foi identificado para codificar tal atividade de desidrogenase do semialdeído de glutarato em *P. putida* (Espinosa-Urgel e Ramos, Appl. Environ. Microbiol. 67:5.219 a 5.224 (2001); Revelles et al., J. Bacterid. 186:3.439 a 3.446 (2004)). O glutarato é utilizável para a produção de polímeros como poliésteres, poliéster polióis e

poliamidos. O número ímpar de átomos de carbono (isto é, 5) é utilizável em, por exemplo, diminuir a elasticidade do polímero. Em adição, o 1,5-pentanodiol é um plastificante comum e precursor para poliésteres que é manufaturado por hidrogenação glutarato e seus derivados (Werle e Morawietz, "Alcohols, Polyhydric" in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: 2002, Wiley-VCH: Weinheim. DOI 10.1002/14356007.a01_305).

D. poli (5-hidróxi-valerato)

A biossíntese de um homopolímero que consiste de poli (5-hidróxi-valerato) (conhecido, ainda, como P(SHV)) PHA pode proceder de 5HV por meio de 5-hidroxivalerate-CoA. Duas reações enzimáticas diferentes podem catalisar a primeira etapa, isto é, tanto por uma CoA-transferase conforme descrito por Huisman et al. (Patente nº U.S. 7.229.804), Söhling e Goltschalk (J. Bacteriol. 178:871-880 (1996)) e Eikmanns e Buckel (Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371 :1077-1082 (1990)), ou por uma CoA-sintetase conforme descrito por van Beilen et al. (Molec. Microbiol. 6:3121-3136 (1992)). A polimerização de 5-hidróxi-valerato-CoA pode ser catalisada por PHA polimerase como codificada pela *Ralstonia eutropha phaC1* (Peoples e Sinskey, J. Biol. Chem. 264:15.298 a 15.303 (1989)). Alternativamente, a proteína de fusão PhaC3/C5 sintetase pode ser empregada conforme descrito por Huisman et al. (Patente Nº U. S 6.316.262).

E. poli (3-hidróxi-butirato-co-5-hidroxivalerato)

A biossíntese de um copolímero que inclui poli (3-hidróxi-butirato-co-5-hidróxi-valerato) (conhecido, ainda, como P(3HB-co-5HV)) pode ocorrer por suprimento de moléculas precursoras de 3-hidróxi-butil-CoA (3HB-CoA) e monômero de 5-HV-CoA. Conforme esquematizado Figura 2, a 3HB-CoA pode ser biossintetizada a partir de acetil-CoA por meio de 2 etapas enzimáticas: (i.) uma reação de β -cetoacil-CoA tiolase que converte acetil-CoA em acetoacetyl-CoA (Nishimura et al., J. Biol. Chem. 116:21-27 (1978)) com uso de genes adequados como, mas não limitado a, *bktB* de *Ralstonia eutropha* (Slater et al. J. Bacteriol. 180(8):1.979 a 1.987 (1998)) e (ii.) uma reação de acetoacetyl-CoA reductase que converte acetoacetyl-CoA em 3HB-CoA (Fukui et al., Biochim. Biophys. Acta 917:365-371 (1987)) com uso de genes adequados como, mas não limitado a, *phaB* de *Bacillus megaterium* (McCool e Cannon, J. Bacteriol. 181(2):585 a 592 (1999)). Conforme esquematizado anteriormente, o co-polímero PHA pode ser sintetizado por várias sintetases de PHA.

F. Lisina

A Figura 6 representa a trajetória biossintética do metabolismo de lisina em *E. coli*. As linhas pontilhadas e sólidas no centro do diagrama indicam inibição de reação alostérica e repressão transcripcional por L-lisina, respectivamente, que fornece alvos para modificações genéticas necessárias para aumentar a produção de L-lisina em células de hospedeiro recombinante como *E. coli*.

G. 1,5-pentanediol

A Figura 7 fornece uma vista geral da produção de 1,5-pentanodiol (PDO) de 5HV. O 5HV pode ser convertido em 5HV-CoA por uma CoA-transferase conforme descrito por Huisman et al. (Patente nº 7.229.804), Söhling e Gottschalk (J. Bacteriol. 178:871 a 880 (1996)) e Eikmanns e Buckel (BiolChem. Hoppe-Seyler 371:1.077 a 1.082 (1990)), ou por uma CoA-sintetase conforme descrito por van Beilen et al. (Molec. Microbiol. 6:3.121 a 3.136 (1992)). O 5HV pode ser convertido em 5-hidróxipentenal por uma propionaldeído desidrogenase ou álcool desidrogenase como *pduP* de *Salmonella typhimurium* (Leal, Arch. Microbiol. 180:353 a 361 (2003)) ou *eutE* de *E. coli* (Skraly, Patente nº WO 2004/024876). O 5-Hidróxipentenal pode ser convertido em PDO por 1,3-propanodiol desidrogenase ou álcool desidrogenase como *dhaT* de *Klebsiella pneumoniae* (Tong et al., Appl. Environ. Microbiol. 57(12):3.541 a 3.546 (1991)).

H. 5-hidróxi-valerato-co-3-hidróxi-propionato

Um copolímero que contém 5-hidróxi-valerato-co-3-hidróxi-propionato pode ser produzido a partir de cepas 5HV. *E. coli* K12 que foram *fadR*⁺ (degradação de ácido graxo reprimido (FAD)) ou *fadR*⁺ (FAD constitutivo) são transfectados com ácidos nucleicos que expressam poli(hidróxi alcanoato) e 5-hidróxi-valerato transferase CoA. As cepas *E. coli* preferenciais incluem MG 1655 e LS5218 (Spratt et al., J. Bacteriol 146(3): 1166-1169 (1981)). Como mostrado na Tabela 6, a análise GC-FID indicou que LS5218 [pMS93] produziu 6,4%dcw PHA, com uma composição de polímero de 52% 5HV e 48% 3HP. MG1655 [pMS93], por outro lado, fez 63,1%dcw PHA que consistia em apenas 5HV. Além disso, a análise GC-MS de LS5218 [pMS93] confirmou a presença de 3HP na amostra de polímero. Desse modo, o sistema ativo FAD em LS5218 é capaz de sintetizar 3HP a partir de NaSHV.

III. Produção de Organismos transgênicos para a produção de Poli(hidróxi alcanoatos) e substâncias químicas com 5 carbonos

Organismos transgênicos para a produção de poli(hidróxi alcanoatos) e substâncias químicas com 5 carbonos são produzidos usando técnicas convencionais conhecidas na técnica.

A. Genes para a produção de Produtores Transgênicos P(SHV)

Os genes clonados e/ou avaliados por cepas hospedeiras que produzem 5HV-que contém PHA e 5-produtos químicos são apresentados abaixo na Tabela 1A, junto com o Número de Comissão de Enzimas apropriado (número EC) e com as referências. Como discutido adicionalmente abaixo, alguns genes foram sintetizados para otimização de códons, enquanto outros foram clonados através de PCR do DNA genômico do organismo nativo ou de ocorrência natural.

Tabela 1A. Genes em cepas hospedeiras microbianas produzindo 5HV-que contém PHA e 5-produtos químicos.

Número de reação (Fig. 1B)	Nome do Gene	Nome da enzima	Número EC	Nº de acesso da proteína
1	<i>davB</i>	Lisina monooxigenase	2- 1.13.12.2	BAG54787
2	<i>davA</i>	5-aminopentanamidase	3.5.1.30	BAG54788
3	<i>davT</i>	5-aminooentanoato transaminase	2.6.1.48	AAK97868
3	<i>gabT</i>	4-aminobutirato transaminase	2.6.1.19	NP_417148
4	<i>gsaR_{AI2}</i>	Glutarato semialdeído redutase	1.1.1.61	Gene/Proteína ID 1: XP_001210625
4	<i>gsaR_{AI}</i>	Glutarato semialdeído redutase	1.1.1.61	Gene/Proteína ID 2: AAK94781
5	<i>orfZ</i>	CoA-transferase	2.8.3.n	AAA92344
5		5-hidroxioentanoato CoA-transferase	2.8.3.14	
6	<i>alkK</i>	Acyl-CoA synthetase	6.2.1.3	Q00594
7	<i>phaC</i>	Polihidroxiálcanoato synthase	2.3.1.n	YP_725940
7	<i>phaC3/C5</i>	Polihidroxiálcanoato proteína de fusão de sintase	2.3.1.n	Gene/Proteína ID 3
7	<i>phaEC</i>	sintase	2.3.1.n	Gene/Proteína ID 4 e 5
8	<i>bktB (phaA)</i>	Polihidroxiálcanoato tiolase	2.3.1.9	CAJ92573
9	<i>phaB</i>	β -ketoacil-CoA Acetoacetyl-CoA redutase	1.1.1.36	AAD05259
10	<i>davD</i>	Glutarato-semialdeído dehidrogenase	1.2.1.20	NP_742381
10	<i>gabD</i>	Glutarato-semialdeído dehidrogenase,	1.2.1.20	NP_417147

10	<i>ynel</i>	NADP+-dependente Succinato- semialdeído dehidrogenase,	1.2.1.20	NP_416042
	<i>pduP</i>	NAD+- dependente CoA-dependente propionaldeído dehidrogenase	1.2.1.3	NP_460996
	<i>eutE</i>	aldeído dehidrogenase previsto em utilização etanolamina	1.2.1.3	NP_416950
	<i>dhaT</i>	1,3-propanediol dehidrogenase	1.1.1.202	YP_002236499
	<i>eutG</i>	álcool dehidrogenase previsto, proteína de utilização etanolamina	1.1.1.202	AP_003038
	<i>argO (yggA)</i>	Proteína de exportação argenina		NP_417398
	<i>lysE</i>	Lisina efluxo permease		NP_600485
	<i>lysP</i>	LysP lisina APC transportador		NP_416661
	<i>cadA</i>	Lisina decarboxilase 1	4.1.1.18	AAC77092
	<i>ldcC</i>	Lisina decarboxilase 2	4.1.1.18	AAC73297
	<i>yjeK</i>	Lisina 2,3- aminomutase	5.4.3.-	AAC77106

Outras proteínas capazes de catalisar as reações listadas na Tabela 1A podem ser descobertas através da consulta de literatura científica, patentes ou através de buscas BLAST contra, por exemplo, nucleotídeo ou base de dados de proteína em NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Os genes sintéticos podem ser criados para fornecer uma rota fácil a partir da base de dados de sequência para DNA físico. Tais genes sintéticos são projetados e fabricados a partir da base, usando códons para aperfeiçoar expressão de proteína heteróloga, otimizar características necessárias para o sistema de expressão e hospedeiro. Companhias como, por exemplo, DNA 2.0 (Menlo Park, CA 94025, USA) fornecerão tal serviço de rotina. As proteínas que podem catalisar as reações bioquímicas listadas na Tabela 1A são fornecidas nas Tabelas 1B-1AA.

Tabela 1B. Homólogos adequados para a proteína DavB (lisina 2-monooxigenase, de *Pseudomonas putida* KT2440, EC N^o, 1,13,12,2, que age em

L-lisina a fim de produzir 5-aminopentanamida; número de acesso de proteína BAG54787 (Revelles et al., J Bacteriol. 187:7500-10 (2005))).

Nome da Proteína	Nº de acesso da proteína
amina oxidase	YP_001265764
amina oxidase	YP_001666658
amina oxidase	YP_001751665
amina oxidase	YP_606177
amina oxidase, que contém flavin	YP_262728
triptofano 2- monooxygenase	YP_350882
triptofano 2- monooxygenase	ZP_04590895
triptofano 2- monooxygenase	NP_790366
triptofano 2- monooxygenase	ZP_02189967

Tabela 1C. Homólogos adequados para a proteína DavA (5-aminopentanomidase, de *Pseudomonas putida* KT2440, EC Nº 3,5,1,30, que age em 5-aminopentanamida a fim de produzir 5-aminopentanoato, número de acesso de proteína BAG54788 (Revelles et al., J Bacteriol. 187:7500-10 (2005))).

Nome da Proteína	Nº de acesso da proteína
hidratase de Nitrilase/cianeto e apoliproteína N- aciltransferase	YP_001265763
hidratase de Nitrilase/cianeto e apoliproteína N- aciltransferase	YP_001666657
hidratase de Nitrilase/cianeto e apoliproteína N- aciltransferase	YP_001751666
Amidohidrolase	YP_606176
hidrolase de família carbono-nitrogênio	NP_790365
hidrolase de família carbono-nitrogênio	ZP_04590894
hidrolase putativa	YP_002875091
hidratase de Nitrilase/cianeto e apoliproteína N- aciltransferase	YP_350883
Nitrilase	YP_703491

Tabela 1D. Homólogos adequados para a proteína DavT (5-aminopentanoato transaminase, de *Pseudomonas putida* KT2440, EC Nº 2,6,1,48, que age em 5-aminopentanoato a fim de produzir semialdeído de glutarato; Número de acesso de proteína AAK97868 (Espinosa-Urgel e Ramos, Appl. Environ. Microbiol. 67 (H)5 5219-5224 (2001))).

Nome da proteína	Nº de acesso de proteína
4-aminobutirato aminotransferase	YP_788435
4-aminobutirato aminotransferase	YP_002294190
4-aminobutirato aminotransferase	YP_345921
4-aminobutirato transaminase	YP_002801747
4-aminobutirato aminotransferase	YP_001333938
4-aminobutirato aminotransferase	NP_790151
4-aminobutirato aminotransferase,	NP_417148

dependente de PLP

4-aminobutirato aminotransferase YP_311652

4-aminobutirato aminotransferase YP_257332

Tabela 1E. Homólogos adequados para a proteína GabT (4-aminobutirato transaminase, de *Escherichia coli* str. K-12 substr. MGI 655, EC Nº 2,6,1,48 (ou EC Nº 2,6,1,19), que age em 5-aminopentanoato (ou 4 aminobutirato) a fim de produzir giutarate semialdeído (semialdeído succínico); número de acesso de proteína NP_417148 (Riley et al, Ácidos nucleicos Res. 34 (1), 1-9 (2006))).

5

Nome da proteína	Nº de acesso de proteína
4-aminobutirato aminotransferase	ZP_05433421
4-aminobutirato aminotransferase	YP_002381614
proteína hipotética CIT292_04138	ZP_03838094
4-aminobutirato aminotransferase	YP_001333938
4-aminobutirato aminotransferase	NP_461718
4-aminobutirato aminotransferase	NP_248957
4-aminobutirato aminotransferase	YP_964435
4-aminobutirato aminotransferase	YP_982853
4-aminobutirato aminotransferase	YP_583770

Tabela 1F. Homólogos adequados para a proteína GsaRA2 (giutarate semialdeído redutase, de *Aspergillus terreus* NIH2624, EC Nº 1.1,1,61, que age em giutarate semialdeído (ou semialdeído succínico) a fim de produzir 5-hidróxi-valerato (ou 4-hidróxi-butirato); número de acesso de proteína XP_001210625 (Birren, The Broad Institute Genome Sequencing Platform, direct submission to NCBI))).

10

Nome da proteína	Nº de acesso de proteína
aflatoxina B1-aldeído redutase similar a GliO, putativo	CBF89011
aflatoxina B1-aldeído redutase similar a GliO aflatoxinaa B1-aldeído redutase similar a GliO, putativo	XP_752707
aflatoxinaa B1-aldeído redutase similar a GliO, putativo	XP_001264422
aflatoxina B1 aldeído redutase	XP_002375825
proteína hipotética An08g06440	EEH21318
aflatoxina B1 aldeído membro redutase, putativo	XP_001392759
	EER27170
Cadeia A, Camundongo Semialdeído succínico Redutase, Akr7a5	2C91_A
Cadeia A, Estrutura de Aflatoxina Aldeído Redutase em Complexo com NADPH	2BP1_A

Tabela 1G. Homólogos adequados para a proteína GsaR_{At} (semialdeído de glutarato redutase, de *Arabidopsis thaliana*, EC N° 1,1,1,61, que age em semialdeído de glutarato (ou semialdeído succínico) a fim de produzir 5-hidróxi-valerato (ou 4-hidróxi-butirato); número de acesso de proteína AAK94781 (Breitkreuz et al., J. Biol. Chem. 278 (42), 41552-41556 (2003))).

Nome da proteína	Nº de acesso de proteína
proteína hipotética isoforma 1	XP_002266252
proteína estimada	XP_002320548
Os02g0562700	NP_001047154
semialdeído succínico redutase	BAG16485
isoforma 1	
Desconhecido	ACU22717
proteína hipotética	XP_002452295
SORBIDRAFT_04g023180	
NAD-dependente 4- hidróxi-butirato desidrogenase	AAC41425
1, 3-propanodiol desidrogenase	ZP_00945634
NAD-dependente 4- hidróxi-butirato desidrogenase	AAA92348
NAD-dependente 4- hidróxi-butirato desidrogenase	NP_348201

Tabela 1H. Homólogos adequados para a proteína OrfZ (CoA-transferase, de *Clostridium Jduyveri* DSM 555, EC N° 2,8.3.n, que age em 5-hidróxi-valerato a fim de produzir 5-hidróxivaleryl-CoA; número de acesso de proteína AAA92344 (Huisman et al., Patente N° U.S.7.229.804; Sohling e Gottschalk, J. Bacterid. 178:871-880 (1996))).

Nome da proteína	Nº de acesso de proteína
acetil-CoA hidrolase/transferase	ZP_05395303
acetil-CoA hidrolase/transferase	YP_001309226
4-hidróxi-butirato coenzima A transferase	ZP_05618453
4-Hidróxi-butirato CoA-transferase	CAB60036
4-Hidróxi-butirato CoA-transferase	NP_904965
4-Hidróxi-butirato CoA-transferase	ZP_05427217
acetil-CoA hidrolase/transferase	YP_002430388
acetil-CoA hidrolase/transferase	YP_001433830
acetil-CoA hidrolase/transferase	YP_002509648

Tabela 1I. Homólogos adequados para a proteína AlkK (Acil-CoA sintase, de *Pseudomonas oleovorans*; EC N° 6,2,1,3, que age em 5-hidróxi-valerato a fim de produzir 5-hidróxivaleryl-CoA; número de acesso de proteína Q00594 (van Beilen et al., Mol. Microbiol. 6 (2) 5 3121-3136 (1992))).

Nome da proteína	Nº de acesso de proteína
AMP-dependente sintase e ligase	YP_001185941
cadeia-média acil- CoA sintase	ABO21016

sintase acil-CoaA	CAB69080
cadeia-média acil- CoA sintase	ZP_06063626
sintase acil-CoaA	YP_523641
AMP-dependente sintase e ligase	ZP_03542412
sintase acil-CoaA	YP_726019
cadeia-média-graxa- ligase CoA-ácida	ZP_06016304
cadeia-média-graxa- ligase CoA-ácida	ZP_02145453

Tabela 1J. Homólogos adequados para a proteína PhaC (poli(hidróxi alcanato) sintase, de *Ralstonia eutropha*, EC N° 2,3,1,n, que age em (R)-3-hidróxibutyryl-CoA + [(R)-3-hidróxibutanoato]_n a fim de produzir [(R)-3-hidróxibutanoato]_(n+1) + CoA; número de acesso de proteína YP_725940 (Peoples and Sinskey, J. Biol. Chem. 264:15298-15303 (1989))).

Nome da proteína	N° de acesso de proteína
polihidróxialcanóico sintase de ácido	YP_002005374
sintase PHB	BAB96552
PhaC	AAF23364
Poli(hidróxi alcanato) proteína de	AAC83658
sintase PhaC	
polihidróxi-butyrate sintase	AAL17611
ácido poli(R)- hidróxi-alcanóico	YP_002890098
sintase, classe I	
poli-β-hidróxi-butyrate polimerase	YP_159697
sintase PHB	CAC41638
sintase PHB	YP_001100197

Tabela 1K. Homólogos adequados para a proteína PhaE (PhaE subunidade de sintase PhaEC PHA, de *Thiocapsa pfenigii*, que age em (R)-3-hidróxibutyryl-CoA + [(R)-3-hidróxibutanoato]_n a fim de produzir [(R)-3-hidróxibutanoato]_(n+1) + CoA).

Nome da proteína	N° de acesso de proteína
orf2 5' para phbC	AAC60429
região intergênica de phbC-phbA em	P45372
proteína kDa 40,5 não caracterizada	
proteína hipotética 2	S29275
região intergênica de phbC-phbA em	P45367
proteína kDa 41,3 não caracterizada	
ácido poli(R)-hidróxi-alcanóico	ZP_04775558
sintase, classe III, subunidade PhaE	
proteína hipotética Tgr7_1513	YP_002513584
subunidade PhaE de sintase PHA	AAG30260
ácido poli(R)-hidróxi-alcanóico	YP_865086
sintase, classe III, subunidade PhaE	
sintase PHA	BAE20054
subunidade E de sintase PHA	ABK60192

Tabela 1L. Homólogos adequados para a proteína PhaC (PhaC subunidade de sintase PhaEC PHA, de *Thiocapsa pfenigii*, que age em (R)-3-

hidróxibutyryl-CoA + [(R)-3-hidróxibutanoato]_n a fim de produzir [(R)-3-hidróxibutanoato]_{(n+1)-f} CoA).

Nome da proteína	Nº de acesso de proteína
ácido poli(R)-hidróxi-alcanóico sintase, classe III, subunidade PhaC	ZP_04774202
polimerase Poli-β-hidróxi-butirato subunidade PhaC de sintase PHA	P45366 AAG30259
ácido poli(R)-hidróxi-alcanóico sintase, classe III, subunidade PhaC	YP_865087
sintase poli (ácido 3-hidróxibutirico)	YP_200860
sintase poli(3- hidróxialcanoato) PhaC	YP_001660017 AAL76316
sintase poli(3- hidróxialcanoato)	NP_440750
ácido poli(R)-hidróxi-alcanóico sintase, classe III, subunidade PhaC	YP_003151887
ácido poli(R)-hidróxi-alcanóico sintase, classe III, subunidade PhaC	YP_001374365

- 5 **Tabela 1M.** Homólogos adequados para a proteína BktB (PhaA) (β-ketoAcil-CoA tiolase, de *Ralstonia eutropha* HI 6, EC Nº 2,3,1,9, que age em acetil-CoA a fim de produzir acetoacetil-CoA; número de acesso de proteína CAJ92573 (Peoples & Sinskey, J Biol Chem. 1989 Sep 15;264(26): 15293-7. Pohlmann et al, Nature Biotech 24 (10), 1257-1262 (2006))).

Nome da proteína	Nº de acesso de proteína
acetil-CoA acetiltransferase	YP_002005375
acetil-CoA acetiltransferase	YP_558680
acetil-CoA acetiltransferase	BAB96553
acetil-CoA acetiltransferase	YP_001021062
β-ketotiolase	BAA33156
acetil-CoA acetiltransferase	YP_523809
acetil-CoA acetiltransferase	NP_250691
β-ketotiolase	YP_002802211
acetil-CoA acetiltransferase	YP_001919890

- 10 **Tabela 1N.** Homólogos adequados para a proteína PhaB (acetoacetil-CoA redutase, de *Bacillus megaterium*, EC. Nº 1,1,1,36, que age em acetoacetil-CoA a fim de produzir (R)-3-hidróxibutyryl-CoA; número de acesso de proteína AAD05259 (McCool & Cannon, J. Bacteriol. 183 (14), 4235-4243 (2001))).

Nome da proteína	Nº de acesso de proteína
redutase acetoacetila-CoA	NP_831099
redutase 3-ketoacila-(proteína carreadora acila)	YP_645133
redutase 3-ketoacila-(proteína carreadora acila)	ZP_01126888
proteína hipotética DSY2660	YP_518893
redutase 3-ketoacila-(proteína carreadora acila)	YP_001865860

reductase	3-ketoacil-(proteína	YP_001658404
carreadora acila)		
reductase	3-oxoacil-(proteína	YP_002949207
carreadora acila)		
reductase	3-oxoacil-(proteína	NP_371755
carreadora acila)		
reductase	3-ketoacil-(proteína	YP_001385912
carreadora acila)		

Tabela 10. Homólogos adequados para a proteína *DavD* (glutarato-semialdeído desidrogenase, de *Pseudomonas putida* KT2440, EC N° 1,2,1,20, que age em glutarato senialdeído a fim de produzir glutarato; número de acesso de proteína NP_742381 (Espinosa-Urgel e Ramos, Appl. Environ. Microbiol. 67 (11), 5219-5224 (2001))).

Nome de proteína	Nº de acesso de proteína
semialdeído-succinato desidrogenase	YP_605978
semialdeído-succinato desidrogenase	YP_345920
semialdeído-succinato desidrogenase	NP_417147
I, NADP-dependente	
desidrogenase aldeído previsto	NP_416042
semialdeído-succinato desidrogenase	NP_461717
desidrogenase aldeído	YP_002801982
semialdeído succínico desidrogenase	YP_002827846
semialdeído succínico desidrogenase	YP_001228901
semialdeído-succinato desidrogenase	YP_841054
(NADP+)	

Tabela 1P. Homólogos adequados para a proteína *GabD* (succinato-semialdeído desidrogenase, NADP+dependente, de *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655, EC N° 1,2,1,20, que age em semialdeído de glutarato (or semialdeído succínico) a fim de produzir glutarato (or succinate); Número de acesso de proteína NP_417147 (Riley et al, Ácidos nucléicos Res. 34 (1), 1-9 (2006))).

Nome da proteína	Nº de acesso da proteína
Succinato-semialdeído desidrogenase	ZP_05433422
Succinato-semialdeído desidrogenase	YP_001744810
(NAD(PX+))	
Proteína hipotética CIT292_04137	ZPJB838O93
Succinato-semialdeído desidrogenase	YP_002638371
Succinato-semialdeído desidrogenase	YP_001333939
Succinato-semialdeído desidrogenase	NP_742381

Succinato-semialdeído desidrogenase YP_002932123
 [NADP+] (ssdh)
 Semialdeído succínico desidrogenase YP_001951927
 Succinato-semialdeído desidrogenase YP_298405

Tabela 1Q. Homólogos adequados para proteína *YneI* (Sad) (succinato-semialdeído desidrogenase, NAD⁺-dependente, proveniente da subcepa K-12 da cepa de *Escherichia coli* MG1655, EC N^o 1.2.1.24, que age em semialdeído de glutarato (semialdeído succínico) a fim de produzir glutarato (succinato); n^o de acesso de proteína NP_416042 (Fuhrer et al., J Bacterid. 2007 Nov;189(22):8.073 a 8. Denné umand Valentin, Patente N^o U.S. 6.117.658))).

Nome da proteína	N ^o de acesso da proteína
Succinato semialdeído desidrogenase	NP_805238
Aldeído desidrogenase putativa	YP_002919404
Aldeído desidrogenase	NP_745295
Aldeído desidrogenase	ZP_0269266
Aldeído desidrogenase	ZP_05726943
Aldeído desidrogenase	YP_001906721
Proteína hipotética	BAF01627
Aldeído desidrogenase	ZP_03739186
Succinato-semialdeído desidrogenase	NP_637690

Tabela 1R. Homólogos adequados para a proteína PduP (propionaldeído desidrogenase dependente de CoA, proveniente de *Salmonella typhimurium* LT2, EC N^o 1.2.1.3, que age em 5-hidroxivalerilo-CoA a fim de produzir 5-Hidroxipentanal; Proteína de n^o de acesso NP_460996 (Leal et al., Arch. Microbiol. 180:353 a 361 (2003), McClelland et al., Nature 413: 852 a 856 (2001))).

Nome da proteína	N ^o de acesso da proteína
Etanolamina	YP_002216136
Proteína de utilização EutE PduP	ZP_04562531
Propanodiol proteína de utilização	YP_002236771
Proteína de utilização etanolamina EutE	NP_756394
Aldeído desidrogenase	YP_961823
Possível aldeído desidrogenase	ZP_04969437
Proteína de utilização etanolamina EutE	ZP_04637794
Aldeído desidrogenase	ZP_05373182
Proteína de utilização etanolamina EutE	YP_002350444

Tabela 1S. Homólogos adequados para a proteína EutE (aldeído desidrogenase previsto, proteína de utilização etanolamina, proveniente da subcepa K-12 de cepa de *Escherichia coli* MG 1655, EC N^o 1.2.1.3, que age em

5-hidróxivalerilo-CoA a fim de produzir 5-hidróxipentanal, proteína de nº de acesso, NP_416950 (Riley et al., Nucleic Acids Res. 34 (1), 1 a 9 (2006))).

Nome da proteína	Nº de acesso da proteína
Proteína hipotética SPAB_00490	YP_001586756
Proteína de utilização Etanolamina	YP_001336429
Proteína de utilização etanolamina provável (EutE)	ZP_01222600
Aldeído desidrogenase putativo	ZP_03337600
Proteína de utilização etanolamina EutE	ZP_04573939
Propionaldeído desidrogenase dependente de CoA	ZP_00232619
Aldeído	YP_003261430
Desidrogenase EutE	YP_311399
Proteína hipotética CKO_00340	YP_001451939
Proteína de utilização etanolamina (EutE)	YP_066775

- Tabela 1T.** Homólogos adequados para a proteína DhaT (1,3-propanodiol desidrogenase, proveniente de *Klebsiella pneumoniae* 342, EC Nº 1.1.1.202, que age em 5-hidróxipentanal a fim de produzir 1,5-pentanodiol; Proteína de nº de acesso YP_002236499 (Fouts et al., PLoS Genet. 4 (7), E1000141 (2008))).

Nome da proteína	Nº de acesso da proteína
1, 3-propanodiol desidrogenase	ABD74004
1, 3-propanodiol desidrogenase	YP_698334
Álcool desidrogenase	YP_001211060
1,3-propanodiol desidrogenase	YPJ796272
Álcool desidrogenase que contém ferro	YP_003192340
Proteína hipotética conservada	ZP_06063679
Proteína hipotética BB14905J2250	ZP_01723545
Proteína EutG	ZP_02497862
1,3-propanodiol desidrogenase	AAXI 2915
1, 3-propanodiol desidrogenase	AAM54730

- Tabela 1U.** Homólogos adequados para a proteína EutG (álcool desidrogenase previsto em etanolamina de utilização, proveniente de subcepa K-12 de cepa *Escherichia coli* W3110, EC. Nº 1.1.1.202, que age em 5-hidróxipentanal a fim de produzir 1,5-pentanodiol; Proteína de nº de acesso AP_003038 (Riley et al, Nucleic Acids Res. 34 (1), 1 a 9 (2006))).

Nome da proteína	Nº de acesso da proteína
Proteína de utilização etanolamina EutG	YP_001881244
Proteína hipotética CKO_00342	YP_001451941
Proteína hipotética SPAB_00492	YP_001586758
Transporte de proteína em etanolamina de utilização putativo	YP_002920649

álcool desidrogenase putativo	ZP_03365534
Proteína de utilização etanolamina eutG	ZP_02156849
Proteína de utilização etanolamina eutG	ZP_04637792
eutG	AAA80211
Álcool desidrogenase que contém ferro	NP_634793
Proteína de utilização etanolamina EutG	ZP_06015246

Tabela 1V. Homólogos adequados para a proteína ArgO (YggA) (proteína exportadora de arginina, proveniente da subcepa K-12 de cepa *Escherichia coli* MG 1655, que age em L-lisina (*citoplasma*) e produz L-lisina (fora); Proteína de nº de acesso. NP_417398 (Nandineni e Gowrishankar, J. Bacteriol. 186:3539 a 3546 (2004))).

5

Nome da proteína	Nº de acesso da proteína
Proteína exportadora de arginina	YP_409404
Produto de proteína não nomeado	CAA32607
Proteína exportadora de arginina	ZP_04560344
Proteína exportadora de arginina	NP_461982
Proteína exportadora de arginina	YP_001336979
Proteína exportadora de arginina argO	YP_003211829
Proteína exportadora de arginina	YP_002649944
Proteína exportadora de arginina argO	ZP_04613777
Proteína exportadora de arginina	NP_930824
Proteína exportadora de arginina ArgO	ZP_01988459

Tabela 1W. Homólogos adequados para a proteína LysE (permease de efluxo de lisina, proveniente de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13.032, que age em L-lisina (*citoplasma*) a fim de produzir L-lisina (fora); Nº de acesso da proteína NP_600485 (Tokyo Research Laboratories, Kogyo Co. Ltd., Japão, submissão direta a NCBI)).

10

Nome da proteína	Nº de acesso da proteína
Proteína exportadora de lisina	Q8RQM4
Proteína exportadora arginina ArgO	ZP_04835056
Proteína exportadora de lisina	ZP_0393395
Proteína exportadora de lisina	ZP_03931790
Exportador de L-lisina	YP_002958101
Proteína exportadora de lisina	ZPJ5123881
Transportador de amino ácido LysE	NP_794117
Proteína exportadora arginina	ZP_03832031
Proteína hipotética ECs3794	ACI78466
Transportador de família LysE	NP_353947

Tabela 1X. Homólogos adequados para a proteína LysP (transportador de LysP lisina APC, proveniente de subcepa K-12 de cepa *Escherichia coli* MG16655, que age em L-lisina (fora) e produz L-lisina (*citoplasma*); Proteína de nº de acesso. NP_416661 (Steffes et al., J Bacteriol 174(10): 3242 a 9 (1992))).

Nome da proteína	Nº de acesso da proteína
Transportador de lisina	YP_002383360
Proteína hipotética CIT292_03450	ZP_03837490
Transportador de lisina	YP_001336242
Permease específico de lisina	YP_003211189
Transportador de lisina	ZP_03383884
Transportador de lisina	NP_930088
Permease específico de lisina	ZP_04623004
região associada ao amino ácido permease	YP_001565334
Permease específico de lisina; superfamília amino ácido-poliamina-organocación (APC)	YP_002008821
Região associada ao amino ácido permease	YP_776515

5 **Tabela 1Y.** Homólogos adequados para a proteína CadA (lisina descarboxilase I5 proveniente da subcepa K-12 de cepa *Escherichia coli* W3110, que age em Lisina a fim de produzir Cadaverine; Proteína de nº de acesso. AP_004633 (Riley et al., Nucleic Acids Res. 34 (1), 1 a 9 (2006))).

Nome da proteína	Nº de acesso da proteína
Lisina descarboxilase	ZP_06166000
Proteína hipotética SARI_00317	YP_001569398
Família Orn/Lys/Arg descarboxilase, putativo	YP_002932309
Arginina/lisina/ornitina descarboxilase	ZP_06179259
Lisina descarboxilase 1	YP_205440
Lisina descarboxilase	ZP_04636370
Lisina descarboxilase 2	ZP_04559973
Lisina descarboxilase 2, constitutivo	YP_002396273
Lisina descarboxilase	ZP_04617787
Lisina descarboxilase, constitutivo	YP_855733

10 **Tabela 1Z.** Homólogos adequados para a proteína LdcC (lisina descarboxilase 2, proveniente da sub cepa K-12 da cepa de *Escherichia coli* MG 1655, que age em Lisina a fim de produzir Cadaverine; Proteína de nº de acesso. NP_414728 (Riley et al., Nucleic Acids Res. 34 (1), 1 a 9 (2006))).

Nome da proteína	Nº de acesso da proteína
Lisina descarboxilase 2	NP_706131
Proteína hipotética CKO_03180	YP_001454701
Lisina descarboxilase, constitutivo	ZP_02686615
Lisina descarboxilase, constitutivo	YP_002240326

Lisina descarboxilase, constitutivo	YP_003209178
Lisina descarboxilase	YP_002647915
Lisina descarboxilase	ZP_04621086
Lisina descarboxilase 1	YP_003294813
Lisina descarboxilase 1	YP_859739
Família Orn/Lys/Arg descarboxilase, putativo	YP_002931768

Tabela 1AA. Homólogos adequados para a proteína YjeK (lisina 2,3-aminomutase, proveniente da sub cepa K-12 de cepa de *Escherichia coli* MGI 655, que age em L-lisina a fim de produzir (R)-b-Lisina; Proteína de nº de acesso. NP_418570 (Riley et al., Nucleic Acids Res. 34 (I)5 1 a 9 (2006))).

Nome da proteína	Nº de acesso da proteína
Proteína hipotética SFV_4304	YP_691589
Lisina aminomutase putativo	YP_002385208
Proteína hipotética conservada	ZP_04559561
Proteína de família KamA	YP_002240896
Aminomutase putativo	NP_463197
Proteína hipotética ESA_00156	YP_001436296
Proteína de família YodO lisina 2, 3-aminomutase	YP_003019317
Proteína hipotética ETAE_0333	YP_003294390
proteína yjeK de família não caracterizada kamA	ZP_04617468
Lisina 2, 3-aminomutase	YP_002157135

- 5 Uma modalidade fornece um transgênico ou organismo recombinante para produzir P(5HV) ou outros PHAs que contém monômeros 5HV. O organismo pode ser procariótico ou eucariótico. Procariotos adequados incluem mas não estão limitados a bactérias, por exemplo *E. coli*.

10 **B. Métodos e Materiais para produzir Organismos Recombinantes ou Células**

1. Organismos ou Células a serem Modificados

- Organismos ou células que podem ser modificados para produzir 5HV que contém biopolímeros PHA, 5-aminopentanoato (5 AP), 5-hidróxi-valerato (5HV), glutarato e 1,5-pentanodiol (PDO) inclui eucariotas e procariotos. Procariotos adequados incluem bactérias. Inúmeras bactérias podem ser geneticamente modificadas a fim de produzir poli(hidróxi alcanoatos). Exemplos incluem *E. coli*, *Alcaligenes lotus*, *Alcaligenese eutrophus*, *Azotobacter*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Corynebacterium glutamicum*, *Rhodococcus* e *Brevibacterium lactofermentum*. Procariotos adicionais incluem, mas não estão limitados a, eubactéria, como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por exemplo, *Enterobacteriaceae* como *E. coli*. Diversas cepas de

E. coli estão disponíveis publicamente, como a cepa *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* XI 776 (ATCC 31.537); (ATCC 27.325) e K5772 (ATCC 53.635).

Estes incluem organismos que já produzem poli(hidróxi alcanóatos), modificados para utilizar substratos alternativos ou incorporar monômeros adicionais, ou a fim de aumentar a produção, e organismos não produzem poli(hidróxi alcanóatos), mas que expressam nada para algumas das enzimas necessárias para a produção de poli(hidróxi alcanóatos). *R. eutropha* é um exemplo de um organismo que produz PHAs naturalmente. *E. coli* e *C. glutamicum* são exemplos de organismos em que seria necessário de introduzir transgênicos que encodificam as enzimas para produção de PHA.

Para a produção das substâncias químicas C5 5-aminopentanoato (5AP), 5-hidróxi-valerato (5HV), glutarato e 1,5-pentanodiol, em que as mesmas não são polimerizadas para 5-hidróxi-valerato que contem PHAs mas secretados no meio de crescimento, então as mesmas são úteis para usar microorganismos industriais que são utilizados para manufaturar lisina. *Corynebacterium glutamicum*, incluindo suas subespécies *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium efficiem* e *Brevibacterium divaricatum*, que foram usadas para a produção industrial de L-lisina (Microbiol. Monogr.5:39 a 70 (2007)), é um exemplo dos microorganismos que podem ser desenvolvidos para a produção de glutarato, 1,5-pentandiol, 5-hidróxi-valerato e outros produtos que podem ser produzidos a partir de lisina via trajetórias de degradação de lisina descritas nesta invenção. *E. coli* modificado também tem sido usado para a produção de lisina. Os procedimentos para obter cepas de *C. glutamicum* para a produção de L-lisina como mutagênese aleatória e subsequente seleção do mutante que resistiu aos tóxicos análogos da lisina, como S-(2-aminoetila) cistina e introdução de alelos mutantes de alvos do gene como *lysC* e *horn* que encodificam aspartato quinase e homoserina desidrogenase, respectivamente, são bem estabelecidos e foram descritos (Curr. Opin. Microbiol. 9:268 a 274 (2007)). Aspartato quinase está sujeito a uma inibição de reação por treonina e lisina e a liberação desta enzima proveniente da inibição de reação é estimada como uma das características chave para desenvolver cepas produtoras de lisina. Outro alvo de engenharia para o desenvolvimento das cepas capazes de produzir materiais químicos derivados a partir de trajetórias de degradação de lisina é a exportação de lisina como LysE em *C. glutamicum*. A mutagênese do gene *lysE* da produção de cepas de *C. glutamicum* L-lisina irão prevenir a excreção de lisina proveniente do citoplasma e

portanto aumenta o rendimento de produtos via trajetória criada para converter lisina em produto. Métodos para construir cepas de *C glutamicum* para a produção de PHAs como PHB também são conhecidas na técnica (Jo, S-J et. Al., 2006. J. Bioscience e Bioengineering 102: 233 a 236).

- 5 Organismos eucarióticos ou células adequadas incluem fungos como fungos filamentosos ou levedura. O *Saccharomyces cerevisiae* é um microorganismo hospedeiro eucariótico inferior comumente usado.

2. Métodos para Geração de Organismos Transgênicos

i. Transfecção extracromossômica

- 10 DNA vetorial pode ser introduzido em células procarióticas ou eucarióticas via transformação convencional ou técnicas de transfecção. Conforme o uso na presente invenção, os termos "transformação" e "transfecção" são destinados para referirem-se a uma variedade de técnicas reconhecidas pela técnica para a introdução de um ácido nucléico estrangeiro (por exemplo, um DNA) em uma
- 15 célula hospedeira, incluindo uma transformação química como a coprecipitação do fosfato de cálcio ou do cloreto de cálcio, DEAE-dextrano-mediado transfecção, lipofecção, ou eletroporação. Técnicas de transformação convencional são descritas em Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, terceira edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- 20 Transformações em levedura são tipicamente executadas de acordo com o método de Van Solingen et al. *J Bact*, 130:946 (1977) e Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sc. (USA)*, 76:3829 (1979).

ii. Integração Cromossômica

- Métodos para a incorporação de construções planejadas de gene em um
- 25 DNA cromossômico de células bacterianas de Gram negativo e de Gram positivo são bem conhecidos para aqueles versados na técnica. Mecanismos de integração típicos incluem recombinação homóloga usando DNA linearizado em cepas *recBC* ou *recD* followed by transdução P1 (Miller 1992, *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual & Handbook for Escherichia coli e Related Bacteria*. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.)
- 30 plasmídeos especiais (Hamilton et al., *J Bacteriol.* 171 :4617 (1989); Metcalf et al., *Plasmid* 35: 1 (1996); documento de patente U.S.Nº 5,470,727 para Mascarenhas et al.), ou por inserção aleatória usando sistemas baseados em transposição (Herrero et al. *J Bacteriol.* 172:6557 (1990); Peredelchuk & Bennett, *Gene*
- 35 187:231 (1997); Documento de patente U.S. Nº 5,595,889 para Richaud et al.;) O Documento de patente U.S. Nº 5,102,797 to Tucker et al.). Em geral, as cepas

microbianas que contém uma inserção são selecionadas com base de uma gene de resistência antibiótica adquirida que é suprida pela construção integrada. No entanto, a complementação de mutantes auxotróficos também pode ser usada. Os mesmos métodos podem ser utilizados para introduzir quaisquer dos transgenes codificando as várias trajetórias metabólicas descritas neste documento. Alguns desses métodos são descritos em maiores detalhes abaixo com respeito aos genes *pha*.

A expressão dos genes de interesse para uma integração cromossômica pode ser alcançado pela inclusão de uma sequência ativadora de transcrição (promotor) na construção de DNA a ser integrada. Direcionada ao local, a recombinação homóloga pode ser combinada com uma amplificação de expressão dos genes de interesse, conforme descrito pelo documento de patente U.S. Nº 5.000.000 para Ingram et al.

A integração cromossômica também pode ser alcançada pelos métodos de Datsenko e Wanner (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97:6640-6645 (2000)) e como usado no Exemplo 7, abaixo.

Uma série de cassetes de expressão foi desenvolvida para inserir genes heterólogos em cromossomos bacterianos. Esses cassetes são baseados no sistema de distribuição de transposição conforme descrito por Herrero et al., *J Bacteriol.* 172:6557-67 (1990); de Lorenzo et al., *J Bacteriol.* 172:6568 (1990). Embora esses sistemas especifiquem transferência conjugada mediada por RP4 e usa apenas a transposição Tn10 e Tn5, e qualquer combinação de extremidades de transposição e de sistemas de distribuição pode ser adaptada para a tecnologia descrita, resultando em uma produção de PHA homogênea e prolongada.

A seguinte aproximação geral é usada para a geração de produtores de PHB *E. coli* transgênico: (1) um gene (*abr*) de resistência antibiótica sem promotor é clonado no poliligante de um plasmídeo adequado como pUC18NotI ou pUC18SfiI de forma que maior parte do poliligante é à montante de *abr*; (2) genes *pha*, genes que codificam uma transaminase GABA, um succínico semi-aldeído redutase e uma 4-hidróxi-butirato-CoA transferase são subsequentemente clonadas à montante de e na mesma orientação que o gene *abr*; (3) o cassete *pha-abr* é excisado como um fragmento NotI ou AvrII (AvrII reconhece o local SfiI em pUC18SfiI) e clonado nos locais correspondentes de qualquer plasmídeo como aqueles das séries pUT ou pLOF; (4) os plasmídeos resultantes são mantidos em cepas de *E. coli* λ *pir* e eletroporado ou conjugado na cepa escolhida de *E. coli* em que esses plasmídeos não se replicam; e (5) novas cepas em que o

cassete *pha-abr* tenha se integrado com sucesso no cromossomo, são selecionadas em um meio seletivo para o hospedeiro (por exemplo, o ácido nalidíxico quando o hospedeiro é resistente ao ácido nalidíxico) e para o cassete (por exemplo, cloranfenicol, canamicina, tetraciclina, cloreto mercúrio, bialafos).

- 5 Os integrantes *pha* resultantes são triados em meio mínimo na presença de glicose para crescimento e formação PHB.

Diversas modificações deste procedimento podem ser feitas. Se o marcador de resistência antibiótica sem promotor não é o usado, a inserção dos genes *pha* é selecionada baseada em um marcador presente no vetor e cepas

- 10 integradas produzindo o nível desejado de PHA são detectadas por triagem para produção de PHA. Os genes *pha* podem ter, mas não precisam, de sequências de transcrição endógena, como sequências ativadoras à montante, local aglutinante de polímeroase RNA, e/ou sequências de operador. Se os genes *pha* não tenham tais sequências, a aproximação descrita é limitada ao uso de vetores como as
- 15 séries pUT em que a transcrição pode proceder através das sequências de inserção. Essa limitação é devida a inabilidade da polímeroase RNA em ler através das regiões flangeadoras Tn10 dos plasmídeos pLOF. O gene *abr* pode carregar suas próprias sequências de expressão se for assim desejado. Ao invés de um gene *abr*, a construção pode ser projetada de forma que um gene
- 20 essencial sirva como um marcador seletivo quando a cepa hospedeira tem uma mutação no tipo de gene selvagem correspondente. Exemplos de genes úteis para esse propósito são geralmente conhecidos na técnica. Construções Diferentes podem ser integradas em um hospedeiro, ou subsequentemente ou simultaneamente, enquanto ambas construções carreguem diferentes genes
- 25 marcadores. Usando eventos de integração múltipla, genes *pha* podem ser integrados separadamente, por exemplo, o gene polímeroase PHB é integrado primeiro como um *phaC-cat*, seguido por uma integração de genes de tiolase e redutase como um cassete *phaAB-kan*. Alternativamente, um cassete pode conter todos os genes *pha* enquanto que outro cassete contém apenas alguns genes
- 30 *pha* requeridos a fim de produzir um polímero desejado PHA.

Em alguns casos um vetor de integração de transposição como pJMS11 (Panke et al. *Appl. Environ. Microbiol* 64: 748-751) pode ser usado de tal modo que um marcador selecionável possa ser excisado do cromossomo da cepa integrada. Isso é útil por muitas razões incluindo fornecer um mecanismo para inserir

- 35 construções de transposição múltipla usando o mesmo gene marcador excisado o marcador seguindo cada evento de inserção.

3. Fontes de *pha* e Outros Genes Envolvidos na Formação PHA

Uma referência geral para genes envolvidos na formação PHA é Madison e Huisman, 1999, *Microbiology e Molecular Biology Reviews* 63: 21-53. Os genes *pha* podem ser derivados de diferentes fontes e combinados em um único organismo, ou da mesma fonte.

i. Redutase de Genes Codificadores

A Redutase de Genes Codificadores foi isolada de *A. latus*, *R. eutropha* (Peoples & Sinskey, *J Biol. Chem.* 264(26): 15298-303 (1989); *Acinetobacter* sp. (Schembri, et al., *J Bacteriol.* 177(15):4501-7 (1995)), *C. vinosum* (Liebergesell & Steinbuchel, *Eur. J. Biochem.* 209(1): 135-50 (1992)), *P. acidophila*, *P. denitrificans* (Yabutani, et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 133 (1-2):85-90 (1995)), *R. meliloti* (Tombolini, et al., *Microbiology* 141 :2553-59 (1995)) e *Z. ramigera* (Peoples, et al., *J. Biol. Chem.* 262(1):97-102 (1987)). O documento de patente U.S. Nº 7,229,804 expõe organismos transgênicos que produzem P4HB usando o gene *4HbD* que codifica o 4-hidróxi-butirato desidrogenase de *C. kluyveri* (Sohling e Gottschalk, *J Bacteriol* 178, 871 880 (1996)). *4hbD* requer NADH. Redutases preferenciais incluem, mas não estão limitadas a aquelas que não requerem NADH. Redutases exemplificadoras incluem *AKR7A5* de *Mus musculus* (GenInfo identificador Nº :27659727)(Hinshelwood, A. et al. *FEBS Letters* 523:213-218 (2002), *GHBDH* de *Arabidopsis thaliana* (GI: 145338934) (Breitkreuz, K. et al. *J. Biol Chem.* 278:41552-41556, ATEGJ) 0539 de *Aspergillus terreus* (GI: 115491994).

ii. Transferase CoA e Sintetase CoA

Transferases CoA adequadas (EC 2.8.3.n) incluem mas não estão limitadas a *orfZ* de *C. kluyveri*. A sequência de *orfZ* é fornecida no documento de patente U.S. Nº. 7,229,804 para Huisman et al. e é incorporada como referência em sua totalidade. Outra transferase CoA adequada inclui *abjT* de *C. aminobutyricum* (Gerhardt et al., *Arch Microbiol* 74:189-199 (2000)). Outras enzimas que poderiam produzir Acil-CoA inclui sintetases CoA (EC 6.2.1.3). Essas enzimas usam ATP e liberam o CoA para catalisar a adição covalente de CoA ao ácido carboxílico e tem sido descritos em van Beilen et al. (*Molec Microbiol* (1992) 6:3121-3136) e Aquin et al, (WO 02/40690 A2).

iii. Genes codificadores de polímeroase PHA

Genes codificadores de polímeroase PHA tem sido isolados de *Aeromonas caviae* (Fukui & Doi, *J Bacteriol.* 179(15):4821-30 (1997)), *A. latus*, *R. eutropha* (Peoples & Sinskey, *J Biol. Chem.* 264(26): 15298-303 (1989); *Acinetobacter*

- (Schembri, et al., J Bacteriol. 177(15):4501-7 (1995)), *C vinosum* (Liebergesell & Steinbuchel, Eur. J. Biochem. 209(1): 135-50 (1992)), *Methylobacterium extorquens* (Valentin & Steinbuchel, Appl. Microbiol. Biotechnol 39(3):309-17 (1993)), *Nocardia corallina* (GenBank Ace. No. AF019964), *Nocardia salmonicolor*, *P. acidophila*, *P. denitrificans* (Ueda, et al., J. Bacteriol 178(3):774-79 (1996)), *Pseudomonas aeruginosa* (Timm & Steinbuchel, Eur. J. Biochem. 209(1): 15-30 (1992)), *Pseudomonas oleovorans* (Huisman, et al., J Biol. Chem. 266:2191-98 (1991)), *Rhizobium etli* (Cevallos, et al, J Bacteriol 178(6): 1646-54 (1996)), *R. meliloti* (Tombolini, et al., Microbiology 141 (Pt 10):2553-59 (1995)),
 10 *Rhodococcus ruber* (Pieper & Steinbuchel, FEMS Microbiol Lett. 96(1):73-80 (1992)), *Rhodospirillum rubrum* (Hustede, et al., FEMS Microbiol. Lett. 93:285-90 (1992)), *Rhodobacter sphaeroides* (Steinbuchel, et al., FEMS Microbiol. Rev. 9(2-4):217-30 (1992); Hustede, et al., Biotechnol Lett. 15:709-14 (1993)), *Synechocystis* sp. (Kaneko, DNA Res. 3(3): 109-36 (1996)), *T. violaceae*
 15 (Liebergesell & Steinbuchel, Appl. Microbiol. Biotechnol. 38(4): 493-501 (1993)) e *Z ramigera* (GenBank Ace. No. U66242).

Outros genes que não foram envolvidos na formação PHA, mas que compartilham homologia significativa com os genes pha e/ou produtos de gene correspondentes, também podem ser usados. Genes com homologia significativa
 20 ao gene phaB que codificam acetoacetil CoA reductase foram isolados de diversos organismos, incluindo *Azospirillum brasiliense* (N^{os} de Acesso NCBI X64772, X52913) *Rhizobium* sp. (N^{os} de Acesso NCBI U53327, Y00604), *E. coli* (N^o de Acesso NCBI D90745), *Vibrio harveyi* (N^o de Acesso NCBIU39441), *H. influenzae* (N^o de Acesso NCBIU32701), *B. subtilis* (N^o de Acesso NCBI U59433),
 25 *P. aeruginosa* (N^o de Acesso NCBI U91631), *Synechocystis* sp. (N^o de Acesso NCBI D90907), *H. pylori* (N^o de Acesso NCBI AE000570), *Arabidopsis thaliana* (N^o de Acesso NCBI X64464), *Cuphea lanceolata* (N^o de Acesso NCBI X64566) e *Mycobacterium smegmatis* (N^o de Acesso NCBI U66800)

30 III. Métodos de produção PHAs que contém 5HV e Substâncias químicas C5

Métodos para a produção de poli(hidróxi alcanato)s usando fontes de carbono renovável conforme matéria-prima é fornecida. Em uma modalidade preferencial, bactérias são transformadas ou transfectadas com um ou mais construtos de ácido nucléico que codificam os genes necessários para a produção
 35 de 5-aminopentanoato (5AP), 5-hidróxi-valerato (5HV), glutarato e 1,5-pentanodiol (PDO) e polímeros do mesmo a partir de fontes renováveis.

IV. Métodos de uso

Os organismos transgênicos apresentados podem ser utilizados para produzir substâncias químicas C5 como 5-aminopentanoato (5AP), 5-hidróxi-valerato (5HV), glutarato e 1,5-pentanodiol (PDO) assim como biopolímeros de PHA que compreendem monômeros de 5HV. No caso da produção de substâncias químicas C5, o organismo recombinante que expressa o(s) transgene(s) apropriado(s), incluindo, opcionalmente, os genes que codificam trajetórias de competição inativadas ou excluídas, é cultivado em um substrato de fermentação renovável. O substrato é selecionado a partir de carboidratos, lisina, óleos vegetais de prolina, ácidos graxos ou combinações dos mesmos. Uma combinação útil para algumas modalidades seria uma mistura de glicose e lisina. Outra combinação adequada seria sacarose e lisina. Preferencialmente, a matéria-prima compreende predominantemente um substrato, por exemplo, glicose ou sacarose. Substratos de carboidrato adequados compreendem um ou mais açúcares selecionados a partir de glicose, frutose, xilose, arabinose, sacarose, lactose e maltose. Para a produção de substâncias químicas C5, o organismo recombinante é cultivado no substrato renovável até que o produto final desejado acumule no meio de crescimento, em cujo momento as células são removidas por floculação, sedimentação, centrifugação ou filtração e o produto é recuperado a partir do meio isento de célula por procedimentos padrões. Tais procedimentos são conhecidos na técnica pela recuperação de outros ácidos e dióis produzidos por fermentação, como ácido láctico, ácido succínico, ácido 3-hidróxi propiônico, 1,3-propanodiol e 1,4-butanediol.

Os organismos recombinantes podem ser usados para a produção de fermentação de 5HV que contém biopolímeros de PHA incluindo os homopolímeros P5HV e 5HV que contém copolímeros de PHA ao cultivar os organismos na presença de fontes de carbonos renováveis, como glicose, lisina, etc. e outros substratos selecionados para fornecer um polímero ou copolímero desejados. Os organismos recombinantes são cultivados nos substratos até que os polímeros de PHA acumulassem dentro das células em cujo momento os polímeros de PHA são extraídos das células por métodos conhecidos a aqueles versados na técnica. O 5HV que contém polímeros de PHA obtidos a partir dos organismos pode ser usado em uma faixa ampla de aplicações de plástico industrial, como para filmes, fibras, espumas, bens moldados por injeção, garrafas moldadas a sopro, revestimento de papel e similares. Eles também podem ser usados para aplicações biomédicas, incluindo aumento de tecido, a fim de

produzir válvulas de coração, como suturas e a fim de produzir enxertos vasculares. Co-polímeros exemplificadores incluem, mas não se limitam a, PHB5HV e p(3-hidróxi-propionato-co-5-hidróxi-valerato) p(4-hidróxi butirato-co-5-hidróxi-valerato). Os organismos recombinantes podem ser geneticamente modificados para incluir genes adicionais como β -cetotiolase e acetoacetyl-CoA reductase conforme necessário para a produção de copolímeros.

A não ser que seja definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado conforme compreendido comumente por aquele versado na técnica ao qual a invenção apresentada pertence.

Exemplos

Exemplo 1: Biosíntese de P(5HV) homopolímero a partir de 5-hidróxi-valerato de sódio

Como uma primeira demonstração da habilidade de sintetizar 5HV-que contém PHAs, 5-hidróxi-valerato de sódio (Na5HV) foi fornecido como alimento a cepas de *E. coli* que expressam ambas uma CoA transferase ou CoA sintetase e uma PHA sintetase, para determinar se o monômero de 5HV fornecido como alimento seria aceito e incorporado diretamente no P(5HV) homopolímero. Na5HV foi sintetizado através de hidrólise de base de δ -valero lactona (DVL). Esse procedimento envolvei adicionar 0,1 mol de NaOH a 50 ml de metanol com agitação até que dissolvido. A isto, 0,1 mol de DVL foi adicionado com agitação vigorosa. O precipitado resultante foi seco, dissolvido em água, ajustado ao pH a 8,5 e esterilizado por filtro com um filtro de 0,2 μ M. A análise de solução salina foi realizada em um HPLC de Waters Alliance para confirmar que todo o DVL foi saponificado.

Combinações diferentes de genes de CoA transferase/sintetase e PHA sintetase foram testadas para encontrar a melhor combinação adequada para a produção de P(5HV). As CoA transferases/sintetases testadas foram *C. kluyveri orfZ* e *P. oleovorans alkK* e as PHA sintetases foram *R. eutrophaphaC* e *T. pfenigii phaEC* (Tabela 1A). Todas as cepas usadas nessa experiência foram derivadas de MG1655 (Jensen, J. Bacteriol, 175(11):3.401 a 3.407 (1993)). Quatro plasmídeos de expressão (pFS92, pMS96; pMS93 e pMS102), que contêm, cada um, combinações diferentes de CoA transferase/sintetase e PHA sintetase, foram construídos conforme descrito nos parágrafos seguintes.

Construção de Plasmídeo

O plasmídeo pFS30 foi construído pela digestão de pAET41 (Peoples e Sinskey, J. Biol Chem. 264(26): 15.298 a 15.303 (1989)) com XmaI e StuI para remover um fragmento que contém *R. eutropha phaC* e seu promotor nativo (P_{Re}). Plasmídeo pAET41 é um vetor pUC18 (Nº de Acesso L08752) que contém um
 5 fragmento cromossômico de *R. eutropha* H16 englobando o gene *phaC*. O plasmídeo pFS16 (Skrally e Peoples, Patente U.S. Nº 6.323.010), que é um derivado de pTrc99a (Pharmacia, Uppsala, Suécia) que contém o gene *orfZ* de *C. kluyveri* (Tabela 1A) sob o promotor P_{Trc} , foi digerido com BamHI, embotado com T4 polimerase e digerido uma segunda vez com XmnI anteriormente à ligação
 10 com o fragmento P_{Re} -*phaC* XmaI-StuI. O plasmídeo resultante foi designado pFS30 e continha a fusão de operon *phaC-orfZ* sob o promotor constitutivamente expresso P_{Re} .

O plasmídeo pFS92 foi feito em um processo de múltiplas etapas. Primeiro, *T. pfenigii phaE* foi amplificado a partir de pMON25893 (Reiser et al., Appl. Microbiol, Biotechnol 53(2):209 a 218 (2000)) com iniciadores FS-E5' e FS-E3',
 15 que contêm os sítios de restrição EcoRI e Acc65I modificados. O produto de PCR *phaE* foi, então, digerido com as enzimas de restrição EcoRI e Acc65I e ligado ao pTrcN digerido de maneira similar (Gerngross et al, Biochemistry 33:9.311 a 9.320 (1994)) para formar pFS89. A sequência de iniciador para FS-E5' é (5')-GGAATTCAGGAGGTTTTTATGAACGATACGGCCAACAAGACCAGC (SEQ ID NO:1) e a sequência de iniciador para FS-E3' é (5')-GGGGTACCTCACTGGCCGGTGGTGGGCTTGGTGGTCTTGCGGCG (SEQ ID NO:2). A seguir, *T. pfenigii phaC* foi amplificado a partir de pMON25894 (Reiser et al., Appl, Microbiol. Biotechnol. 53(2):209 a 218 (2000)) com os iniciadores FS-C5' e FS-C3', que contêm os sítios de restrição Acc65I e BamHI modificados. O
 25 produto de PCR *phaC* foi, então, digerido com as enzimas de restrição Acc65I e BamHI e ligado a pTrcN digerida de maneira particular para formar pFS90. A sequência de iniciador para FS-C5' é (5')-GGGGTACCAGGAGGTTTTTATGTCCCCATTCCCGATCGACATCCG (SEQ ID NO:3) e a sequência de iniciador para FS-C3' é (5')-CGGGATCCTCAGCCGCGTTCGTTTCAGCCAGCGGCCGATCGCCG (SEQ ID NO:4). Posteriormente, *T. pfenigii phaE* e *phaC* foram clonados individualmente em pTrcN para formar pFS89 e pFS90, respectivamente, *phaE* foi clonado a
 30 montante de *phaC* ao digerir pFS89 com MluI e Acc65I, isolando o fragmento que contém *phaE* e ligando-o a uma preparação digerida de maneira similar de pFS90. O plasmídeo resultante, pFS91, continha a fusão de operon *phaEC* sob o

promotor P_{Trc} . Finalmente, pFS92 foi criado ao ligar um fragmento de MluI-BamHI de pFS91 que contém *phaEC* ao pFS16 que havia sido digerido com MluI e BamHI. O plasmídeo pFS92 contém a fusão de operon *phaEC-orfZ* sob o promotor P_{Trc} .

5 O plasmídeo pMS96 foi feito por clonagem de *alkK* (ver Tabela 1A) em pFS91 a jusante de *phaEC*. Primeiramente, *alkK* foi ampliado por PCR a partir do DNA genômico de *P. oleovorans* com o uso dos iniciadores K5-1 e K3-1, que foram modificados para incorporar sítios de BamHI nas extremidades do produto de PCR. A sequência para o iniciador K5-1 é (5')-
 10 GCTGAGGATCCAGGAGGTTTTATGTTAGGTCAGATGATGCGTAA TC (SEQ ID NO:5) e a sequência para o iniciador K3-1 é (5')-CTAGAGGATCCTTATTCACAGACAGAAGAACTACTG (SEQ ID NO:6). Seguindo a ampliação, o fragmento de PCR *alkK* e pFS91 (descrito no parágrafo acima) foram digeridos com BamHI e ligados para formar pMS96. A orientação de *alkK*
 15 em pMS96 foi verificada como sendo a mesma direção que *phaEC* por digestão de enzima de restrição, garantindo, assim, a construção apropriada de uma fusão de operon *phaEC-alkK* sob o promotor P_{Trc} .

Os plasmídeos pMS93 e pMS102 foram construídos ao primeiramente digerir pACYC 177 (Nº de Acesso X06402) com BspHI para remover o marcador
 20 *kan* e ligando-no ao sítio único de BspHI de pFS30 para formar pFS73, que contém *phaC-orfZ* sob o controle dos promotores seguidos P_{Trc} e P_{Re} . A região do promotor P_{Re} foi removida ao substituir o fragmento de EcoRI-BspEI de pFS73 que contém ambos P_{Re} e 837 bp da extremidade 5' do *phaC* CDS por um fragmento de EcoRI-BspEI a partir de pKAS4 (Peoples et al., Patente U.S. Nº
 25 5.480.794) que continha apenas o 837 bp a partir da extremidade 5' de *phaC*. Esse plasmídeo resultante, que contém *phaC-orfZ* apenas sob o promotor P_{Trc} , foi designado pMS93. Para criar pMS102, o gene *orfZ* foi removido de pFS73 ao digerir com DraI e se auto-ligando à cadeia principal do plasmídeo para formar pMS74. O gene *alkK* foi ampliado por PCR a partir do plasmídeo pTrcN-A.eut-
 30 AlkK (descrito abaixo) com o uso de iniciadores K5-2 e K3-2. A sequência para o iniciador K5-2 é (5')-AATTCAGGAGGTTTTATGTTAGGTCAGATGATGCGTAATC (SEQ ID NO:7) e a sequência para o iniciador K3-2 é (5')-GATCCTTATTCACAGACAGAAGAACTACTG (SEQ ID NO: 8). O plasmídeo
 35 pMS74 foi, então, digerido com SpeI e SbfI e, então, suas extremidades foram tornadas abruptas através de preenchimento Klenow e o fragmento de PCR de

alkK ligado à cadeia principal abrupta de pMS74 para formar pMS92. O plasmídeo pMS92 contém, portanto, a fusão de operon *XhsphaC-alkK* sob o controle de promotores seguidos P_{Trc} e P_{Re} . A fim de expressar o operon exclusivamente a partir do promotor P_{Trc} induzível por IPTG, a região do promotor P_{Re} foi removida ao substituir o fragmento EcoRI-BspEI de pMS92 que contém ambos o P_{Re} e 837 bp da extremidade 5' do *phaC* CDS com um fragmento de EcoRI-BspEI de pMS93 que continha apenas o 837 bp da extremidade 5' de *phaC*. Esse plasmídeo resultante, que contém *sob o promotor* P_{Trc} , foi designado pMS102.

O plasmídeo pTrcN-A.eut-AlkK foi criado primeira mente através de *alkK* de amplificação por PCR de DNA genômico de *P. oleovorans* com o uso de iniciadores Posynrbs.c (5'-GGAATTCAGGAGGTTTTATGTTAGGTCAGATGATGCGTAATCAG) (SEQ ID NO:9) e Posynrbs.r (5'-CGGGATCCTTATTCACAGACAGAAGAACTACTGCG) (SEQ ID NO: 10). O produto de PCR resultante foi digerido com EcoRI e BamHI e ligado a pTrcN similarmente digerido para criar pTrcN-AlkK. O promotor P_{Re} foi, então, amplificado por PCR de DNA genômico de *Ralslonia eutropha* com o uso de iniciadores A.eutPhaG.c (5'-GGAATTCGGATCCCAAGTACCTTGCCGACATCTATGCGCTGGC) (SEQ ID NO:11) e A.eut.EcoRI.r (5'-GGAATTCCCGGCTCCGGGATTGCCCTGGCCGGACT) (SEQ ID NO: 12). O produto de PCR resultante foi digerido com EcoRI e ligado a pTrcN-AlkK similarmente digerido a fim de criar pTrcN-A.eut-AlkK.

Os plasmídeos pFS92, pMS96, pMS93 e pMS102 foram individualmente transformados em MG1655 (Jensen, *J Bacteriol.* 175(11):3.401 a 3.407 (1993)) para criar quatro cepas portadoras de plasmídeo que continham diferentes combinações de CoA transferase/sintetase (*orfZ* ou *alkK*) e PHA sintetase (*phaC* ou *phaEC*). Estas cepas foram cultivadas em frascos de agitação de 250 ml para caracterizar produção de homopolímero P(5HV), conforme descrito na seção seguinte.

Meio, condições de crescimento e teste para a produção de homopolímero P(5HV) em culturas de frasco de agitação

Cada cepa MG 1655 portadora de plasmídeo foi cultivada de um dia para o outro em um tubo de teste que contém 3 ml LB (Sambrook ed Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (2001)) suplementado com antibiótico apropriado a 37°C com agitação de 250 rpm. Os antibióticos apropriados para cada cepa são como segue: 100 µg/ml de ampicilina foram

adicionados, de um dia para o outro, às culturas de cepas MG1655 portadoras de pFS92 e pMS96; e 50 µg/ml de Km foram adicionados, de um dia para o outro, às culturas de cepas MG1655 portadoras de pMS93 e pMS102. No próximo dia, 0,5 ml de cada cultura de um dia para o outro foi utilizado para inocular um frasco de

5 agitação que contém 50 ml de LB fresco suplementado com o antibiótico apropriado e cultivado a 37°C com agitação de 250 rpm. Em 3,5 horas, 0,1 mM de IPTG foi adicionado às culturas líquidas e em 5 horas, a cultura foi girada para baixo a 4150 rpm (centrífuga de bancada Sorvall Legend RT) e ressuspensa em 50 ml de meio de produção que contém 0,1 mM de IPTG e o mesmo antibiótico. O

10 meio de produção consiste na solução de sais mínimos E2 que contém 10 g/l de glicose, 2,5 g/l de LB, 10 g/l de NaSHV₅, 2mM de MgSO₄ e Solução de Sais Traço 1x. A solução estoque E2 50x consiste em 1,275 M de NaNH₄HPO₄·4H₂O, 1,643 M de K₂HPO₄ e 1,36 M de KH₂PO₄. A Solução Estoque de Sais Traço 100x é preparada através da adição para cada 1 L de 1,5 N de HCL: 50 g de

15 FeSO₄·7H₂O, 11 g de ZnSO₄·7H₂O, 2,5 g de MnSO₄·4H₂O, 5 g de CuSO₄·5H₂O, 0,5 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0,1 g de Na₂B₄O₇ e 10 g de CaCl₂·2H₂O.

As culturas ressuspensas foram transferidas para frascos de agitação de 250 ml e incubadas a 30°C durante 24 a 72 horas com agitação. Ao término do experimento, as culturas foram giradas para baixo a 4150 rpm, lavadas uma vez

20 com água destilada, congeladas a -80°C durante pelo menos 30 minutos e liofilizadas de um dia para o outro. No próximo dia, uma quantidade medida de pélete de célula liofilizada foi adicionada a um tubo de vidro, seguido por 3 ml de reagente de butanolise que consiste em uma mistura de volume igual de 99,9% de n-butanol e 4,0 N de HCl em dioxano com 2 mg/ml de difenilmetano como

25 padrão interno. Após tampamento dos tubos, os mesmos foram vortexados brevemente e colocados em um bloco de calor ajustado a 93°C durante seis horas com vortexação periódica. Posteriormente, o tubo foi resfriado até a temperatura ambiente antes da adição de 3 ml de água destilada. O tubo foi vortexado durante aproximadamente 10 s antes de ser girado para baixo a 620

30 rpm (centrífuga de bancada Sorvall Legend RT) durante 2 minutos. Foi pipetado 1 ml da fase orgânica em uma ampola de GC, que foi, então, analisada através de cromatografia gasosa-detecção de ionização de chama (GC-FID) (Hewlett-Packard 5890 Series II). A quantidade de homopolímero P(5HV) no pélete de célula foi determinada através de comparação contra curvas padrão que foram

35 produzidas através da adição de quantidades definidas de DVL em reações de

butanolise separadas. Três padrões de DVL que se situam entre 2 a 6 mg foram utilizados para criar curvas padrão.

Resultados experimentais

- 5 A Tabela 2 mostra que todos os construtos puderam gerar P(5HV). No entanto, MG1655 [pMS93] gerou significativamente mais P(5HV) que qualquer outra cepa demonstrando que a combinação de gene ideal para polimerizar P(5HV) é *phaC* e *orfZ*.

Tabela 2. Produção de homopolímero P(5HV)

Cepa [Plasmídeo]	Genótipo relevante	P(5HV) (%dcw)
MG1655 [pMS93]	<i>P_{trc}-phaC-orfZ</i>	54,6
MG1655 [pFS92]	<i>P_{trc}-phaEC-orfβ</i>	5,7 ±1,2
MG1655 [pMS96]	<i>P_{trc}-phaEC-alkK</i>	3,82
MG1655 [pMS102]	<i>P_{tr}-cphaC-alkK</i>	35,2

EXEMPLO 2: Biossíntese de copolímero P(3HB-co-5HV) de 5-hidroxivalerato de sódio

O próximo experimento serviu para demonstrar a produção do copolímero P(3HB-co-5HV) em uma cepa de *E coli* capaz de sintetizar os monômeros 3HB-CoA e 5HV-CoA e de incorporar os mesmos a PHA.

Construção da cepa

- 15 A cepa usada neste exemplo foi MBX2641, que é um derivado de MG 1655 que contém um operon que consistem em H16 *bktB*-B de *R eutropha phaB-kan* de *megaterium* aleatoriamente integrada ao cromossomo. Para executar a integração do operon, a cepa S17- λ pir (Miller e Mekalanos, *J Bacteriol* 170(6):2.575 a 2.583 (1988)) que contém pCJ022 (descrito abaixo) foi
- 20 correspondido com MBX1987, que é um mutante resistente ao ácido nalidíxico de MG1655, com o uso de um protocolo tirado da literatura (De Lorenzo e Timmis, *Methods Enzymol* 235:386 a 405 (1994)). Os derivados de MBX1987 que transportam o cassete *bktB-phaB-kan* no cromossomo foram selecionados em placas de LB que contém 30 µg/ml de ácido nalidíxico (NI) e 50 µg/ml de
- 25 kanamicina (Km). Um tal integrante que exibe um fenótipo N1^R Km^R foi salvo como MBX2079. Então, *phaEC-cat* foi aleatoriamente integrado ao cromossomo de MBX2079 através da correspondência com uma cepa S17- λ pir que transporta o vetor de integração pUT-C16-cat (descrito abaixo). Os integrantes de MBX2079 que transportam o cassete *phaEC-cat* no cromossomo foram selecionados em
- 30 placas de LB que contém 25 µg/ml de cloranfenicol (Cm). Diversos integrantes que possuem o fenótipo N1^R Km^R Cm^R foram agrupados e submetidos a nitrosoguanidina mutagênese (Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold

Spring Harbor Laboratory (1972)), com seleção em placas de LB que contêm 100 µg/ml de Cm. Um mutante foi isolado e designado MBX21 14. Finalmente, MBX2641 foi criado através da elevação de um lisado de P1 em MBX2114 e transduzido em MG1655 conforme descrito por Miller (*Experiments in Molecular*
 5 *Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory (1972)) com o uso de Km^R como seleção. Um tal transdutante foi salvo e designado MBX2641, que é MG1655 com o cassete de gene *bktB-phaB-kan* aleatoriamente integrado ao genoma.

Os plasmídeos pFS92 (vide Exemplo 1) e pJB84 (construção descrito abaixo) foram individualmente transformados em MBX2641 que contém *bktB-phaB-kan* aleatoriamente integrado ao cromossomo.
 10

Construção de plasmídeo

O plasmídeo pCJ022 foi produzido através da criação de um vetor de integração mini-TnJ que contém *bktB-phaB* a montante de um marcador *kan*. Para executar isto, o operon *bktB-phaB* foi montado em pSE380 (Invitrogen,
 15 Carlsbad, CA) primeiramente através de *bktB* de amplificação por PCR com iniciadores MS069 e MS070 de pMON25765 (Slater et al, *J. Bacteriol* 180(8): 1.979 a 1.987 (1998)). A sequência para o iniciador é (5')-GGTGGATCCTTAAGAGGAGGTTTTATGACGCGTGAAGTGGTAGTGG (SEQ ID NO: 13) e a sequência para o iniciador MS070 é (5')-GGTGCTAGCTCAGATACGCTCGAAGATGGCG (SEQ ID NO: 14). O fragmento de PCR resultante foi digerido com BamHI e NheI e ligado a pSE380 que foi cortado com as mesmas enzimas. O plasmídeo resultante foi designado pSE380-*bktB*. Posteriormente, *phaB* foi amplificado por PCR de pGMIO (McCool e Cannon, *J Bacteriol* 181(2):585 a 592 (1999)) com iniciadores MS071 e MS072. A
 25 sequência para o iniciador é (5')-GGTCCTAGGTTAAGAGGAGGTTTTATGACAACATTACAAGGTAAAG (SEQ ID NO: 15) e a sequência para o iniciador MS072 é (5')-GGTGCGGCCGCTTACATGTATAAGCCGCGTTAAT (SEQ ID NO: 16). O fragmento de PCR resultante foi digerido com AvrII e NotI e ligado a pSE380-*bktB*
 30 que foi tratado com as mesmas enzimas. O plasmídeo resultante foi designado pSE380-*bktBphaB19*. Após o operon ter sido montado, o mesmo foi movido para *pTrcN-kan* (um derivado de *pTrcN* que teve o gene *bla* substituído por gene *kan*) através da digestão de pSE380-*bktBphaB19* com EcoRI e SpeI e da ligação do fragmento que contém *bktB-phaB* a *pTrcN-kan* que foi cortado com EcoRI e XbaI.
 35 O plasmídeo resultante foi designado pMS115. O operon *bktB-phaB* foi, então, transferido de pMS115 para o vetor de integração pBSL118 (Alexeyev et al., *Can.*

J. Microbiol. 41: 1.053 a 1.055 (1995)) através da digestão de pMS115 e pBSL118 com BamHI e da ligação em conjunto a fim de produzir plasmídeo pCJ022, que foi utilizado para integrar *bktB-phaB* ao cromossomo de MG1655.

O plasmídeo pUT-C16cat foi produzido através da remoção de *phaEC* de pFS91 com EcoRI e XbaI e da clivagem abrupta das extremidades pegajosas com o uso de Klenow. O vetor de integração pUT-cat (De Lorenzo e Timmis, *Methods Enzymol.* 235:386 a 405 (1994)) foi digerido com AvrII, clivado abruptamente com o uso de preenchimento de Klenow e, então, ligado ao fragmento de *phaEC*. Após verificar que *phaEC* estava na mesma orientação como o marcador *cat* a jusante, o plasmídeo foi designado pUT-C16cat.

O plasmídeo pJB84 foi construído através da amplificação por PCR do marcador *aacC* (Gm^R) de pBSL202 (Alexeyev et al., *Can. J. Microbiol.* 41 : 1.053 a 1.055 (1995)) com o uso de iniciadores JB123b e JB124a, que foram modificados para incluir sítios de BspHI, nas extremidades de flaqueamento 5'. A sequência para o iniciador JB123b é (5')-TTATTTTCATGAACCCTCGAATTGACGCGCTC (SEQ ID NO: 17) e a sequência para o iniciador JB124a is (5')-TTATTTTCATGAGCTTATCGATACCGTCGACC (SEQ ID NO: 18). O fragmento de PCR resultante que contém o gene *aacC* foi digerido com BspHI e ligado a pMS93 que foi digerido com a mesma enzima para formar pJB84. Notar que esta última etapa foi efetuada para substituir o marcador *bla* (Ap^R) original em pMS93 com *aacC* (Gm^R) na mesma orientação.

Resultados experimentais

As cepas MBX2641 que transportam os plasmídeos pFS92 (descrito no Exemplo 1) ou pJB84 foram cultivadas e preparadas para análise por GC-FID conforme descrito no Exemplo 1. MBX2641 [pJB84] produziu mais copolímeros (69,5% dcw) e incorporou mais 5HV ao copolímero (82,3% PHA) conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Produção de P(3HB-co-5HV)

Cepa [plasmídeo]	Genes Relevantes Expressos	PHA Total (%dcw)	Incorporação de 3HB (% PHA)	Incorporação de 5HB (% PHA)
MBX2641 [pFS92]	<i>bktB-phaB</i> ; <i>phaEC-orfZ</i>	7,8	46	54
MBX2641 [pJB84]	<i>bktB-phaB</i> ; <i>phaC-orfZ</i>	69,5	18	82

EXEMPLO 3: Composição de monômero 5HV ajustável no copolímero P(3HB-co-5HV) e efeito nas propriedades do material

A composição do copolímero foi modulada através da alteração das quantidades de NaSHV e glicose adicionadas ao meio de produção. As formas alternativas para realizar isto incluem (1) alimentar diferentes quantidades de L-lisina ao meio de crescimento a uma célula recombinante que pode produzir 5HV de L-lisina conforme mostrado no Exemplo 6, ou (2) desregular genes de trajetória de L-lisina em células recombinantes que podem produzir 5HV de glicose através de L-lisina conforme mostrado no Exemplo 9 e 10.

Para demonstrar composição de monômero 5HV ajustável em copolímero P(3HB-co-5HV), cepa MBX2641 [pFS30] foi utilizada que expressa as enzimas para trajetória 3HB [*bktB* e *phaB*] em adição à CoA-transferase (ou *fZ*) e PHA sintetase (*phaC*). Culturas paralelas de MBX2641 [pFS30] foram cultivados em ambas concentrações decrescentes de glicose (10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0 g/L) ou NaSHV (10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0 g/L) e analisadas para teor de polímero como descrito no Exemplo 1. A tabela 4 mostra que diversas quantidades de 5HV podem ser incorporadas no copolímero P(3HB-co-5HV).

Tabela 4. Efeito de co-alimentado em incorporação de 5HV em P(3HB-co-5HV)

Alimentação de Glicose (g/L)	Alimentação de Na5hv (g/L)	PHA Total (%dcw)	Incorporação de 5HV (%PHA)
10	10	42,5±4,6	50,0±3,4
10	5	29,1	42,3
10	1	19,1	22,9
10	0,5	27,2	16,3
10	0,1	22,3	5,0
10	0	14,8	2,5
5	10	27,6	51,4
1	10	12,7	45,2
0,5	10	8,9	38,3
0,1	10	6,5	35,1
1	10	6,9	29,6

Em outro experimento, um total de 10 amostras de copolímero P(3HB-co-5HV) que possuíam uma vasta gama de composições 5HV foram gerada e então extraído para análise calorimetria diferencial de varredura (DSC). A tabela 5 mostra que a temperatura de transição de vidro (T_g) diminuiu à medida que a composição percentual de 5HV aumentou no copolímero P(3HB-co-5HV). Isto demonstra que uma vasta gama de propriedades de material pode ser obtida ao modular a composição de comonômero 5HV.

Tabela 5. Propriedades de material de polímeros extraídos

Cepa/Origem	Método	% 5HV	T_g (°C)
-------------	--------	-------	------------

MBX648 [pMS93]	Frasco de agitação	100	-58
MBX2641 [PJB84]	Frasco de agitação	82	-49
MBX2641 [pFS30]	Frasco de agitação	52	-34
MBX2641 [pFS30]	Frasco de agitação	49	-29
MBX2641 [pFS30]	Frasco de agitação	47	-27
MBX2114 [pFS30]	Frasco de agitação	39	-30
MBX2641 [pFS30]	Frasco de agitação	39	-24
MBX2641 [pFS30]	Frasco de agitação	23	-16
MBX2641 [pFS30]	Frasco de agitação	16	-9
MBX2641 [pFS30]	Frasco de agitação	5	0

EXEMPLO 4: Síntese de 3-hidróxi-propionato a partir de NaSHV através do sistema de degradação de ácido graxo

Para determinar se o sistema de degradação de ácido graxo (FAD) de *E. coli* poderia quebrar 5HV em acetil-CoA e 3-hidróxi-propionil-CoA (3HP-CoA), plasmídeo pMS93 (ao expressar *phaC-orfZ* a partir de um promotor P_{trc} ; ver Exemplo 1) foi transformado em cepas *E. coli* K12 que foram *fadR*⁺, *atoC*⁺ (FAD reprimido) ou *fadR*⁻, *atoC*_{const} (FAD desreprimido) MG1655 e LS5218 (Spratt et al, J Bacterial 146(3): 1166 a 1169 (1981)) foram utilizadas como as cepas *fadR*⁺, *atoC*⁺ e *fadR*⁻, *atoC*_{const}, respectivamente. MG1655 [pMS93] e LS5218 [pMS93] foram testadas ao alimentar NaSHV em frascos de agitação como descrito no Exemplo 1. Análises de Espectroscopia de Massa (MS) de GC-FID e GC demonstraram que LS5218 [pMS93] produziu P(5HV-co-3HP), enquanto que MG1655 [pMS93] não o fez (Tabela 6). Isto mostra que degradação ativa de ácido graxo produzirá 3HP a partir de 5HV.

Tabela 6. Incorporação de 3HP em P(5HV-co-3HP)

Cepa [Plasmídeo]	Genótipo Relevante	PHA Total (%dcw)	Incorporação de 5HV (%PHA)	Incorporação de 3HP (%PHA)
MG1655 [pMS93]	<i>fadR</i> ⁺ , <i>atoC</i> ⁺	63,1	100	0
LS5218 [pMS93]	<i>fadR</i> ⁻ , <i>atoC</i> _{const}	6,4	52	48

EXEMPLO 5: Biossíntese de P(SHV) homopolímero a partir de L-lisina

A trajetória idealizada para converter L-lisina em P(SHV) é esquematicamente diagramada na Figura 2B e requer seis genes heterólogos para serem clonados e expressos em *E. coli*: *P. putida davB*, *P. putida davA*, *P. putida davT*, *A. thaliana gsaR_{At}*, *C. kluyveri orfZ* e *R. eutropha phaC* (ver Tabela 1 A). Uma estratégia de clonagem foi projetada de tal modo que os genes *davBAT* seriam clonados em pACYC184 (Chang e Cohen, J. Bacterid. 134: 1141 a 1156 (1978)) e *gsaR_{At}*, *orfZ* e *phaC* seriam clonados em pSE380. Estes plasmídeos são

designados a receber pJB91 e pMZ28, respectivamente, e seus agrupamentos são descritos na próxima seção.

Construção de plasmídeo

Os locais múltiplos de clonagem de plasmídeo pSE380 foi amplificado por PCR com iniciadores JB134 (5'-TGAGCGGATAACAATTTTCAC) (SEQ ID NO:19) e JB135 (5'-AATAACACGTCAACGCAAAAAGGCCATCCGT) (SEQ ID NO:20). O produto de PCR resultante foi cozido com BmgBI e clonado em plasmídeo pACYC184 que foi cozido com EcoRV e NruI para criar pJB78.

O plasmídeo pJB91 foi construído em um processo de três etapas. Primeiro, os genes *davBA* de *P. putida* foram amplificados por PCR a partir de uma preparação genômica de DNA ao utilizar iniciadores JB136 e JB137, que foram modificados para incorporar locais de restrição NdeI e BsrGI, respectivamente, nas extremidades 5' e 3' do produto de PCR *davBA*. A sequência para iniciador JB136 é (5')-

TTTTTCATATGAGGAGGTTTTTATGAACAAGAAGAACCGCCA (SEQ ID NO:21) e a sequência para iniciador JB137 é (5')-

TTTTTTGTACATCAGCCTTTACGCGAGGTGCA (SEQ ID NO:22). O produto de PCR resultante foi cozido com NdeI e BsrGI e ligado a pJB78 que foi tratado com as mesmas enzimas, para fornecer plasmídeo pJB79. Em seguida, o gene *davT*

de *P. putida* foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico ao utilizar iniciadores JB138 e JB139, que foram modificados para incorporar locais de restrição SpeI e ApaLI, respectivamente, nas extremidades 5' e 3' do produto de PCR *davT*. A sequência para iniciador JB138 é (5')-

TATATACTAGTAGGAGGATAATATGAGCAAAACCAACGAATC (SEQ ID NO:23)

e a sequência para iniciador JB139 é (5')-

TTTTTGTGCACTCAGGCGATTTCAGCGAAGC (SEQ ID NO:24). O produto de PCR resultante foi cozido com SpeI e ApaLI e ligado a pJB79 que foi cozido com as mesmas enzimas, logo produzindo plasmídeo pJB80. E por final, o promotor *ompA*

foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico de *E. coli* K12 ao utilizar iniciadores JB141 e JB142, que foram modificados para incorporar locais de restrição BmgBI e AseI, respectivamente, nas extremidades 5' e 3'. O produto de PCR resultante foi cozido com BmgBI e AseI e ligado a pJB80 que foi cozido com SnaBI e NdeI para formar plasmídeo pJB82. O plasmídeo pJB91 foi construído ao cozinhar um produto de PCR *davBA* produzido com iniciadores JB 136 e JB 137

(como descrito acima) com DraIII e ao ligar o fragmento 507 bp a pJB82 que foi cozido com a mesma enzima, logo produzindo plasmídeo pJB91. Esta construção

foi realizada para corrigir a mutação sem sentido que foi descoberta no CDS de *davB* de pJB82. O plasmídeo pJB80 contém o operon *davBAT* sob o promotor constitutivo P_{tet} , enquanto o plasmídeo pJB91 contém o mesmo operon sob o forte promotor P_{ompA} .

- 5 O plasmídeo pMZ28 foi construído ao cozinhar plasmídeo pJ31:7950, que é um construto produzido por DNA 2.0 (Menlo Park, CA) e continha *gsaR_{At}* que é otimizado em códon para expressão em *E. coli* K12, com BsrGI. O fragmento resultante que contém *gsaR_{At}* foi ligado a pFS30 que também foi cortado com BsrGI. Após verificar que a orientação de *gsaR_{At}* foi na mesma direção que *phaC-orfZ* por digestão de enzima de restrição, o plasmídeo resultante foi designado como pMZ28.

Resultados experimentais

- MG1655 [pMZ28] que expressa uma L-lisina incompleta para trajetória de P(5HV) e MG1655 [pMZ285 pJB91] que expressa toda a L-lisina para trajetória de P(5HV) foram inoculadas em um tubo de ensaio que contém 3 mL LB suplementada com antibiótico apropriado (25 µg/mL cloranfenicol para pJB91; 100 µg/mL ampicilina para pMZ28) e cultivada de um dia para o outro a 37°C com agitação de 250 rpm. No dia seguinte, 0,5 mL de cada cultura de um dia para o outro foi utilizada para inocular um frasco de agitação que contém 50 mL de LB fresco suplementado com o(s) antibiótico(s) apropriado(s) e cultivado a 37°C com agitação de 250 rpm. Em 3,5 horas, 0,1 mM IPTG foi adicionado às culturas líquidas e em 5 horas, as culturas foram giradas a 4150 rpm (centrífuga de bancada Sorvall Legend RT) e ressuspensas em 50 mL de meop de produção que consistiu de 1x E2 em solução de sais mínimos que contém 10 g/L glicose, 2.5 g/L LB, 10 g/L L-lisina, 2mM MgSO₄, 1x Solução de Sais de Traço e 0,1 mM IPTG. As receitas para sais E2 e Solução de Sais de Traço são fornecidas no Exemplo 1.

- As condições de cultura em frasco de agitação e o protocolo de análise para teor de PHA são como descritos no Exemplo 1. A tabela 7 mostra que oito vezes mais P(SHV) foi produzido após introdução do operon *davBAT*.

Tabela 7. Produção de P(SHV) a partir de L-lisina

Cepa [Plasmídeo]	Genótipo relevante	PHA Total (%dcw)
MG1655 [pMZ28]	pMZ28: P_{Trc} - <i>gsaR_{At}</i> - P_{Re} - <i>phaC-orfZ</i>	0,01
MG1655 [pMZ28], [pJB91]	pMZ28: P_{Trc} - <i>gsaR_{At}</i> - P_{Re} - <i>phaC-orfZ</i> pJB91: P_{ompA} , <i>davBAT</i>	0,08

EXEMPLO 6: Biossíntese de copolímero P(3HB-co-5HV) a partir de L-lisina

A trajetória idealizada para converter L- lisina em P(SHV) também foi introduzida na cepa MBX2641 que expressa *bktB* e *phaB* a fim de produzir copolímero P(3HB-co-5HV) a partir de L-lisina e eventualmente glicose.

Construção de plasmídeo

5 Os genes que compreendem a trajetória neste exemplo incluem: *P. putida davB*, *P. putida davA*, *P. putida davT*, *C. kluyveri orfZ*, *R. eutropha phaC* e *A. thaliana gsaR_{At}* ou *A. terreus gsaR_{At2}* (ver Tabela 1A).

O plasmídeo pJB90, que contém uma trajetória alternativa que consiste dos genes *gsaR_{At2}*, *phaC* e *orfZ*, foi produzido da seguinte maneira. O gene *A. terreus gsaR_{At2}*, otimizado em códon para expressão em *E. coli* K12, foi amplificado por
10 PCR a partir de pSG40 (um construto produzido por DNA 2.0 (Menlo Park, CA)) ao utilizar iniciadores JB145 e JB146. Ambos os iniciadores continham locais BglIII nas extremidades 5'. A sequência para iniciador JB145 é (5')-TTTTTAGATCTAGGAGGTTTTATGCTGCGTGCTGCTTCTCG (SEQ ID NO:25)
15 e a sequência de iniciador JB146 é (5')-TTTTTAGATCTTTAGCGGAAATAGTTTGGAC (SEQ ID NO:26). O fragmento de PCR resultante foi cozido com BglIII e ligado no local correspondente de pJB84 para produzir pJB90.

Resultados Experimentais

20 As cepas MBX2641 [pJB78, pJB84], MBX2641 [pJB91, pMZ28] e MBX2641 [pJB91, pJB90] foram cultivadas em frascos de agitação e analisadas para teor e composição de PHA como descrito no Exemplo 1 e 2, para caracterizar a produção de P(3HB-co-5HV) a partir de L-lisina e glicose. MBX2641 [pJB78, pJB84], MBX2641 [pJB91, pMZ28] e MBX2641 [pJB91, pJB90] foram inoculadas
25 em tubos de ensaio que contêm 3 mL LB suplementado com 25 µg/mL cloranfenicol e 100 µg/mL ampicilina e cultivadas de um dia para o outro a 37°C com agitação de 250 rpm. No dia seguinte, 0,5 mL de cada cultura de um dia para o outro foi utilizada para inocular um frasco de agitação que contém 50 mL de LB fresco suplementado com o mesmo antibiótico e cultivado a 37°C com agitação
30 de 250 rpm. Em 3,5 horas, 0,1 mM IPTG foi adicionado às culturas líquidas e em 5 horas, as culturas foram giradas a 4150 rpm (centrífuga de bancada Sorvall Legend RT) e ressuspensas em 50 mL de meio de produção que consistiu de 1x E2 de solução de sais de traço que contém 10 g/L glicose, 2,5 g/L LB, 10 g/L L-lisina, 2mM MgSO₄, 1x Solução de Sais de Traço e 0,1 mM IPTG. As receitas
35 para sais de E2 e Solução de Sais de Traço são fornecidas no Exemplo 1.

Como mostrado na tabela 8, a cepa MBX2641 [pJB785 pJB84], que não possui os genes que convertem L-lisina em 5HV, foi incapaz de produzir 5HV a partir de L-lisina e produziu apenas homopolímero de P(3HB). As cepas MBX2641 [pJB91, pMZ28] e MBX2641 [pJB91, pJB90], ambas as quais continham toda a trajetória a partir de L-lisina até 5HV-CoA, 5HV to incorporada em 2,5% em peso e 5% em peso, respectivamente, do copolímero total. Isto demonstra que os genes *davBAT* e *gsaR* precisam ser expressos a fim de produzir 5HV- que contém copolímeros a partir de L-lisina.

Tabela 8. Produção de P(3HB-co-5HV) a partir de L-lisina

Cepa [Plasmídeo]	Genótipo de Plasmídeo Relevante		PHA total (%dcw)	Incorporação de 3HB (%PHA)	Incorporação de 5HV (%PHA)
	<i>P_{ompA}-davBAT</i>	<i>P_{Trc}-phaC-gsaR_x-orfZ</i>			
MBX2641[pJB78, pM84]	nenhum		38±9	100	0
MBX2641 [pJB91, pMZ28]	Presente		33±11	97,5±1,5	2,5±1,5
MBX2641 [pJB91, pJB90]	Presente		41±11	95,0±2,3	5,0±2,3

10 EXEMPLO 7: Biossíntese aprimorada de polímero PHA que contém 5HV a partir da L-lisina

Devido ao fato de que o 5HV foi incorporado a um nível inesperadamente baixo, a existência de uma trajetória concorrente foi considerada. Para ver se o glutarato poderia ser produzido a partir da L-lisina, MG1655 [pJB91] expressando os genes *davBAT* do plasmídeo foi produzido em meio LB que contém 25 mg/l de cloranfenicol a 30°C com agitação durante 6h. As alíquotas das culturas na fase logarítmica média de 25 µl foram inoculadas formando um meio mínimo de 475 µl E0 e incubadas a 30°C com agitação a 250 rpm durante 48 horas. O meio mínimo E0 consistia de 10 g/l da glicose, 4 g/l da lisina, 58 mM K²HPO⁴, 27 mM MgSO₄, 25 µl de cloranfenicol, 0,1 mM IPTG e elementos traço. Mediu-se o glutarato, presente no sobrenadante, por CG-EM como delineado abaixo: obtiveram-se os supernadantes do caldo de fermentação por centrifugação e 1 µl da amostra foi pipetado em tubos Eppendorf a fresco contendo 1 µl de 1 g/l de 4-aminobutirato (GABA) como padrão interno. As amostras foram secas em um Labconco centrivap e ressuspensas em 100 µl de acetonitrila (ACN): solução de 1:1 N-(t-butildimetilsilila)-N- metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) por sonicação durante 3 h.

As amostras foram então derivatizadas a 65°C durante 30 min, centrifugadas para a remoção de material insolúvel e supernadantes injetados em CG-EM Agilent 5975 equipado com coluna HP-5ms, usando os parâmetros de aquisição seguintes: gás de arraste hélio com taxa de fluxo de 2 ml/min, modo de varredura m/z 65 a 700, atraso de solvente para 3,5 min, programa de forno: 150°C durante 2 min, depois sobe-se para 280°C a 3°C/min, temperatura da fonte íons a 230°C, a temperatura do filtro de massa quadrupolar é de 150°C.

Curiosamente, produziu-se 0,6 g/l de glutarato a partir da L-lisina quando o óperon *davBat* T foi superexpresso em MG 1655. O óperon *davBAT* T expressa genes que codificam enzimas que convertem a L-lisina em GSA. Pode-se produzir glutarato por meio de um gene endógeno *E. coli* cuja enzima codificada pode oxidar GSA a glutarato.

O exame de prováveis reações enzimáticas de GSA para glutarato levou à identificação de dois possíveis genes endógenos *E. coli* GSA desidrogenase, *gabD* e/ou *ynel* (ver Tabela 1A). Estes dois genes foram identificados anteriormente para oxidar o semialdeído succínico a ácido succínico (Dennis e Valentim, Patente Nº U.S. 6.117.658), mas não mostrou oxidar GSA a glutarato. Para testar se uma cepa *gabD*- e *ynel*-negativo ainda produz glutarato a partir da L-lisina, as seguintes cepas foram construídas.

O nulo único *gabD* e mutante *ynel* foram construídos pelo método Red/ET Recombineering descrito por Datsenko e Wanner (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97:6640-6645 (2000)). O processo de exclusão de *gabD* do cromossomo de MG 165 envolveu a substituição de *gabD* com um marcador do Kanamicina flanqueado com FRT através de recombinação homóloga mediada por PCR. O marcador do Kanamicina flanqueado com FRT foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pKD4 (Datsenko e Warmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97:6640-6645 (2000)) pelo uso de iniciadores RF314 5'-GCAAGCCAGAGTAACCCCGGACGCACGCTGCGAGCGGCACGTAGTGTGGAT GCCTTACACGCCGCATTTAATCAATAACCTTGAGCGATTGTGTAGGCTGGAG CTGCTTC (SEQ ID NO:27) e RF315 5'-GAATTTGCCCAACGCCACGGGGAATCGCCTGACTGCGGCGCTGCATTAATCT TTTATTGCTGTTTCATTTCGCATTCTCCAGATGGGAATTAGCCATGGTCCATATG AATAT (SEQ ID NO:28).

O gene *ynel* foi deletado do cromossomo de MG1655 por substituição com um marcador do Kanamicina (*kan*) flanqueado com FRT. Este marcador foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pKD4 usando primers MS220 5'-

GCAAGAGTAAATCTGCGTATCTTCATACCATGACTCATAAAGGAG
 ATACCCCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID NO:29) e MS217 5'-
 ACCGCAGGTCTGAAAAGACCTGCGAGTATATCAGAGCTGAATATG

TCGCGCATATGAATATCCTCCTTAGT (SEQ ID NO:30) que introduziram 50bp
 5 de homologia para o gene ser eliminado. A substituição de *ynel* com este
 fragmento de DNA não funcionou e, portanto, outro fragmento PCR que foi criado
 aumentou as regiões de homologia para substituição do gene. Para conseguir
 isso, uma volta adicional de PCR foi realizada com o fragmento de PCR gerado
 acima como modelo e iniciadores MS223 5'-
 10 TCGATTCTGTAATAAGTGGCTTAATATTATTCATTTTAAAGCAAGAGTAAATCT
 GCGTATC (SEQ ID NO:31) e MS224 5'-
 GCCACTTTCTACTCCTGGACCGCAGGTCTGAAAAGACCTGCGAGTATATCAG
 AGCTG (SEQ ID NO:32). Uma substituição bem sucedida de *ynel* com FRT-*kan*-
 FRT foi alcançada. O marcador *kan* foi então removido como descrito em
 15 Datsenko e Wanner (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97:6640-6645 (2000)).

O MG1655 $\Delta gabD::FRT$ -*kan*-FRT, $\Delta ynel::FRT$ foi construído por P1-
 mediated transduction from MG1655 $\Delta gabD::FKT$ -*kan*-FRT to MG1655 $\delta yroE::FRT$
 e o marcador *kan* restante foi usado mais adiante usando o mesmo método
 descrito acima. A cepa resultante MG1655 $\Delta gabD::FRT$, $\Delta ynel::FRT$ foi
 20 transformada com pJB91 e analisada para produção de glutarato a partir de L-
 lisina em um experimento semelhante ao descrito acima com MG1655 [pJB91]
 expressando os genes *davBAT* do plasmídeo.

Em contraste a MG1655 [pLB91] que produziu 0,6 g/l de glutarato a partir
 de L-lisina, a cepa MG1655 $\Delta gabD::FRT$, $\Delta ynel::FRT$ [pJB91] não produziu
 25 nenhum glutarato a partir de L-lisina, o que demonstra que os endógenos *E. coli*,
gabD e/ou *ynel* foram responsáveis por converter GSA a glutarato.

Produção aprimorada de copolímeros P(3HB-co-5HV) a partir de L-lisina

O fluxo aprimorado de 5HV a partir de L-lisina foi realizada ao excluir a
 30 GSA desidrogenase endógena que codificam genes *gabD* e *ynel* em uma cepa
 que produziu o copolímero 3HB-co-5HV.

O MBX2885 foi construído pela transformação de plasmídeos pJB91 e
 pJB90 em cepa MBX2641. Esta cepa tem todos os genes a fim de produzir
 P(3HB-co-5HV) a partir da glicose e L-lisina.

35 MG1655 $\Delta gabD::FRT$, $\Delta ynel::FRT$ foi P1-transduzido com a cepa doadora
 MBX2114 que conferiu PHB produzindo capacidades como descrito no Exemplo

2. Esta cepa foi posteriormente transformada com pJB90 e pJB91, que expressou L-lisina para P(5HV) trajetória genes conforme descrito nos Exemplos 6 e 5, respectivamente. A cepa resultante foi designada como MBX3378 e tem todos os genes a fim de produzir P(3HB-co-5HV) a partir da glicose e L-lisina, mas ao contrário MBX2855 tem os dois genes, *gabD* e *ynel* removidos do genoma.

Uma fermentação com placa de agitação foi conduzida usando cepa MBX2855 e sua contraparte MBX3378 deficiente de GSA desidrogenase. As células foram incubadas e analisadas sob as mesmas condições, como descrito acima (com agitação de 300 rpm a 30°C). O meio mínimo E0 consistiu de 10 g/l da glicose, 2 g/l de L-lisina, 58 mM K₂HPO₄, 2 mM MgSO₄, 25 µg/ml de cloranfenicol, 5 µg/ml de gentamicina, 0,1 mM IPTG e 5 elementos traço como descrito em um exemplo anterior. O fluxo de carbono a partir da L-lisina para 5HV foi dramaticamente aprimorado na cepa MBX3378 deficiente de GSA desidrogenase quando comparada com MBX2855 que continha a atividade desidrogenase GSA de tipo selvagem como mostra a **Tabela 9**. A fim de melhorar significativamente a produção de 5HV que contém PHA, genes de GSA desidrogenase como *gabD* e *ynel* precisam ser removidos do genoma de hospedeiros de produção.

Tabela 9. Produção aprimorada de P(3HB-co-5HV) a partir da L-lisina

Cepa (Plasmídeo)	Genes Relevantes Expressos	Genes Relevantes Suprimidos	PHA Total (%dcw)	Incorpora-ção de 3HB (%PHA)	Incorpora-ção de 5HV (%PHA)
MBX2855	<i>P_{ompa}-davBAT, P_{tre}-phaC-gsaR_{At2}-orfZ</i>	none	17,3	98,6	1,4
MBX3378	<i>P_{ompa}-davBAT, P_{tre}-phaC-gsaR_{At2}-orfZ</i>	<i>gabD</i> ”, <i>ynel</i>	24,7	64,9	35,1

EXEMPLO 8: Biossíntese da L-lisina a partir da glicose

A regulação da reação alostérica ocorre na trajetória L-lisina através dos genes *lysC* e *dapA*. Portanto, esse controle deve ser eliminado a fim de permitir o aumento da produção de L-lisina a partir da glicose. O procedimento para fazer isso é bem estabelecido e foi descrito para os dois genes (Kojima et al., U.S. Patent No. 6,040,160). *E. coli* mutants possessing deregulated *lysC* e *dapA* pode ser obtido primeiro ao excluir *metL* e *thrA* a partir de *E. coli* *LysC*, *MetL* e *ThrA* são isoenzimas e todas catalisam a mesma reação aspartato quinase, então será necessário eliminar as duas últimas antes de mutações em *lysC* podem ser selecionadas positivamente. Uma vez que uma cepa $\Delta metL \Delta thrA$ foi feita, ela

pode ser mutada com N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG). O conjunto mutante resulante poderia se desenvolver em um meio mínimo que contém s-2-aminoetilcisteína (AEC), um análogo não metabolizado de L-lisina, a fim de exercer pressão sobre *lysC* e *dapA*. Já que *metL* e *dapA* estão faltando, apenas mutações que dessensibilizam *lysC* e *dapA* para L-lisina (ou seu análogo AEC) permitirão que as células sintetizem a L-lisina, tronina e metionina e, assim, sobrevivam. Manipulações adicionais depodem ser realizadas por superexpressão de *lysC* desregulado, *dapA* desregulado e outras trajetórias de genes de um promotor recombinante, a fim de aumentar a capacidade de fluxo e eliminar a regulação da transcrição.

EXEMPLO 9: Biossíntese de homopolímero P(SHV) a partir da glicose

P(SHV) foi produzido a partir da glicose como a única fonte de carbono em um a cepa *E. coli* capaz de sintetizar os monômeros 5HV-CoA a partir da glicose e incorporá-los a PHA. Para isso, uma cepa foi construída para expressar não apenas os genes requeridos a fim de produzir homopolímero P(5HV) a partir de L-lisina, mas que também para expressar um gene *dapA* mutado chamado *dapA^{fbr}* que codifica a L- diidro-di-picolinato sintetase insensível à reação da lisina. A primeira parte deste exemplo descreverá a construção de plasmídeos requeridos para demonstrar esta habilidade.

Construção de plasmídeos

Em *E. coli*, a regulação alostérica ocorre na trajetória de L-lisina por meio da aspartato quinase e III dihidrodipicolinato sintetase codificadas pelos genes *lysC* e *dapA*, respectivamente (Figura 6). A fim de aumentar a produção de L-lisina e eventualmente polímero P(SHV) a partir da glicose, a regulação alostérica precisa ser reduzida ou inteiramente eliminada. O procedimento para fazer isso é bem estabelecido e foi descrito para ambos os genes (Kojima et al, U.S. Patent No. 6,040,160). Um gene *dapA^{fbr}* resistente a reação de L-lisina foi construído e teve o 352º resíduo de nucleotídeo trocado de citosina para timina (*dapA^{C352T}*). Ele foi obtido pela amplificação PCR do gene *dapA* *E. coli* cromossômico gerando dois fragmentos de DNA usando iniciadores que introduziram a mudança de base desejada, seguida de emenda por sobreposição de extensão PCR (SOE-PCR) para fundir os dois fragmentos de DNA. O método SOE-PCR foi descrito anteriormente (Ho et al., Gene 77(1):51-9 (1989). Detalhadamente, um fragmento de DNA continha do 1º ao 366º pares de nucleotídeos de gene *dapA* que foi amplificado com iniciadores DE081 (5'-AAAAGAATTCTTAATTAATTCTAGAAGGAGGTTTCATATGTTTAC

GGGAAGTATT GTC) (SEQ ID NO:33) e DE082 (5'-AGCGATGGCTTTGAAATACTGATACAAACCTTC) (SEQ ID NO:34) e o outro fragmento de DNA continha do 337º ao 879º pares de nucleotídeos *dapA* amplificados com iniciadores DE083 (5'

5 GAAGGTTTGTATCAGTATTTCAAAGCCATCGCT) (SEQ ID NO:35) e DE084 (5'-CCCGAGCTCGTTTAACTTAATTAAGACTAGTTTTACAGCAAACC

GGCATGCTT) (SEQ ID NO:36). Os iniciadores DE082 e DE083 complementarmente reversos e foram concebidos para introduzir a citosina para mudança de base de timina ao resíduo de nucleotídeo 352º. Os dois fragmentos

10 de DNA a partir do primeiro ciclo de PCRs foram fundidos por SOE-PCR usando iniciadores DE081 e DE084. O produto de PCR resultante foi digerido com XbaI e SacI e ligado a pDE031 que foi digerido com SpeI e SacI, dessa forma, criando o plasmídeo pDE035. O plasmídeo pDE031, que contém um promotor constitutivo sintético (P_{synI}) foi construído pela digestão de um fragmento de DNA de filamento

15 duplo 63 bp sintetizado (5'-TTTTTCTAGATTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCACTAGTGT TTAACCCCC) (SEQ ID NO:37) com XbaI e PmeI e ligado nos mesmos sítios de

enzima de restrição de um plasmídeo pBluescript II SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA, EUA) que foi previamente modificado para conter esses sítios. O construto de

20 gene P_{synI} -*dapA*^{C352T} em pDE035 foi digerido com XhoI e PmeI, que foi seguido por ligação com o plasmídeo pJB90 (descrito no Exemplo 6) que foi digerido com BsrGI, clivado abruptamente com nuclease mung bean e digerido uma segunda vez com XhoI para gerar o plasmídeo pJG22 que expressou o operon *phaC-gsaR_{At}-orfZ* a partir do promotor P_{trc} e o gene *dapA*^{C352T} a partir do promotor P_{synI} .

25 **Resultados experimentais**

O plasmídeo pJG22 foi transformado junto com os plasmídeos pJB91 (descritos no Exemplo 5) na cepa MBX3342 (MG1655 $\Delta gabD::FRT \Delta ynfE::FRT$) para formar a cepa MBX3342 [pJB91, pJG22]. Os plasmídeos pSE380 e pACYC184, os vetores vazios utilizados para construir pJG22 e pJB91,

30 respectivamente, também foram transformados na cepa MBX3342 para criar a cepa de controle negativo MBX3342 [pSE380, pACYC184]. Essas cepas foram incubadas durante 48 h, com agitação em 300 rpm a 30°C em meio E2 2x e analisadas conforme descrito nos exemplos anteriores. O meio consistiu em glicose a 15 g/l, $NaNH_4HPO_4$ a 52 mM, K_2HPO_4 a 66 mM, KH_2PO_4 a 54 mM,

35 $MgSO_4$ a 2 mM, IPTG a 0,1 mM e elementos de traço conforme descrito acima. Para o meio de cultura para MBX3342 [pJB91, pJG22], 25 µg/ml de cloranfenicol

e 5 µg/ml de gentamicina foram suplementados, enquanto que 25 µg/ml cloranfenicol e 100 µg/ml de ampicilina foram adicionados para MBX3342 [pSE380, pACYC184]. Os dados na Tabela 10 mostram que MBX3342 [pJB9, pJG22] produziu 2,60% de peso seco de célula (DCW) do homopolímero P(5HV), enquanto a cepa MBX3342 [pSE380, pACYC184] não produziu nenhum PHA. Esses resultados demonstram que uma cepa que expressa o gene *dapA* resistente à reação em adição à L-lisina para genes de trajetória P(5HV) pode produzir P(5HV) a partir de glicose como a única fonte de carbono.

Tabela 10. Produção de P(SHV) a partir de glicose

CEPA [Plasmídeo]	Genótipo de Plasmídeo Relevante	PHA Total (% peso seco de célula)
MBX3342 [pSE380, pACYC184]	pSE380: controle de vetor vazio pACYC184: controle de vetor vazio	0,0
MBX3342 [pJG22,pJB91]	pJG22: P_{TRC} - <i>phaC</i> - <i>gsaR</i> _{At} - <i>orfZ</i> P_{synl} - <i>dapA</i> ^{C352T} PJB91: P_{ompA} - <i>davBAT</i>	2,60

EXEMPLO 10: Biossíntese de copolímero P(3HB-co-5HV) a partir da glicose

O experimento seguinte foi para demonstrar a produção de copolímero P(3HB-co-5HV) a partir da glicose em uma cepa de *E. coli* capaz de sintetizar os monômeros 3HB-CoA e 5HV-CoA e os incorpora em PHA.

Resultados experimentais

Os genes *btkB-phaB-kan* da cepa MBX2114 foram transduzidos por PI em MBX3342 gerando a cepa MBX3344. A MBX3344 foi transformada com plasmídeos pJB91 e pJG22 para criar a cepa MBX3344 [pJB91, pJG22]. Os plasmídeos pSE380 e pACYC1845, os vetores vazios utilizados para construir pJG22 e pJB91, respectivamente, também foram transformados em MBX3344 para criar uma cepa de controle negativo, MBX3344 [pSE380, pACYC184]. Essas cepas foram incubadas por 48 h, com agitação em 300 rpm a 30°C em meio E2 2x e analisadas conforme descrito nos exemplos anteriores. O meio consistiu em glicose a 15 g/l, $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$ a 52 mM, K_2HPO_4 a 66 mM, KH_2PO_4 a 54 mM, MgSO_4 a 2 mM, IPTG a 0,1 mM e elementos de traço conforme descrito acima. Para o meio de cultura para MBX3344 [pJB91, pJG22], 25 µg/ml de cloranfenicol e 5 µg/ml de gentamicina foram suplementados, enquanto 25 µg/ml de cloranfenicol e 100 µg/ml de ampicilina foram adicionados para MBX3344 [pSE380, pACYC184]. O caldo de cultura foi suplementado com 10 g/l de glicose

após 24 horas de incubação. A Tabela 11 mostra que 5HV poderia ser incorporado na cepa que contém todos os genes de trajetória metabólica P(3HB-co-5HV) a partir da glicose como a única fonte de carbono.

Tabela 11. Produção de P(3HB-co-5HV) a partir de glicose

5

CEPA [Plasmídeo]	Genótipo de Plasmídeo Relevante	PHA Total (% peso seco de célula)	Incorporação de 3HB (% peso seco de célula)	Incorporação de 5HV (% peso seco de célula)
MBX3344 [pSE380, pACYC184]	pSE380: controle de vetor vazio pACYC184: controle de vetor vazio	0	100	0
MBX3344 [pJG22,pJB91]	pJG22: P_{TRC^-} <i>phaC-gsaR_{Ar}-</i> <i>orfZ</i> P_{synr^-} <i>dapA_{C352T}</i> PJB91: P_{ompA^-} davBAT	42	92	8,0

A seguir, a cepa MBX3824 (W3110 $\Delta gabD::FRT \Delta ynf::FRT \Delta cadA::FRT \Delta ldcC::FRT \Delta argO::FRT bktB-phaB-kan$) foi testada como a cepa hospedeira a fim de produzir copolímero P(3HB-co-5HV) a partir de glicose. Nessa cepa, as trajetórias concorrentes que podem desviar a L-lisina para longe do co-monômero 5HV-CoA foram removidas do genoma de *E. coli*.

10

A primeira trajetória concorrente pode converter L-lisina em cadaverina e consiste em duas enzimas de L-lisina descarboxilase (número EC 4.1.1.18) codificadas por *cadA* (Meng e Bennett, *J. Bacteriol.* 174(8):2659 a 2669 (1992); número de acesso EcoCyc: EG10131) e *ldcC* (ver Tabela 1A; Yamamoto et al., *Genes Genet. Syst.* 72(3):167 a 72 (1997); número de acesso EcoCyc: G6094).

15

Uma segunda trajetória concorrente pode exportar L-lisina para fora da célula microbiana. Em *Corynebacterium glutamicum*, a L-lisina exporta a proteína que foi identificada como LysE (ver Tabela 1A; Vrljic et al., *Mol. Microbiol.* 22 (5): 815 a 826 (1996)). Com a finalidade de identificar genes exportadores de L-lisina putativa em *E. coli*, inúmeras pesquisas de literatura e patente, bem como pesquisas de BLAST e Psi-BLAST usando LysE de *C. glutamicum* como um ponto de questionamento foram conduzidas. Seis proteínas foram descobertas por serem alvos para a remoção do genoma de *E. coli* a fim de evitar a exportação de L-lisina para fora da célula. Essas incluem: (1) ArgO (conhecido, ainda, como YggA, Nandineni e Gowrishankar, *J. Bacteriol.* 186:3539 a 3546 (2004)), (2) YfiK (conhecido, ainda, como EamB; Franke et al., *J. Bacteriol.*

20

25

185:1161 a 1166 (2003)), (3) RlitB (denominada formalmente como YigK; Zakataeva et al., *FEBS Lett.* 452(3):228 a 32 (1999)), (4) YahN (Kutukova et al., *Mol. Biol (Mosk.)* 39(3):374 a 378 (2005)), (5) RhtC (denominada formalmente como YigJ; Zakataeva et al., *FEBS Lett.* 452(3):228 a 32 (1999)) e (6) YeaS (conhecido, ainda, como LeuE; Kutukova et al., *FEBS Lett.* 579(21):4629 a 34 (2005)). A ArgO demonstrou ser a candidata mais provável para exportar a L-lisina para fora das células de *E. coli* com base em seu valor de e inferior de 2e-22 em pesquisas de BLASTP usando LysE de *C. glutamicum* como o ponto de questionamento, a que se agrupou mais proximamente com LysE em uma Árvore de Agrupamento de Vizinhos após Clustal X (Thompson et al, *Nucleic Acids Res.* 25: 4876 a 4882 (1997)) com LysE de *C glutamicum* e os seis homólogos de *E. coli* e relatou uma resistência aumentada de 3 vezes para a L-lisina, bem como um acúmulo de L-lisina 38% superior quando *argO* foi superexpressa comparada com as cepas de controle apenas de vetor (Livshits et al., patente U.S. nº6.979.560). Entretanto, as outras proteínas identificadas podem também exportar L-lisina e, portanto também são alvos para a deleção do gene.

Outra trajetória concorrente pode converter L-lisina em (R)- β -lisina que é catalisada por 2,3-aminomutase lisina (número de EC 5.4.3.-) codificada por *yjeK* de *E. coli* (número de acesso EcoCyc: G7836; Behshad et al, *Biochemistry* 45(42): 12639 a 46 (2006)).

Os mutantes *cadA* e *ldcC* nulos únicos foram construídos pelo método de Recombinação Red/ET a partir de pontes de gene conforme descrito previamente usando os seguintes iniciadores: DE118 (5'-TGTC CATGTGTTGGGAGGGGCCTTTTTTACCTGGAGATATGACTG
25 TGTAGGCTGGAGCTGCTTC) (SEQ ID NO:38) e DE119 (5'-GAGCAAAAAGGGAAGTGGCAAGCCACTTCCCTTGACGAGCTA
AATGGGAATTAGCCATGGTCC) (SEQ ID NO:39) para uma mutação $\Delta cadA::FRT-kan-FRT$ e DE122 (5'-GTTTGAGCAGGCTATGATTAAGGAAGGATTTTCCAGGAGGAACAC
30 GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC) (SEQ ID NO:40) e DE123 (5'-TATTTGTTAACAGCACGTTACTCGCCCGGAAGCCGCTCTGGCAAG
ATGGGAATTAGCCATGGTCC) (SEQ ID NO:41) para mutação $\Delta ldcC::FRT-cat-FRT$. Uma mutação de *argO* nula e única foi construída pelo método de Recombinação Red/ET usando iniciadores DE106 (5'-
35 GTGTTTTCTTATTACTTTCAAGGTCTTGCACTTGGGGCGGCTATGG
TG TAGGCTGGAGCTGCTTC) (SEQ ID NO:42) e DE107 (5'-

CTAACTGAACAAGGCTTGTGCATGAGCAATACCGTCTCTCGCCAG

ATGGGAATTAGCCATGGTCC) (SEQ ID NO:43). A W3110 $\Delta gabD::FRT$

$\Delta yneI::FRT$ $\Delta cadA::FRT$ $\Delta ldcC::FRT$ $\Delta argO::FRT$ foi construído por transduções

mediadas por PI iterativas de cassetes $\Delta gabD::FRT$ -*kan*-*FRT*, $\Delta yneI::FRT$ -*kan*-

5 *FRT*, $\Delta cadA::FRT$ -*kan*-*FRT*, $\Delta ldcC::FRT$ -*cat*-*FRT*, $\Delta cadA::FRT$ -*kan*-*FRT* na cepa

W3110 (Bachmann, Bacterial Rev., 36 (4):525 a 557 (1972)), que foi seguida pela

remoção de marcadores *kan* ou *cat* após cada transdução mediada por PI

conforme descrito nos exemplos anteriores. A cepa resultante MBX3818 foi

transduzida por PI com a cepa doadora MBX2114 para finalizar a construção de

10 MBX3824. Os plasmídeos pJG22 e pJB91 foram transformados em MBX3824 e a

cepa resultante MBX3824 [pJG22, pJB91] foi testada para a produção de

copolímero P(3HB-co-5HV) junto com MBX3344 [pJG22, pJB91]. Essas cepas

foram incubadas por 48 h, com agitação em 300 rpm a 30°C em meio E2 a 1,5x e

analisadas conforme descrito nos exemplos anteriores. O meio consistiu em

15 glicose a 15 g/l, $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$ a 39 mM, K_2HPO_4 a 49,5 mM, KH_2PO_4 a 40,5 mM,

MgSO_4 a 2 mM, IPTG a 0,1 mM e elementos de traço conforme descrito acima. O

meio de cultura foi suplementado com 25 µg/ml de cloranfenicol e 5 µg/ml de

gentamicina. A Tabela 12 mostra que várias cepas com antecedentes genéticos

diferentes têm a capacidade de produzir P(3HB-co-5HV) a partir de glicose com

20 diferentes composições de 5HV no polímero. Em particular, a remoção de

trajetórias concorrentes que desviam o carbono para longe de 5HV-CoA, como a

remoção da proteína *argO* que exporta L- lisina ou os dois genes de

descarboxilase lisina *cadA* e *ldcC*, que aumentam a incorporação de 5HV em

PHA.

25 **Tabela 12.** Produção de P(3HB-co-5HV) a partir de glicose

CEPA [Plasmídeo]	Genótipo Relevante	PHA Total (% peso seco de célula)	Incorporação de 3HB (% peso seco de célula)	Incorporação de 5HV (% peso seco de célula)
MBX3344 [pJG22, pJB91]	MBX3344: MG1655 $\Delta gabD::FRT$ $\Delta yneI::FRT$ <i>bktB-phaB-kan</i> pJG22: P_{TRC} - <i>phaC</i> - <i>gsaT_{Ar}-orfZ</i> pJB91: P_{ompA} - <i>davBAT</i>	47	89	11
MBX3824 [pJG22,pJB91]	MBX3824: W3110 $\Delta gabD::FRT$ $\Delta yneI::FRT$ $\Delta cadA::FRT$ <i>bktB-phaB</i> - <i>kan</i> pJG22: P_{TRC} - <i>phaC</i> - <i>gsaT_{Ar}-orfZ</i> <i>PsynI-dapA^{C352T}</i> pJB91: P_{ompA} - <i>davBAT</i>	33	81	19

EXEMPLO 11: Biossíntese de copolímero P(4HB-co-5HV) a partir de 4-hidróxi-butirato de sódio e 5-hidróxi-valerato de sódio

O experimento a seguir foi para demonstrar a produção de copolímero P(4HB-co-5HV) em uma cepa *E. coli* capaz de sintetizar os monômeros 4HB-CoA e 5HV-CoA e incorporá-los em PHA. Os métodos para a projeção de comonômeros 4HB em organismos recombinantes são descritos em detalhes em patente U.S. nº 6.117.658, patente U.S nº 6.316.262, patente U.S nº 6.689.589, patente U.S. nº 7.081.357, patente U.S nº 7.229.804, patente U.S nº 6.759.219 e publicação de pedido de patente U.S. 2004/0253693, que são aqui incorporados por referência em sua totalidade. Em um experimento In similar àquele descrito no Exemplo 1, 5-hidróxi-valerato de sódio (Na5HV) foi fornecido como alimento para a cepa MG 1655 [pMS93] junto com 4-hidróxi-butirato de sódio (Na4HB). A cepa MG 1655 [pMS93] contém os genes *orfZ* e *phaC*, ambos são necessários para gerar 4HB-CoA e 5HV-CoA a partir de Na4HB e NaSHV, respectivamente, bem como para polimerizar os precursores para o copolímero P(4HB-co-5HV). O Na4HB para o uso como substrato foi preparado análogo ao método descrito para a preparação de NaSHV no Exemplo 1 com o uso de γ -butirolactona (GBL) no lugar de DVL. As condições de cultura usadas para a produção de copolímero foram também iguais àquelas descritas no Exemplo 1 com a diferença de que 4 g/l de Na4HB foram adicionados ao meio de produção. Após o período de produção de PHA, análise do conteúdo de polímero da cultura MG 1655 [pMS93] procedeu como descrito no Exemplo 1 exceto que uma curva padrão para determinar o conteúdo de 4HB foi feita usando as normas GBL além da curva padrão feita para determinar o conteúdo de 5HV. Esta análise mostrou que a cultura de MGI 655 [pMS93] co-alimentado Na4HB e NaSHV geraram o copolímero P(4HB-co-5HV) que compreendeu 67% de orvalho e teve uma composição que foi de 67% 4HB e 33% 5HV. Uma amostra extraída deste polímero foi analisada usando DSC e foi determinada como tendo um Tg de 54.9°C e nenhum Tm detectável.

EXEMPLO 12: Biossíntese de glutarato a partir de glicose

Para diferenciar qual dos dois produtos de gene era a desidrogenase GSA primária como identificada no Exemplo 7, cepa de tipo selvagem MG1655 [pJB91], MG1655 Δ *ynel::FRT* [pJB91] e MG1655 Δ *gabD::FRT* [pJB91] foram comparados pelas suas habilidades a fim de produzir glutarato de 5-aminopentanoato, um metabólito intermediário entre L-lisina e GSA (veja a Figura 2). Todas as três cepas contém o plasmídeo pJB91 que expressam *davBAT* do

promotor P_{ompA} como descrito no Exemplo 5. As três cepas foram crescidas em um meio mínimo EO que contém 2 g/L 5-aminopentanoato como descrito anteriormente e o glutarato foi medido por um método GC-MS de cultura sobrenadante. O método e condições de incubação foram os mesmos dos

5 descritos no Exemplo 7.

Ao contrário das duas outras cepas, MG1655 Δ *gabD* [pJB91] não acumulou qualquer glutarato detectável. Assim, a desidrogenase codificada por *gab D* tem a maior parte da atividade com relação a GSA. Portanto, se grandes quantidades de glutarato deverão ser produzidas, hospedeiros de produção precisam

10 expressar *gabD* ou homólogos (veja a Tabela IP) do mesmo. Porém, já que MGI 655 Δ *ynel* [pJB91] acumulou quantidades um pouco menores de glutarato de 5-aminopentanoato se comparado a MG1655 [pJB91], 0.75 g/L versus 1.0 g/L de glutarato, respectivamente, a desidrogenase codificada por *ynel* também tem

15 atividade moderada com relação a GSA. Assim, a sobre expressão de *ynel* ou homólogos (veja a Tabela IQ) do mesmo, pode também produzir grandes quantidades de glutarato de GSA, L-lisina ou glicose.

Os dois melhores homólogos de *GabD* presentes em *Corynebacterium glutamicum* incluem (1) a desidrogenase aldeído NAD-dependente (Nº de Acesso NP_599302) e (2) a proteína hipotética cgR_0068 (Nº de Acesso YP_001136931).

20 Inesperadamente, estas duas proteínas *C. glutamicum* foram também identificadas como os dois homólogos mais próximos para *E. coli Ynel*.

Em seguida, glutarato foi produzido de glicose. Para produzir uma cepa sobreproducente de L-lisina, o plasmídeo pDE033 que contém o gene L-lisina resistente à reação *dapAC*^{352T} foi construído conforme segue: o produto de SOE-

25 PCR para a fabricação do gene *dapA*^{C352T} descrito no Exemplo 9 foi digerido com EcoRI e Sad, seguido pela ligação com pSE380 que tinha sido digerida com as mesmas enzimas, assim criando o plasmídeo pDE033. O gene *dapA*^{C352T} em pDE033 está sob o promotor indizível por IPTG P_{tre} . Plasmídeos pDE033 e pJB91 (descritos acima) foram transformados em cepa MG 1655 para criar a cepa MG

30 1655 [pDE033, pJB91]. As cepas MG1655 e MG1655 [pDE033, pJB91] foram incubadas por 48 h com agitação a 300 rpm a 30°C em um meio que continha 25 g/L de glicose, 16 g/L (NH₄)₂SO₃, 1 g/L KH₂PO₄, 1 g/L MgSO₄, 2 g/L de extrato de levedura, 30 g/L CaCO₃, 0.1 mM IPTG e elementos traço como descrito acima. O meio de cultura para MG1655 [pDE033, pJB91] foi suplementado com 100 µg/ml

35 de ampicilina e 25 µg/ml cloranfenicol. Glutarato foi medido como descrito no Exemplo 7. Os dados mostrados na Tabela 13 demonstram que MG 1655

[pDE033, pJB91] secretou 0.7 g/L de glutarato no meio enquanto a cepa de controle negativo MGI 655 não produziu glutarato. Este resultado mostra claramente que usar um gene resistente à reação *dapA* para acumular L-lisina, junto com o operon *davBAT* para converter L-lisina to GSA em uma célula hospedeira que codifica a desidrogenase GSA, é suficiente para produzir glutarato de glicose como a única fonte de carbono.

Tabela 13. Produção de glutarato a partir de glicose

Cepa [Plasmídeo]	Genótipo Relevante de Plasmídeo	Glutarato (g/L)
MG1655		0
MG1655 [pDE033, pJB91]	pDE33: P _{Trc} - <i>dapA</i> ^{C352T} pJB91 : P _{ompA} - <i>davBAT</i>	0.7

EXEMPLO 13: Biossíntese de 1,5-pentanodiol de sódio 5-hidróxi-valerato

10 Construção da cepa

A cepa MBX3017 (LS5218 $\Delta adhE::FRT$, $\Delta ldhA::FRT$, $\Delta ackA-pta::FRT$) e K-12 cepa MGI 655 foram usadas como cepas hospedeiras para avaliar se 1,5-pentanodiol (PDO) poderia ser acumulado e secretado no meio. Cada única cepa de deleção foi construída pelo método Red/ET da Gene Bridges. Iniciadores para a construção de cassetes de knock-out para as três trajetórias estão listados na Tabela 14. Brevemente, os seguintes iniciadores foram usados para a construção das diversas deleções cromossômicas: MS286 e MS287 para o cassette $\Delta adhE$; MS289 e MS290 para o cassette $\Delta ackA-pta$; e MS292 e MS293 para o cassette $\Delta ldhA$. O LS5218 $\Delta adhE::FRT$, $\Delta ldhA::FRT$, $\Delta ackA-pta::FRT$ foi obtido ao iterativamente transduzir por P1 cada mutação nula para dentro de LS5218 e removendo o marcador como descrito em um exemplo anterior.

Tabela 14. Iniciador usado para estudos PDO

Iniciador	Sequência (5'→3')	Comentário
MS286	CCGTTTATGTTGCCAGACAGCGCTACTGATTAAGCGGATTTT TTCGCTTTCATATGAATATCCTCCTTAGT (SEQ ID NO:44)	cassete $\Delta adhE$
MS287	CGAGCAGATGATTTACTAAAAAGTTTAACATTATCAGGAG AGCATTATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID NO:45)	cassete $\Delta adhE$
MS289	TGGCTCCCTGACGTTTTTTTAGCCACGTATCAATTATAGGTA CTTCCATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID NO:46)	cassete $\Delta ackA-pta$
MS290	GCAGCGCAAAGCTGCGGATGATGACGAGATTACTGCTGCTG TGCAGACTGCATATGAATATCCTCCTTAGT (SEQ ID NO:47)	cassete $\Delta ackA-pta$
MS292	CTCCCCTGGAATGCAGGGGAGCGGCAAGATTAAACCAGTTC GTTCCGGGCACATATGAATATCCTCCTTAGT (SEQ ID NO:48)	cassete $\Delta ldhA$

MS293	TATTTTATAGTAGCTTAAATGTGATTCAACATCACTGGAGAA AGTCTTATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID NO:49)	cassette Δ <i>ldhA</i>
FS011	TCCCCTAGGATTCAGGAGGTTTTATGGAGTGGGAAGAGAT ATATAAAG (SEQ ID NO:50)	5' de <i>orfZ</i>
FS008	CCTTAAGTCGACAAATTCTAAATCTCTTTTAAATTC (SEQ ID NO:51)	3' de <i>orfZ</i>
JRG047	TTCAGGATCCTGCGCATGCTAGCTATAGTTCTAGAGGTA (SEQ ID NO:52)	5' de <i>pduP</i>
JRG048	CATACGATAGCTCATAAAAACCTCCTCGCAGTTAGCGAATA GAAAAGCCGTTGG (SEQ ID NO:53)	3' de <i>pduP</i>
JRG049	GAGGAGGTTTTATGAGCTATCGTATGAGCTATCGTATGTTT GATTATCTGGTGC (SEQ ID NO:54)	5' de <i>dhaT</i>
JRG050	TCTTTCATGAACTCAGAATGCCTGGCGGAAAATCG (SEQ ID NO:55)	3' de <i>dhaT</i>

A propionaldeído desidrogenase CoA-dependente codificando *pduP* de *S. typhimurium* (veja a Tabela IA; Leal, Arch. Microbiol. 180:353-361 (2003)) foi amplificada por iniciadores JRG47 e JRG48. A 1,3-propanodiol desidrogenase que codifica *dhaT* de *Klebsiella pneumoniae* (veja a Tabela IA; Tong et al, Appl. Environ. Microbiol. 57(12):3541-3546 (1991)) foi amplificada com iniciadores JRG49 e JRG50. Os dois genes foram fundidos juntos por SOE-PCR usando iniciadores JRG47 e JRG50. O fragmento de DNA resultante foi clonado para dentro de pJB78 através de sítios BamHI e BspHI e o plasmídeo resultante foi designado como pJGIO.

10 Cepa MBX3017 ou MG1655 abrigando pFS16 ou pSE380 e pJGIO ou pJB78 foram usados para estudos PDO.

15 Cepas foram crescidas sob condições de oxigênio limitado em 5HV-que contém meio E2 por 40 h. O meio consistia de: 10g/L glicose, 2g/L 5HV, 26 mM $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$, 33 mM K_2HPO_4 , 27 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgSO_4 , 25 $\mu\text{g/ml}$ cloramfenicol, 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilina, 0.1 mM IPTG e elementos traço como descrito acima. Culturas deixadas de um dia para o outro foram inoculadas em um tubo de cultura selado que contém meio fresco para um final OD_{600} de aproximadamente 0.2, o espaço livre para o tubo de cultura era pequeno para assegurar a limitação de oxigênio da cultura. As culturas foram incubadas a 30°C.

20 Após 48 h de incubação, uma amostra de 100 μL foi removida, centrifugada e o sobrenadante resultante foi dosado com 1,4-butanediol (0.1 g/L) como norma interna, secado em um centrivap Labconco e re-suspendida em 100 μL

acetonitrila (ACN) por sonicação por 3 h. A solução de acetonitrila foi centrifugada para remover material insolúvel e o sobrenadante foi injetado em um Agilent 5975 GC-MS equipado com uma coluna DB-225ms usando os seguintes parâmetros de aquisição: razão de fluxo do gás carregador Hélio 1 ml/min, modo de varredura m/z 30-400, programa do forno: 40°C por 2 min, então aumentando para 220°C a 10°C/min, temperatura de fonte de íons 230°C, a temperatura do filtro de massa quádruplo 150°C.

Os resultados PDO medidos são mostrados na Tabela 14. A combinação da cepa hospedeira MBX3017 e sobre expressão de *orfZ-dhaT-pduP* resultou no maior rendimento de PDO de 0,32 g/L. Cepa MGI 655 abrigando estes três genes deu um rendimento menor de 0,22 g/L, possivelmente devido ao seu etanol ativo, acetato e trajetória de lactatos, que são aceitadores de elétrons conhecidos (Clark, FEMS Microbiol. Rev. 5:223-34 (1989)) e poderiam competir com a trajetória 5HV para NAD(P)H. Interessantemente, MGI 655 abrigando somente *orfZ* também produziu pequenas quantidades de PDO, enquanto o hospedeiro MBX3017 não redeu qualquer PDO detectável (Tabela 15). Isto indica que uma desidrogenase de álcool endógena, por exemplo, *adhE*, tem atividade fraca com relação a 5HV-CoA. O PDO medido foi confirmado por GC-MS contra a norma de PDO e espectro de referência de PDO da biblioteca NIST como mostrado na Figura 8. Estes resultados demonstram que PDO pode ser produzido de NaSHV quando o gene *orfZ* é expresso para gerar 5HV-CoA e os genes *pduP-dhaT* são expressos convertendo 5HV-CoA em um 5-hidróxipental e em PDO.

Tabela 15. Títre de PDO de cepas crescidas em 5HV que contém meio^a

Plasmídeos e Genes Expressos	PDO (g/L)	
	MG1655	MBX3017
pFS16: Ptrc- <i>orfZ</i> pJB78 : vetor vazio	0,08	0
pJG10:Ptet- <i>pduP</i> <i>dhaT</i> pSE380: vetor vazio	0	0
pFS16: Ptrc- <i>orfZ</i> pJG10: Ptet- <i>pduP</i> - <i>dhaT</i>	0,22	0,32
pJB78: vetor vazio pSE380: vetor vazio	0	0

Resultados ^a são a média de três experimentos independentes replicados

ID de Gene 001 Sequência de Nucleótido: *Aspergillus terreus* NIH2624 semialdeído de glutarato reductase gene *gsaR*-_{At2}

ATGCCACTGGTTGCTCAAAATCCACTGCCACGTGCTATTCTGGGTCTGATG
 ACTTTCCGGTCCGAGCGAAAGCAAAGGTGCGCGTATCACTTCCCTGGATGAG
 TTAAACAAGTGCCTGGATTACTTCCAGCAGCAGGGCTTCCAGGAAATCGAT
 ACCGCGCGCATCTACGTGCGCGGTGAACAGGAGGCATTACGCGCGCAGGCA
 AAGTGGAAAGAACGCGGCCTGACGCTGGCGACTAAGTGGTATCCGCAGTAC
 CCGGGTGCGCACAAACCGGATGTCCTGCGTCAGAACCTGGAGCTGTCCCTG
 AAAGAACTGGGCACGAACCAGGTCGATATCTTCTATCTGCACGCCGCGGAT
 CGTTCTGTGCCGTTTCGCGGAAACTCTGGAAACTGTTAACGAACCTGCACAAA
 GAAGGCAAATTTGTTTCACTGGGTCTGTCTAACTACACCGCTTTCGAAGTA
 GCTGAAATCGTGACCCTGTGTAACGAGCGTGGTTGGGTTCGTCCGACTATC
 TACCAGGCGATGTATAACGCTATCACCCGTAACATCGAACTGAACCTGATC
 CCGGCGTGCAAGCGTTACGGTATTGACATTGTTATCTACAACCCACTGGCG
 GGTGGCCTGTTTCAGCGGCAAATACAAAGCACAGGACATCCCGGCTGAAGGT
 CGTTACAGCGACCAATCTTCCATGGGCCAGATGTACCGCAACCGTTACTTT
 AAGGACGCAACCTTTGACGCTCTGCGCCTGATCGAACCGGTTGTTGCGAAG
 CACGGCCTGACGATGCCGGAACCGCGTTCGCTGGGTCCACCACCACTCC
 GCACTGAACATGGAAGATGGCGGCCGTGACGGCATCATTCTGGGTGTAAGC
 AGCCTGGCTCAGCTGGAAAACAACCTGAAAGACATTAGAAAGGTCCGCTG
 CCGCAGGAGGTTGTAGACGTCCTGGATCAGGCTTGGCTGGTGGCTAAGCCG
 ACGGCTCCAACTACTGGCATCTGGACCTGAAATACACGTACGACACCCAG
 GAAGCTCTGTTCAAACCGAAATCTAAGGCGTAA (SEQ ID NO:56)

ID de Gene 001 Sequência de Amino Ácidos: *Aspergillus terreus* NIH2624
 semialdeído de glutarato reductase gene *gsaR_{At2}*
 MPLVAQNPLPRAILGLMTFGPSESKGARITSLDEFNKCLDYFQQQGFQEID
 TARIYVGGEQEAFTAQAKWKERGLTLATKWYPQYPGAHKPDVLRQNLELSL
 KELGTNQVDIFYLHAADRSVPFAETLETVNELHKEGKFVQLGLSNYTA FEV
 AEIVTLCNERGWVRPTIYQAMYNATRNIE TELIPACKRYGIDIVIYNPLA
 GGLFSGKYKAQDIPAEGRYSDQSSMGQMYRNRYFKDATFDALRLIEPVVAK
 HGLTMPETAFRWVHHHSALNMEDGGRDGIILGVSSLAQLENNLKDIQKGPL
 PQEVVDVLDQAWLVAKPTAPNYWHLDLKYTYDTQEALFKPKSKA (SEQ
 ID NO:57)

- 5 ID de Gene 002 Sequência de Nucleótido: *Arabidopsis thaliana*
 semialdeído de glutarato reductase gene *gsaR_{At}*

ATGGAAGTAGGTTTTCTGGGTCTGGGCATTATGGGTAAAGCTATGTCCATG
AACCTGCTGAAAAACGGTTTTCAAAGTTACCGTGTGGAACCGCACTCTGTCT
AAATGTGATGAACTGGTTGAACACGGTGCAAGCGTGTGCGAGTCTCCGGCT
GAGGTGATCAAGAAATGCAAATACACGATCGCGATGCTGAGCGATCCGTGT
GCAGCTCTGTCTGTTGTTTTTCGATAAAGGCGGTGTTCTGGAACAGATCTGC
GAGGGTAAGGGCTACATCGACATGTCTACCGTCGACGCGGAACTAGCCTG
AAAATTAACGAAGCGATCACGGGCAAAGGTGGCCGTTTTGTAGAAGGTCCT
GTTAGCGGTTCCAAAAAGCCGGCAGAAGACGGCCAGCTGATCATCCTGGCA
GCAGGCGACAAAGCACTGTTTCGAGGAATCCATCCCGGCCTTTGATGTACTG
GGCAAACGTTCTTTTTATCTGGGTGAGGTGGGTAAACGGTGCGAAAATGAAA
CTGATTGTTAACATGATCATGGGTTCTATGATGAACGCGTTTAGCGAAGGT

CTGGTACTGGCAGATAAAAGCGGTCTGTCTAGCGACACGCTGCTGGATATT
CTGGATCTGGGTGCTATGACGAATCCGATGTTCAAAGGCAAAGGTCCGTCC
ATGACTAAATCCAGCTACCCACCGGCTTTCCCGCTGAAACACCAGCAGAAA
GACATGCGTCTGGCTCTGGCTCTGGGCGACGAAAACGCTGTTAGCATGCCG
GTCGCTGCGGCTGCGAACGAAGCCTTCAAGAAAGCCCGTAGCCTGGGCCTG
GGCGATCTGGACTTTTCTGCTGTTATCGAAGCGGTAAAATTCTCTCGTGAA
TAA (SEQ ID NO:58)

ID de Gene 002 Sequência de Amino Ácidos: *Arabidopsis thaliana*
semialdeído de glutarato reductase gene *gsaR_{At}*

MEVGFLGLGIMGKAMSMNLLKNGFKVTVWNRTLKCDDELVEHGASVCESPA
EVIKKCKYTIAMLSDPCAALSVVFDKGGVLEQICEGKGYIDMSTVDAETSL
KINEAITGKGGRFVEGPVSGSKKPAEDGQLIILAAGDKALFEESIPAFDVL
GKRSFYLGQVGNAGMKLIVNMIMGSMNNAFSEGLVLADKSGLSSTLLDI
LDLGAMTNPMFKGKGPSMTKSSYPFAPLKHQQKDMRLALALGDENAVSMP
VAAAANEAFKKARSLGLGLDLDFAVIEAVKFSRE (SEQ ID NO:59)

5

ID de Gene 003 Sequência de Nucleótido: *Pseudomonas putida*/*Zoogloea*
ramigera poli(hidróxi alcanato) sintetase gene de fusão *phaC3/C5*

ATGAGTAACAAGAACAACGATGAGCTGCAGTGGCAATCCTGGTTT CAGCAAG
 GCGCCACCACCGAGGCGAACCCGATGGCCACCATGTTGCAGGATATCGGC
 GTTGCCTCAAACCGGAAGCGATGGAGCAGCTGAAAAACGATTATCTGCGT
 GACTTCACCGCGTTGTGGCAGGATTTTTTGGCTGGCAAGGCGCCAGCCGTC
 AGCGACCGCCGCTTCAGCTCGGCAGCCTGGCAGGGCAATCCGATGTCGGCC
 TTCAATGCCGCATCTTACCTGCTCAACGCCAAATTCCTCAGTGCCATGGTG
 GAGGCGGTGGACACCGCACCCCAGCAAAAGCAGAAAATACGCTTTGCCGTG
 CAGCAGGTGATTGATGCCATGTCGCCCCGCGAACTTCCTCGCCACCAACCCG
 GAAGCGCAGCAAAAACCTGATTGAAACCAAGGGCGAGAGCCTGACGCGTGGC
 CTGGTCAATATGCTGGGCGATATCAACAAGGGCCATATCTCGCTGTGCGAC
 GAATCGGCCTTTGAAGTGGGCCGCAACCTGGCCATTACCCCGGGCACCGTG
 ATTTACGAAAATCCGCTGTTCCAGCTGATCCAGTACACGCCGACCACGCCG
 ACGGTCAGCCAGCGCCCCGCTGTTGATGGTGCCGCCGTGCATCAACAAGTTC
 TACATCCTCGACCTGCAACCGGAAAATTCTGCTGGTGCGCTACGCGGTGGAG
 CAGGGCAACACCGTGTTCTGATCTCGTGGAGCAATCCGGACAAGTCGCTG
 GCCGGCACCACTGGGACGACTACGTGGAGCAGGGCGTGATCGAAGCGATC
 CGCATCGTCCAGGACGTGACGGCCAGGACAAGCTGAACATGTTCCGGCTTC
 TGCGTGGGCGGCACCATCGTTGCCACCGCACTGGCGGTACTGGCGGCGCGT
 GGCCAGCACCCGGCGGCCAGCCTGACCCTGCTGACCACCTTCCTCGACTTC
 AGCGACACCGGCGTGCTCGACGTCTTCGTGATGAAACCCAGGTGCGCGTG
 CGTGAACAGCAATTGCGCGATGGCGGCCTGATGCCGGGGCCGTGACCTGGCC
 TCGACCTTCTCGAGCCTGCGTCCGAACGACCTGGTATGGAACCTATGTGCAG
 TCGAACTACCTCAAAGGCAATGAGCCGGCGGCGTTTGACCTGCTGTTCTGG
 AATTCGGACAGCACCAATTTGCCGGGGCCCGATGTTCTGCTGGTACCTGCGC
 AACACCTACCTGGAAAACAGCCTGAAAGTGCCGGGCAAGCTGACGGTGGCC
 GCGGAAAAGATCGACCTCGGCCTGATCGACGCCCCGGCCTTCATCTACGGT
 TCGCGCGAAGACCACATCGTGCCGTGGATGTGCGCGTACGGTTCGCTCGAC
 ATCCTCAACCAGGGCAAGCCGGGCGCCAACCGCTTCGTGCTGGGCGCGTCC
 GGCCATATCGCCGGCGTGATCAACTCGGTGGCCAAGAACAAGCGCAGCTAC
 TGGATCAACGACGGTGGCGCCCGCGATGCCAGGCCTGGTTTCGATGGCGCG

CAGGAAGTGCCGGGCAGCTGGTGGCCGCAATGGGCGGGTTCTTGACCCAG
 CATGGCGGCAAGAAGGTCAAGCCCAAGGCCAAGCCCGGCAACGCCCGCTAC
 ACCGCGATCGAGGCGGCGCCCGGCGTTACGTCAAAGCCAAGGGCTGA

(SEQ ID NO: 60)

ID de Gene 003 Sequência de Amino Ácidos: *Pseudomonas putida*/Zoogloea ramigera poli(hidróxi alcanato) sintetase gene de fusão

5 PhaC3/C5

MSNKNNDELQWQSWFSKAPTTEANPMATMLQDIGVALKPEAMEQLKNDYLR
 DFTALWQDFLAGKAPAVSDRRFSSAAWQGNPMSAFNAASYLLNAKFLSAMV
 EAVDTAPQQKQKIRFAVQQVIDAMSPANFLATNPEAQOKLIETKGESLTRG
 LVNMLGDINKGHISLSDESAFEVGRNLAITPGTVIYENPLFQLIQYTPPTP
 TVSQRPLLMVPPCINKFYILDLQPENSLVRYAVEQGN TVFLISWSNPKSL
 AGTTWDDYVEQGVIEAIRIVQDVSGQDKLNMFGFCVGGTIVATALAVLAAR
 GQHPAASLTLLTTFLD FSDTGVLDVFVDETQVALREQQLRDGGLMPGRDLA
 STFSSLRPNDLVWNYVQSNYLKGN EPAAFD LFWNSDSTNLP GPMFCWYLR
 NTYLENSLKVPGKLT VAGEKID LGLIDAPAFIYGSREDHIVP WMSAYGSLD
 ILNQGKPGANRFVLGASGHIAGVINSVAKNRSY WINDGGAADAQAWFDGA
 QEVPGSWWPQWAGFLTQHGGKKVKPKAKPGNARYTAIEAAPGRYVKAKG
 (SEQ ID NO:61)

ID de Gene 004 Sequência de Nucleótido: Thiocapsa phenigii poli(hidróxi
 alcanato) sintetase sub-unidade phaE

ATGGCTGGTGACCACGTCGTGGAATGCCTTCGAATTCAGGAGGTTTTTATG
 AACGATACGGCCAACAAGACCAGCGACTGGCTGGACATCCAACGCAAGTAC
 TGGGAGACCTGGTCGGAGCTCGGCCGCAAGACCTTGGGTCTGGAGAAGACC
 CCGGCCAATCCTTGGGCCGCGCCCTCGATCATTGGTGGCAGACGGTCTCG
 CCCGCCGCCCCCAACGACCTGGTTCGCGACTTCATGGAGAAGCTCGCCGAG
 CAGGGCAAGGCCTTCTTCGGCCTCACCGACTACTTCACGAAGGGCCTCGGC
 GGCAGTAGCGGTACGCAGGGCTGGGACACCTCTCGAAGACCATCGACGAC
 ATGCAAAAGGCCTTCGCCAGCGGCCGATCGAAGGCGACGAGACCTTCCGC
 CGCCTGATGGCCTTCTGGGAGATGCCGCTCGACAACCTGGCAGCGCACCATG
 TCCTCGCTGTCCCCGGTGCCCGGCGACCTGCTGCGCAACATGCCGCACGAC
 CAAGTCAGGGACAGCGTCGACCGCATCCTCTCGGCACCCGGGCTCGGCTAC
 ACGCGCGAGGAGCAGGCCCGCTACCAGGATCTGATCCGCCGCTCGCTGGAG
 TACCAGTCGGCCCTGAACGAATAACAAGGCTTCTTCGGCCAGCTCGGTGTC
 AAGTCCCTCGAGCGGATGCGCGCCTTCTGCGAGGGACAGGCCGAGAAGGGC
 GTCGCCATCGAGTCGGCGCGCACCTCTACGACGCCTGGGTGGGCTGCTGC
 GAAGAGGTCTATGCCGAGGAGGTGAGCTCCGCCGACTACGCGCACATCCAC
 GGCCGCCTCGTCAACGCCCAGATGGCCCTCAAGCAGCGCATGTGACCATG
 GTCGACGAGGTCTCGGCGCGATGCCGCTGCCGACCCGCGAGCGAGCTGCGC
 ACGCTCCAGGATCGGCTCCAGGAGTCGCGCGGCGAGGGCAAGCGCCAGCGC
 CAAGAGATCGAGACGCTGAAGCGGCAGGTGCGCGCCTTGGCCGGCGGCGCC
 CAGCCCGCGCCCCAGGCCTCCGCCAGCCAGCACCCGGCCCGCGCCGGCG
 ACGGCCCGGCGGCGAGCGCGGCCCAAGCGCAGCACACGACCCGCGCGC
 AAGACCACCAAGCCCACCACCGGCCAGTGA (SEQ ID NO:62)

- 5 ID de Gene 004 Sequência de Amino Ácidos: Thiocapsa phenigii
 poli(hidróxi alcanato) sintetase sub-unidade PhaE

MNDTANKTSDWLDIQRKYWETWSELGRKTLGLEKTPANPWAGALDHHWQTV
 SPAAPNDLVRDFMEKLAEQ GKAFGLTDYFTKGLGGSSGTQGWDTLSKTID
 DMQKAFASGRIEGDETFRRLLMAFWEMPLDNWQRTMSSLSPVPGDLLRNMPH
 DQVRDSVDRILSAPGLGYTREEQARYQDLIRRSLEYQSALNEYNGFFGQLG
 VKSLERMRAFLOQQAEGVAIESARTLYDAWVGCEEVYAEVSSADYAH
 HGRLVNAQMALKQRMSTMVDEVLGAMPLPTRSELRTLQDRLQESRGEGRQ
 RQEIETLKRQVAALAGGAQPAPQASAPSTRPAPATAPAASAAPKRSTTTR
 RKTTKPTTGQ (SEQ ID NO:63)

ID de Gene 005 Sequência de Nucleótido: Thiocapsa phenigii poli(hidróxi
 alcanato) sintetase sub-unidade phaC

ATGTCCCCATTCCCGATCGACATCCGGCCCCGACAAGCTGACCGAGGAGATG
 CTGGAGTACAGCCGCAAGCTCGGCGAGGGTATGCAGAACCTGCTCAAGGCC
 GACCAGATCGACACAGGCGTCACCCCCAAGGACGTCGTCCACCGCGAGGAC
 AAGCTGGTCTCTACCGCTACCGGCGCCCGGCGCAGGTGGCGACCCAGACG
 ATCCCGCTGCTGATCGTCTACGCCCTCGTCAATCGGCCCTACATGACCGAC
 ATCCAGGAGGATCGCTCGACGATCAAGGGCCTGCTCGCCACCGGTCAAGGAC
 GTCTATCTGATCGACTGGGGCTACCCGGATCAGGCCGACCGGGCGCTGACC
 CTCGATGACTACATCAACGGCTACATCGACCGCTGCGTCGACTACCTGCGC
 GAGACCCACGGCGTCGACCAGGTCAACCTGCTCGGGATCTGCCAGGGCGGG
 GCCTTCAGCCTCTGCTACACGGCCCTGCACTCCGAGAAGGTCAAAAACCTC
 GTCACCATGGTCACGCCGGTCGACTTCCAGACCCCGGGCAACCTGCTCTCG
 GCCTGGGTCCAGAACGTCGACGTCGACCTGGCCGTCGACACCATGGGCAAC
 ATCCCGGGCGAACTGCTCAACTGGACCTTCCTGTGCTCAAGCCCTTCAGC
 CTGACCGGCCAGAAGTACGTCAACATGGTCGACCTGCTCGACGACGAGGAC
 AAGGTCAAGAACTTCCTGCGGATGGAGAAGTGGATCTTCGACAGCCCGGAC
 CAGGCCGGCGAGACCTTCCGCCAGTTCATCAAGGACTTCTACCAGCGCAAC
 GGCTTCATCAACGGCGGCGTCCTGATCGGCGATCAGGAGGTGACCTGCGC
 AACATCCGCTGCCCGGTCTTGAACATCTACCCGATGCAGGACCACCTGGTG
 CCGCCGGATGCCTCCAAGGCCCTCGCGGGACTGACCTCCAGCGAGGACTAC
 ACGGAGCTCGCCTTCCCCGGCGGGCACATCGGCATCTACGTCAGCGGCAAG
 GCGCAGGAAGGAGTCACCCCGGCGATCGGCCGCTGGCTGAACGAACGCGGC
 TGA (SEQ ID NO:64)

- 5 ID de Gene 005 Sequência de Amino Ácidos: Thiocapsa phenigii
 poli(hidróxi alcanato) sintetase sub-unidade PhaC

MSPFPIDIRPDKLTEEMLEYSRKLGEQMQLLKADQIDTGVTPKDVVHRED
KLVLYRYRRPAQVATQTIPLLIYALVNRPYMTDIQEDRSTIKGLLATGQD
VYLIDWGYPDQADRALTLDDYINGYIDRCVDYLRETHGVDQVNLLGICQGG
AFSLCYTALHSEKVKNLVTMVTPVDFQTPGNLLSAWVQNVVDVLAVDTMGN
IPGELLNWTFLSLKPFSLTGQKYVNMVDLLDDEDKVKNFLRMEKWIFDSPD
QAGETFRQFIKDFYQRNGFINGGVLLIGDQEVDLRNIRCPVLNIYPMQDHLV
PPDASKALAGLTSSSEDYTELAFPGGHIGIYVSGKAQEGVTPAIGRWLNERG
(SEQ ID NO:65)

REIVINDICAÇÕES

1. Microrganismo recombinante geneticamente modificado para converter 5-aminopentanoato em um polímero ou copolímero de poli-hidroxiálcanoato (PHA) do mesmo compreendendo 5-hidróxi-valerato, **caracterizado** pelo fato de que a via para converter 5-aminopentanoato em PHA compreendendo 5-hidróxi-valerato compreende 5-aminopentanoato transaminase (δ -aminovalerato transaminase), EC 2.6.1.48; succinato-semialdeído reductase (conhecido, ainda, como semialdeído de glutarato reductase), EC 1.1.1.61; CoA-transferase, EC 2.8.3.14 e EC 2.8.3.n ou Acil-CoA sintetase, EC 6.2.1.3; e PHA sintetase, EC 2.3.1.n; e em que o microrganismo recombinante produz o PHA compreendendo 5-hidroxi-valerato a partir de lisina, em que o microrganismo recombinante é geneticamente modificado para expressar pelo menos um ou mais gene(s) que codifica(m) uma ou mais enzimas para produzir o PHA compreendendo 5-hidroxi-valerato a partir de lisina, em que as enzimas são selecionadas do grupo que consiste em: lisina 2-monooxigenase, EC 1.13.12.2; 5-aminopentanomidase (δ -aminovaleramidase), EC 3.5.1.30; 5-aminopentanoato transaminase (δ -aminovalerato transaminase), EC 2.6.1.48; succinato-semialdeído reductase (conhecido, ainda, como semialdeído de glutarato reductase), EC 1.1.1.61; CoA-transferase, EC 2.8.3.14 e EC 2.8.3.n; Acil-CoA sintetase, EC 6.2.1.3; PHA sintetase, EC 2.3.1.n; em que o 5-aminopentanoato é convertido em 5-hidroxi-valerato, e em que o 5-hidroxi-valerato é convertido no polímero ou copolímero PHA do mesmo pelo microrganismo recombinante.
2. Microrganismo recombinante, de acordo com reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o microrganismo recombinante expressa pelo menos um ou mais genes que codificam uma ou mais enzimas selecionadas a partir de β -cetoacil-CoA tiolase, EC 2.3.1.9 e acetoacetyl-CoA reductase, EC 1.1.1.36.
3. Microrganismo recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o PHA é um polímero de monômeros de 5 hidroxi-valerato ou um copolímero de polímero de 5-hidroxi-valerato, tal como poli (3-hidroxi-butirato-co-5-hidroxi-valerato).
4. Microrganismo recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o microrganismo recombinante converte lisina em 5-aminopentanoato.

5. Microrganismo recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o microrganismo utilizado para construir o microrganismo recombinante foi modificado para a superprodução de lisina em relação a um microrganismo não-modificado.

5 6. Microrganismo recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o microrganismo recombinante é resistente ao análogo da lisina tóxica S-(2-aminoetil) cisteína; em que

10 o microrganismo recombinante expressa uma diidro-di-picolinato sintetase insensível à reação da lisina; em que o microrganismo recombinante expressa uma aspartato quinase III insensível à reação da lisina, e/ou em que o microrganismo recombinante é modificado, adicionalmente, para inibir ou bloquear a exportação de lisina.

15 7. Microrganismo recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o microrganismo foi modificado para reduzir ou eliminar atividade de semialdeído de glutarato desidrogenase, preferencialmente em que a semialdeído de glutarato desidrogenase é reduzida ou eliminada ao excluir ou romper um ou mais genes selecionados a partir do grupo que consiste em *davD*, *ynel* e *gabD* ou seus
20 homólogos.

8. Microrganismo recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o microrganismo recombinante converte 5-hidróxi-valerato em 5-hidróxi-valerato CoA e/ou converte 5-hidróxi-valerato CoA em um poli(hidróxi-alcenoato), tal como poli(5-hidróxi-valerato) ou um copolímero deste, por exemplo, um copolímero selecionado a partir de poli(3-hidróxi-propionato-co-5HV) e poli(4-hidróxi-butirato-co-5HV).
25

9. Microrganismo recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o microrganismo recombinante é procariótico, tal como *E.coli*, ou é um microrganismo eucariótico.

30 10. Microrganismo recombinante, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de ser para a produção de polímeros de poli-hidroxialcanoato (PHA) compreendendo monômeros de 5-hidroxivalerato a partir de lisina, em que o microrganismo recombinante é geneticamente modificado para expressar pelo menos uma enzima selecionada a partir do grupo consistindo em
35 lisina 2-monooxigenase, EC 1.13.12.2; 5-aminopentanamidase (δ -

aminovaleramidase), EC 3.5.1.30; 5-aminopentanoato transaminase (δ -aminovalerato transaminase), EC 2.6.1.48; succinato-semialdeído reductase (conhecido, ainda, como semialdeído de glutarato reductase), EC 1.1.1.61; CoA-transferase, EC 2.8.3.14 e EC 2.8.3.n; Acil-CoA sintetase, EC 6.2.1.3; PHA sintase, EC 2.3.1.n para produzir um poli-hidroxiálcanoato compreendendo monômeros de 5-hidroxiálcanoato, e em que o microrganismo recombinante não produz lisina e/ou não expressa uma atividade enzimática de glutarato semialdeído desidrogenase funcional.

11. Método para a produção de polímeros ou copolímeros de poli-hidroxiálcanoato (PHA) com base em 5 carbonos dos mesmos, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende:

fornecer lisina ou outra matéria-prima de carbono renovável às células geneticamente modificadas conforme definidas em qualquer uma das reivindicações de 1 a 10;

e opcionalmente, em que:

(i) a matéria-prima de carbono renovável é selecionada a partir de amido, sacarose, glicose, lactose, frutose, xilose, maltose e arabinose ou combinações das mesmas, e/ou

(ii) o poli-hidróxi-álcanoato compreende 5-hidroxiálcanoato, por exemplo, poli(5-hidroxiálcanoato), poli(3-hidroxiopropionato-co-5HV), poli(3-hidroxi butirato-co-5HV) ou poli(4-hidroxi butirato-co-5HV),

e opcionalmente o método compreende ainda a etapa de recuperar o poli-hidroxiálcanoato, polímero ou copolímero do mesmo, por exemplo, por extração com solvente ou processamento aquoso.

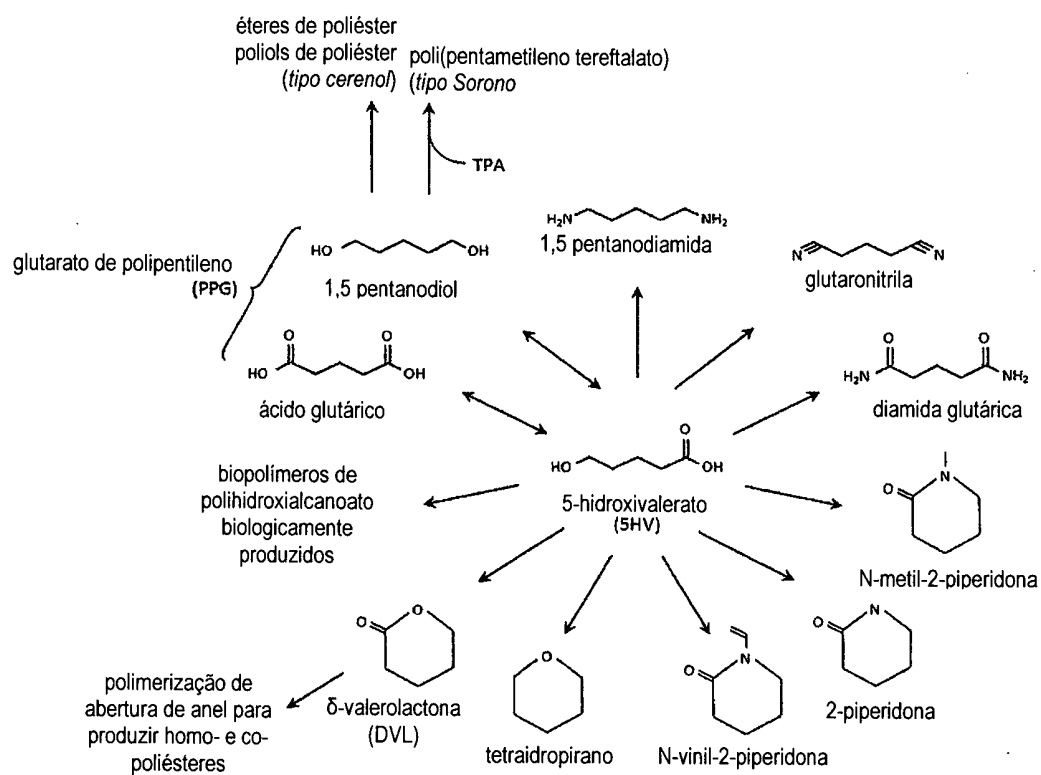


FIGURA 1

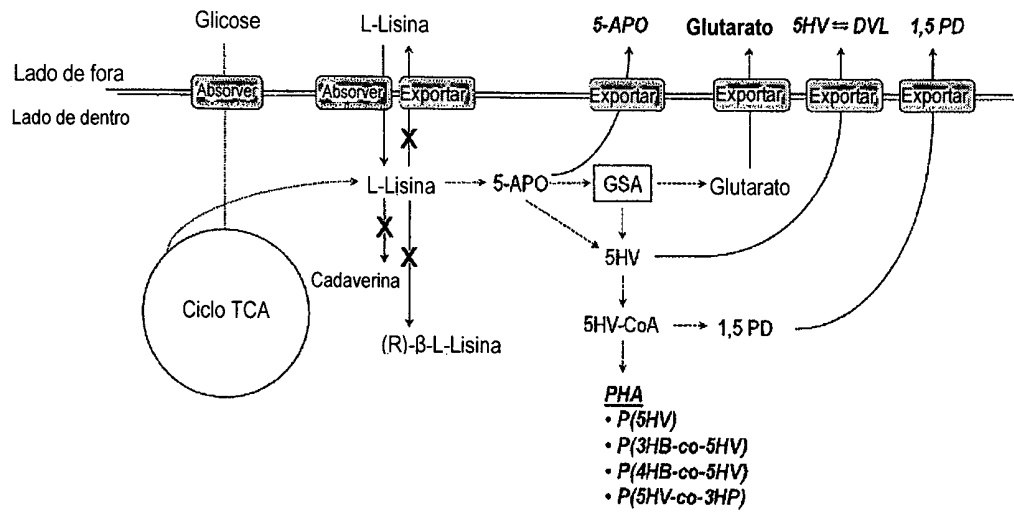


FIGURA 2A

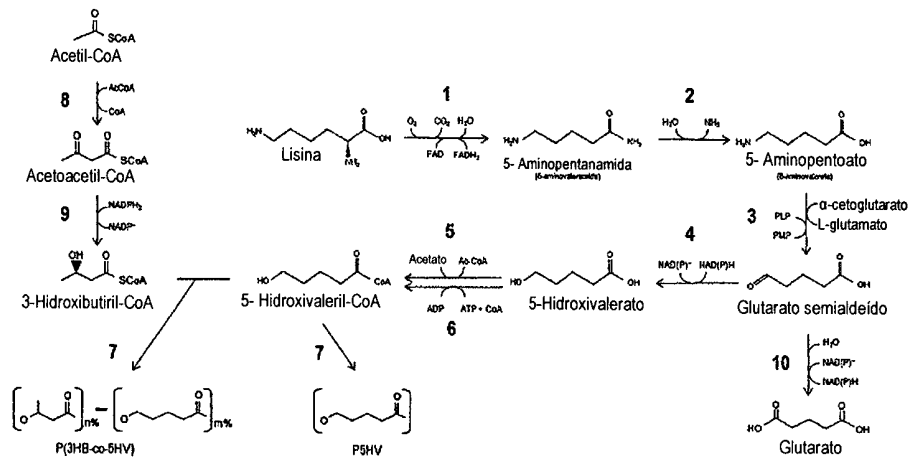
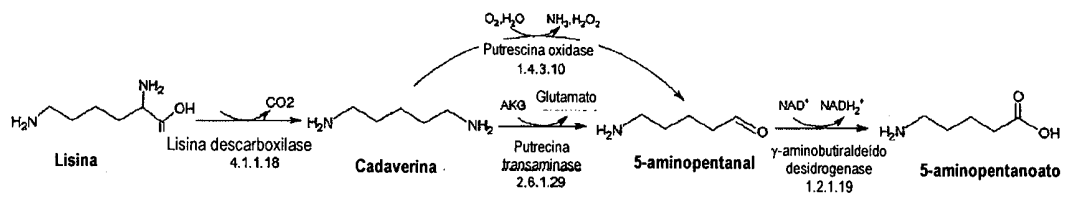


FIGURA 2B

**FIGURA 3**

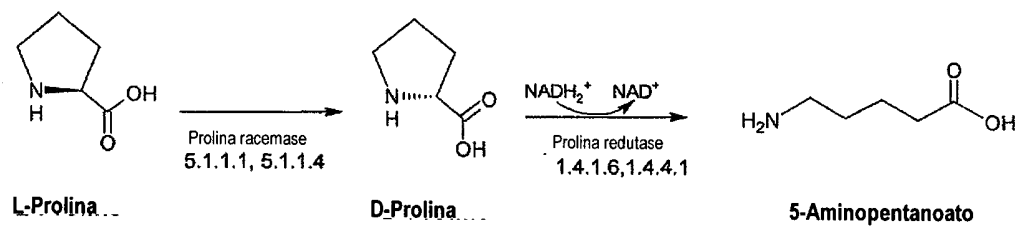


FIGURA 4

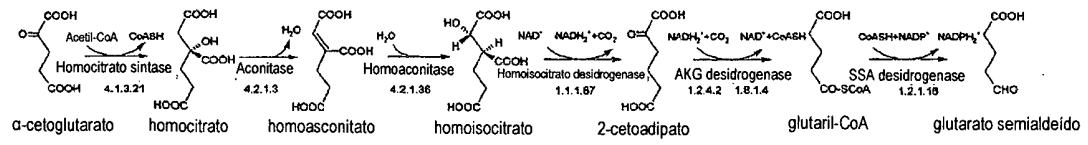


FIGURA 5

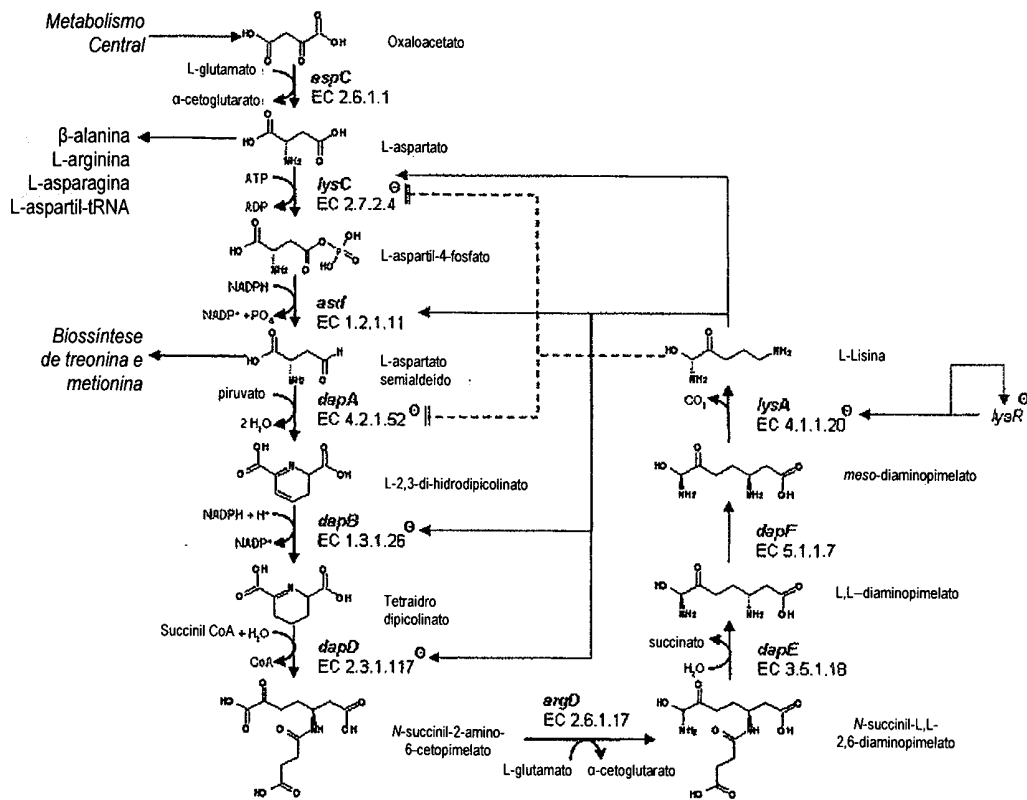


FIGURA 6

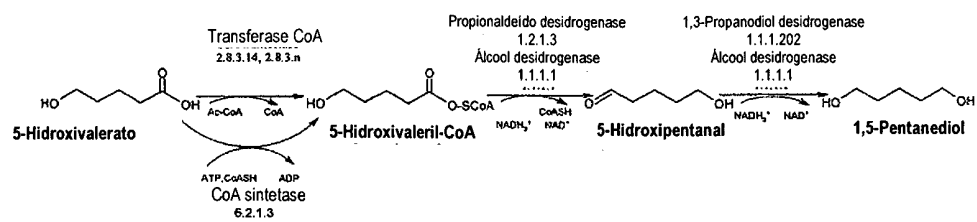
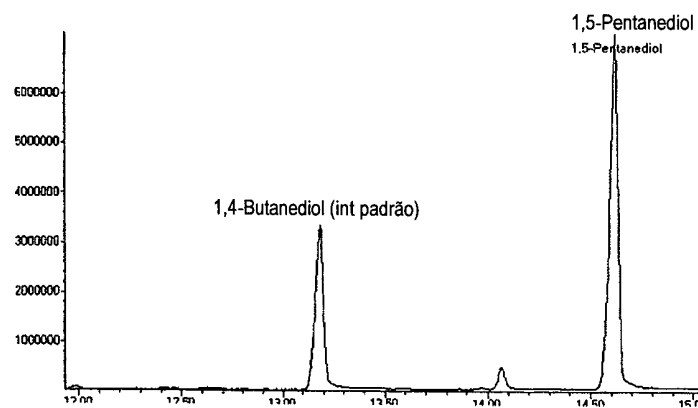


FIGURA 7

A.



B.

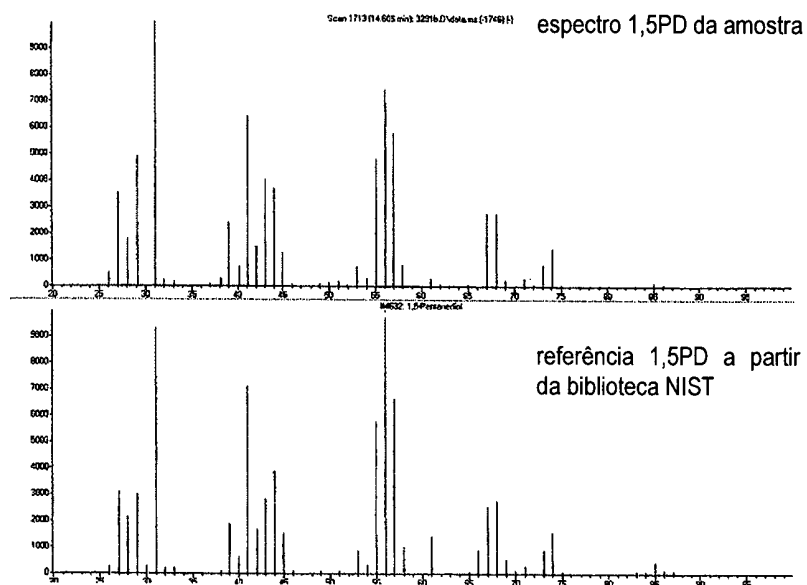


FIGURA 8