



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para:  
**"MICROORGANISMOS METABOLICAMENTE PROJETADOS ÚTEIS PARA A  
PRODUÇÃO DE 1,2-PROPANODIOL"**.

A presente invenção envolve um microorganismo  
5 metabolicamente projetado e seu uso para a preparação de  
1,2-propanodiol.

O 1,2-propanodiol ou propilenoglicol, um diálcool C3,  
é uma substância química amplamente utilizada. Ele é um  
componente das resinas de poliéster insaturadas,  
10 detergentes líquidos, refrigerantes, anticongelantes e  
fluidos descongelantes para aeronaves. Propilenoglicol tem  
sido cada vez mais usado desde 1993 - 1994 como um  
substituto dos derivados de etileno, os quais são  
reconhecidos como sendo mais tóxicos do que os derivados de  
15 propileno.

O 1,2-propanodiol é atualmente produzido por meios  
químicos usando um processo de hidratação de óxido de  
propileno que consome grandes quantidades de água. Óxido de  
propileno pode ser produzido por qualquer um dentre dois  
20 processos, um usando epicloridrina e o outro peróxido de  
hidrogênio. Ambas as vias usam substâncias altamente  
tóxicas. Além disso, a via do peróxido de hidrogênio gera  
subprodutos tais como terc-butanol e 1-feniletanol. Para  
que a produção de propileno se torne lucrativa, um uso deve

ser encontrado para esses subprodutos. A via química geralmente produz 1,2-propanodiol racêmico, enquanto cada um dos dois estereoisômeros (R)1,2-propanodiol e (S)1,2-propanodiol são de interesse para certas aplicações.

5           As desvantagens dos processos químicos para a produção de 1,2-propanodiol tornam a síntese biológica uma alternativa atrativa. Duas vias foram caracterizadas para a produção natural de 1,2-propanodiol a partir de açúcares por microorganismos.

10           Na primeira via os açúcares 6-desóxi (por exemplo, L-ramnose ou L-fucose) são clivados em diidroxiacetona fosfato e (S)-lactaldeído, os quais podem ser ainda reduzidos a (S)-1,2-propanodiol (Badia et al, 1985). Esta via é funcional em *E. coli*, porém não pode gerar um  
15 processo economicamente viável devido ao custo elevado das desoxiexoses.

          A segunda via é o metabolismo dos açúcares comuns (por exemplo, glicose ou xilose) pela via da glicólise seguido pela via do metilglioxal. Diidroxiacetona fosfato é  
20 convertida em metilglioxal, que pode ser reduzido a lactaldeído ou a acetol. Esses dois compostos podem então sofrer uma segunda reação de redução produzindo 1,2-propanodiol. Esta via é utilizada por produtores naturais de (R)-1,2-propanodiol, tais como *Clostridium sphenoides* e

*Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum*. *Clostridium sphenoides* tem sido usada para produzir 1,2-propanodiol em um título de 1,58 g/L sob condições de fosfato limitadas (Tran Din e Gottschalk, 1985). *Thermoanaerobacter*  
5 *thermosaccharolyticum* também foi investigado em relação à produção de 1,2-propanodiol (Cameron e Cooney, 1986, Sanchez-Rivera et al, 1987). Os melhores desempenhos obtidos foram um título de 9 g/L e um rendimento de glicose de 0,2 g/g. Entretanto, a melhoria dos desempenhos obtidos  
10 com esses organismos parece ser limitada devido à falta das ferramentas genéticas disponíveis.

#### **TÉCNICA ANTERIOR**

Cameron et al (1998) investigou o uso de *E. coli* como uma plataforma para a engenharia metabólica para a  
15 conversão de açúcares em 1,2-propanodiol. Suas análises teóricas mostraram que o limite superior do rendimento de produto realístico (considerando o balanços de massa e a produção de energia para o crescimento) é significativamente diferente dependendo das condições de  
20 cultivo. Sob condições anaeróbicas, o acetato será produzido como um subproduto para reciclar os co-fatores reduzidos e o melhor rendimento deve ser limitado a 1 mol de 1,2-propanodiol por mol de glicose (0,42 g/g). Sob condições aeróbicas, a reciclagem dos co-fatores deve ser

assegurada pela cadeia respiratória usando oxigênio como acceptor de elétrons final e poderia ser possível produzir 1,2-propanodiol sem a produção de subprodutos. Sob essas condições, o rendimento poderia alcançar no máximo 1,42 mol/mol (0,6 g/g). Considerando o título máximo de 1,2-propanodiol, Cameron et al discutiu a sua dependência do produto e a toxicidade do subproduto. 1,2-propanodiol é significativamente menos tóxico do que 1,3-propanodiol e a *E. coli* exibe uma taxa de crescimento residual de 0,5 h<sup>-1</sup> com 100 g/L de 1,2-propanodiol. A inibição do crescimento é mais provável de ser decorrente do subproduto acetato que é conhecido por ser altamente inibitório do crescimento. O desenvolvimento de um processo anaeróbico para a produção de 1,2-propanodiol com altos títulos e rendimentos terá que endereçar o problema do acetato. A conversão do acetato em acetona, a qual é menos inibitória e facilmente removida *in situ* foi proposta (WO 2005/073364).

Várias investigações para as modificações genéticas de *E. coli* para obter um produtor de 1,2-propanodiol usando fontes de carbono simples foram feitas pelo grupo de Cameron (Cameron et al, 1998, Altaras e Cameron, 1999, Altaras e Cameron, 2000) e o grupo de Bennett (Huang et al, 1999, Berrios-Rivera et al, 2003). Estes estudos se baseiam, por outro lado, na expressão de uma ou de várias

atividades enzimáticas na via a partir de diidroxiacetona fosfato em 1,2-propanodiol e, por outro lado, na remoção de NADH e nas vias de consumo de carbono na cepa hospedeira. Os melhores resultados obtidos pelo grupo de Cameron são a  
5 produção de 1,4 g/L de 1,2-propanodiol em cultura em frasco anaeróbico com um rendimento de 0,2 g/g de glicose consumida. Quando extrapolada no fermentador de alimentação em lote anaeróbico, a produção foi de 4,5 g/L de 1,2-propanodiol com um rendimento de 0,19 g/g de glicose, muito  
10 longe das suas expectativas teóricas. Esses desempenhos foram obtidos com a superexpressão do gene da metilglioxal sintase de *E. coli* (*mgs*), o gene da glicerol desidrogenase de *E. coli* (*gldA*) e o gene da oxidoredutase de 1,2-propanodiol de *E. coli* (*fuço*) em uma cepa sem o gene que  
15 codifica a lactato desidrogenase (*ldhA*). Os resultados obtidos com a mesma abordagem, porém com títulos e rendimentos menores também estão descritos nas patentes US 6.087.140, US 6.303.352 e WO 98/37204.

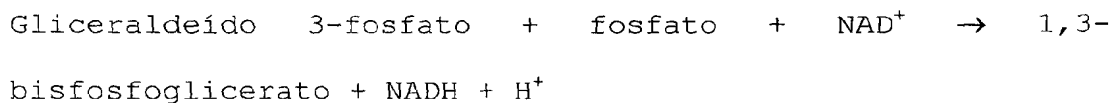
O grupo de Bennett também utilizou uma cepa hospedeira  
20 de *E. coli* sem *ldhA* para a superexpressão do gene *mgs* de *Clostridium acetobutylicum* e o gene *gldA* de *E. coli*. Culturas em frasco sob condições anaeróbicas produziram um título de 1,3 g/L e um rendimento de 0,12 g/g, enquanto culturas microaeróbicas produziram um título de 1,4 g/L com

um rendimento de 0,13 g/g.

Neste estágio, todos estes resultados não são melhores do que aqueles obtidos com as espécies *T. thermosaccharolyticum*.

5 O catabolismo da glicose pela via da glicólise em *E. coli* resulta em duas moléculas de triose fosfato, diidroxiacetona fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato, depois da clivagem de frutose-1,6-bisfosfato. Essas duas moléculas de triose fosfato podem ser interconvertidas pela  
10 atividade da triose fosfato isomerase. É geralmente reconhecido que DHAP é convertido em GA3P e os dos GA3P originários da glicose são posteriormente catabolizados.

A gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, também chamada GAPDH, é uma das enzimas chaves envolvidas na  
15 conversão glicolítica de glicose em ácido pirúvico. GAPDH catalisa a reação a seguir:



O gene codificando esta enzima foi clonado em 1983 em  
20 *E. coli* (Branlant et al., Gene, 1983) e nomeado "gap". Posteriormente outro gene codificando um produto com a mesma atividade enzimática foi identificado e chamado de gapB (Alefounder et al., Microbiol, 1987). A caracterização das cepas de *E. coli* com genes gapA e gapB eliminados

demonstrou que gapA é essencial para a glicólise, apesar de gapB ser dispensável (Seta et al., J. Bacter., 1997). Um microorganismo com um gene gapA infrarregulado foi reportado no pedido de patente WO 2004/033646 para a  
5 produção de 1,3-propanodiol a partir de glicose por fermentação.

Os inventores da presente invenção demonstraram que 2 fatores juntos são necessários para obter um aumento do rendimento de 1,2-propanodiol:

- 10 - uma atividade melhorada da via de biossíntese de 1,2-propanodiol, e
- uma atenuação da atividade de GAPDH.

Os inventores também demonstraram que o aumento da concentração de fosfoenolpiruvato intracelular ou o uso do  
15 sistema transportador de açúcar pode ainda estimular a produção de 1,2-propanodiol por fermentação de um microorganismo.

#### **DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

A invenção está relacionada com um microorganismo útil  
20 para a produção de 1,2-propanodiol a partir de uma fonte de carbono, em que o referido microorganismo é caracterizado por:

- a) uma atividade melhorada da via biossintética de diidroxiacetona fosfato para 1,2-propanodiol, e

b) uma atividade atenuada da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

A atividade melhorada da via Biosintética de DHAP para 1,2-propanodiol é obtida pelo aumento da atividade de pelo menos uma enzima envolvida na referida via biossintética. Isto pode ser obtido pelo aumento da expressão do gene codificando a referida enzima e, particularmente, pela expressão de pelo menos um gene selecionado dentre *mgsA*, *yqhD*, *yafB*, *ycdW*, *yqhE*, *yeaE*, *yghZ*, *yajO*, *tas*, *ydjG*, *ydbC*, *gldA* e *fucO*. Preferivelmente, a expressão dos três genes *mgsA*, *yqhD* e *gldA* é aumentada.

Em outro aspecto da invenção, a via Entner-Doudoroff é eliminada pela anulação ou do gene *edd* ou do gene *eda* ou de ambos. Além disso, a síntese de subprodutos indesejados é atenuada pela anulação dos genes codificando as enzimas envolvidas na síntese de lactato a partir de metilglioal (tal como *gloA*, *Alda*, *aldB*), lactato a partir de piruvato (*ldhA*), formato (*pflA*, *pflB*), etanol (*adhE*) e acetato (*ackA*, *pta*, *poxB*).

A atividade do gliceraldeído 3-fosfato é atenuada para redirecionar uma parte do gliceraldeído 3-fosfato disponível para a síntese de 1,2-propanodiol através da ação da enzima triose fosfato isomerase. O rendimento de 1,2-propanodiol em relação à glicose pode ser então maior

do que 1 mol/mol. Entretanto, devido à produção reduzida de fosfoenolpiruvato (PEP), o sistema de importação de açúcar dependente de PEP será negativamente impactado. Conseqüentemente, em um aspecto da invenção, a eficiência da importação de açúcar é aumentada, seja pelo uso de uma importação de açúcar independente de PEP tipo aquela codificada por galP, ou pelo fornecimento de mais PEP para o sistema açúcar-fosfotransferase. Isto é obtido pela eliminação das vias que consomem PEP como as piruvato quinases (codificadas pelos genes pykA e pykF) e/ou pela promoção da síntese de PEP, por exemplo, pela superexpressão do gene ppsA codificando a PEP sintase.

Adicionalmente, é valioso para a enzima conversora de piruvato em acetil-CoA que seja resistente às elevadas concentrações de NADH encontradas sob condições anaeróbicas. Isto pode ser obtido por uma mutação específica no gene lpd. Finalmente, para poupar NADH para a redução e acetol em 1,2-propanodiol, os genes arca e ndh podem ser anulados.

O microorganismo usado para o preparo de 1,2-propanodiol é selecionado dentre bactérias, leveduras e fungos, porém é preferivelmente das espécies *Escherichia coli* ou *Clostridium acetobutylicum*.

É também um objeto da presente invenção fornecer um

processo para a produção de 1,2-propanodiol pelo cultivo do microorganismo modificado em um meio de crescimento apropriado e pela recuperação e purificação do 1,2-propanodiol produzido.

5           **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

O desenho associado que é incorporado e constitui parte desse relatório descritivo exemplifica a invenção e, juntamente com a descrição, serve para explicar os princípios dessa invenção.

10           A **Figura 1** demonstra a engenharia genética do metabolismo central no desenvolvimento de um sistema de produção de 1,2-propanodiol a partir dos carboidratos.

**DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

15           Conforme aqui utilizados, os termos a seguir podem ser usados para a interpretação das reivindicações e relatório descritivo.

20           De acordo com a invenção, os termos "cultura", "crescimento" e "fermentação" são usados intercambiavelmente para denotar o crescimento de bactérias em um meio de crescimento apropriado contendo uma fonte de carbono simples.

O termo "fonte de carbono", de acordo com a presente invenção, denota qualquer fonte de carbono que possa ser usada pelas pessoas versadas na técnica para manter o

crescimento normal de um microorganismo, e a qual pode ser hexoses, pentoses, monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos, amido ou seus derivados, hemiceluloses, glicerol e suas combinações.

5 O termo "útil para a produção de 1,2-propanodiol" denota que o microorganismo produz o referido produto de interesse, preferivelmente por fermentação. Fermentação é um processo clássico que pode ser efetuado sob condições aeróbicas, microaeróbicas ou anaeróbicas.

10 A frase "atenuação da atividade de uma enzima" se refere a um decréscimo da atividade da enzima de interesse na cepa modificada em comparação com a atividade na cepa inicial antes de qualquer modificação. A pessoa versada na técnica conhece várias formas de obter este resultado.

15 Exemplos possíveis incluem:

- Introdução de uma mutação no gene, reduzindo o nível de expressão desse gene, ou o nível de atividade da proteína codificada.

- Substituição do promotor natural do gene por um  
20 promotor de baixa força, resultando em uma expressão mais baixa.

- Uso dos elementos que desestabilizam o RNA mensageiro correspondente ou a proteína.

- Anulação do gene se não mais for necessária

expressão.

O termo "expressão" se refere à transcrição e tradução de uma sequência gênica que leva à geração da proteína correspondente, produto do gene.

5 Vantajosamente, a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é menor do que 30% da atividade observada em uma cepa não-modificada sob as mesmas condições, mais preferivelmente menor do que 10%.

10 O termo "atividade melhorada da via de biossíntese da diidroxiacetona fosfato em 1,2-propanodiol" significa que pelo menos uma das atividades enzimáticas envolvidas na via é melhorada (ver abaixo).

Vantajosamente, o microorganismo da invenção é geneticamente modificado para aumentar a atividade de pelo 15 menos uma enzima envolvida na via biossintética de diidroxiacetona fosfato para 1,2-propanodiol.

Preferivelmente, o aumento da atividade de uma enzima é obtido pelo aumento da expressão do gene codificando a referida enzima.

20 Para obter uma superexpressão de um gene de interesse, a pessoa versada na técnica conhece diferentes métodos, tais como:

- Substituição do promotor endógeno com um promotor mais forte;

- Introdução no microorganismo de um vetor de expressão carregando o referido gene de interesse;

- Introdução de cópias adicionais do gene de interesse no cromossomo.

5       Várias técnicas são atualmente usadas para introduzir DNA em uma cepa bacteriana. Uma técnica preferida é a eletroporação, a qual é bem conhecida pelas pessoas versadas na técnica.

10       Vantajosamente, pelo menos um gene de interesse é superexpresso, selecionado dentre: *mgsA*, *yafB*, *yeaE*, *yghZ*, *yqhE*, *yqhD*, *ydhF*, *ycdW*, *yajO*, *ydjG*, *ydbC*, *tas*, *gldA* e *fucO*.

15       O gene *mgsA* codifica a metilglioxal sintase catalisando a conversão de DHAP em metilglioxal. Os genes *yafB*, *yeaE*, *yghZ*, *yqhE*, *yqhD*, *ydhF*, *ycdW*, *yajO*, *ydjG*, *ydbC* e *tas* codificam atividades enzimáticas capazes de converter metilglioxal em acetol. O gene *gldA* codifica glicerol desidrogenase, a qual catalisa a conversão do acetol em 1,2-propanodiol. O gene *fucO* codifica 1,2-propanodiol oxidoreductase catalisando a conversão de lactaldeído em 20 1,2-propanodiol.

Um microorganismo preferido abriga modificações que levam à superexpressão dos três genes de interesse particular: *mgsA*, *yqhD* e *gldA*.

Preferivelmente, no microorganismo de acordo com a

invenção, pelo menos um gene envolvido na via Entner-Doudoroff é atenuado. A via Entner-Doudoroff fornece uma via alternativa para degradar glicose em gliceraldeído-3-fosfato e piruvato, além de glicólise. A atenuação da via  
5 Entner-Doudoroff assegura que a maior parte ou, na melhor das hipóteses, toda a glicose é degradada via glicólise e pode ser usada para a produção de 1,2-propanodiol.

Particularmente, pelo menos um dos dois genes dessa via *edd* ou *eda* é atenuado.

10 O termo "atenuação da expressão de um gene", de acordo com a invenção, denota a supressão parcial ou completa da expressão de um gene, o qual é então dito como sendo "atenuado". Esta supressão da expressão pode ser ou uma  
15 inibição da expressão do gene, a supressão de um mecanismo de ativação do gene, uma anulação de toda ou parte da região promotora necessária para a expressão gênica ou uma anulação na região codificadora do gene. Preferivelmente, a atenuação de um gene é essencialmente a anulação completa daquele gene, cujo gene pode ser substituído por um gene  
20 marcador de seleção que facilita a identificação, isolamento e purificação das cepas de acordo com a invenção. Um gene é preferivelmente inativado pela técnica de recombinação homóloga, conforme descrito em Datsenko, K.A. & Wanner, B. L. (2000) "One-step inactivation of

chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645).

Preferivelmente, no microorganismo de acordo com a invenção, pelo menos uma enzima envolvida na conversão de metilglioxal em lactato é atenuada. O propósito desta atenuação é que o metilglioxal disponível seja usado pela maquinaria celular essencialmente para a síntese de 1,2-propanodiol (ver figura 1).

Os genes envolvidos na conversão de metilglioxal em lactato são, particularmente:

- Genes codificando as enzimas com atividade glioxalase, tal como o gene *gloA* codificando a glioxalase I, catalisando a síntese de lactoil glutationa a partir de metilglioxal;
- os genes *Alda* e *aldB* que codificam a lactaldeído desidrogenase (Catalisando a síntese de (S) lactato a partir de (S) lactaldeído).

A expressão de um ou mais desses genes é vantajosamente atenuada na cepa inicial. Preferivelmente, o gene *gloA* é completamente anulado.

No microorganismo da invenção, é preferível que pelo menos uma enzima envolvida na síntese de subprodutos tais como lactato, etanol e formato seja atenuada.

Particularmente, é vantajoso atenuar o gene *ldhA* que

codifica a lactato desidrogenase catalisando a síntese de lactato a partir de piruvato, e o gene adhE codificando álcool-aldeído desidrogenase catalisando a síntese de etanol a partir de acetil-CoA.

5 Semelhantemente, é possível forçar o microorganismo a usar o complexo da piruvato desidrogenase para produzir acetil-CoA, CO<sub>2</sub> e NADH a partir de piruvato, ao invés de acetil-CoA e formato. Isto pode ser conseguido pela atenuação dos genes pflA e pflB que codificam a piruvato  
10 formato liase.

Em outra modalidade específica da invenção, a síntese do subproduto acetato é evitada pela atenuação de pelo menos uma enzima envolvida na sua síntese. É preferível evitar tal síntese de acetato para melhorar a produção de  
15 1,2-propanodiol.

Para prevenir a produção de acetato, vantajosamente a expressão de pelo menos um gene selecionado dentre ackA, pta e poxB é atenuada. Todos esses genes codificam enzimas envolvidas nas diferentes vias de biossíntese de acetato  
20 (ver figura 1).

Preferivelmente, no microorganismo de acordo com a invenção, a eficiência de importação de açúcar é aumentada. Uma forte atenuação da expressão do gene gapA resultando em um decréscimo do fluxo de carbono na reação GAPDH de mais

de 50%, isso irá resultar na síntese de menos de 1 mol de fosfoenolpiruvato (PEP) por mol de glicose importada. PEP é requerido pelo sistema açúcar-fosfotransferase (PTS) normalmente usado para a importação e açúcares simples para dentro da célula, uma vez que a importação é acoplada com uma fosfotransferência de PEP para glicose, produzindo glicose-6-fosfato. Deste modo, a redução da quantidade de PEP irá impactar negativamente na importação de açúcar.

Em uma modalidade específica da invenção, o açúcar deve ser importado no microorganismo por um sistema de importação de açúcar independentemente do fosfoenolpiruvato. O simportador da galactase-próton codificado pelo gene galP que não envolve a fosforilação pode ser utilizado. Neste caso, a glicose importada tem que ser fosforilada pela glicose quinase codificada pelo gene glk. Para promover esta via, a expressão de pelo menos um gene selecionado dentre galP e glk é aumentada. Como resultado, o PTS se torna dispensável e pode ser eliminado pela atenuação de pelo menos um gene selecionado dentre ptsH, ptsI ou crr.

Em outra modalidade específica da invenção, a eficiência do sistema açúcar-fosfotransferase (PTS) é aumentada pelo aumento da disponibilidade do metabólito fosfoenolpiruvato. Devido à atenuação da atividade gapA e

do fluxo de carbono reduzido para o piruvato, a quantidade de PEP na cepa modificada da invenção poderia estar limitada, levando a uma menor quantidade de glicose transportada para dentro da célula.

5           Vários meios existem que podem ser usados para aumentar a disponibilidade de PEP em uma cepa de microorganismo. Particularmente, uma forma é atenuar a reação  $\text{PEP} \rightarrow \text{piruvato}$ . Preferivelmente, pelo menos um gene selecionado dentre *pykA* e *pykF*, codificando a enzima  
10 piruvato quinase, é atenuado na referida cepa para obter este resultado. Outra forma de aumentar a disponibilidade de PEP é favorecer a reação  $\text{piruvato} \rightarrow \text{PEP}$ , catalisada pela fosfoenolpiruvato sintase pelo aumento da atividade da enzima. Essa enzima é codificada pelo gene *ppsA*.  
15 Conseqüentemente, preferivelmente no microorganismo, a expressão do gene *ppsA* é preferivelmente aumentada. Ambas as modificações podem estar presentes no microorganismo simultaneamente.

          Especialmente sob condições anaeróbicas ou  
20 microaeróbicas, é vantajoso que o complexo piruvato desidrogenase (PDC), convertendo piruvato em acetil CoA tenha baixa sensibilidade à inibição por NADH. Uma sensibilidade mais baixa é definida com referência à

sensibilidade da enzima não-modificada. Tal característica pode ser obtida pela introdução de uma mutação específica no gene *lpd* (codificando a subunidade da lipoamida desidrogenase de PDC) resultando na substituição da alanina  
5 55 na sequência proteica da enzima com o resíduo de valina.

Sob condições anaeróbicas ou micraeróbicas, a disponibilidade de NADH para a redução dos precursores em 1,2-propanodiol é vantajosamente aumentada. Isto é obtido pelo alívio da repressão no ciclo do ácido tricarboxílico  
10 mediada pelo regulador global ArcA (codificado pelo gene *arcA*). A concentração de NADH na célula pode também ser aumentada pela inativação da NADH desidrogenase II codificada pelo gene *ndh*. Conseqüentemente, preferivelmente, pelo menos um gene selecionado dentre *arcA*  
15 e *ndh* é atenuado.

Preferivelmente, o microorganismo de acordo com a invenção é selecionado dentre bactérias, leveduras ou fungos. Mais preferivelmente, o microorganismo é selecionado do grupo consistindo de *Enterobacteriaceae*,  
20 *Bacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Streptomycetaceae* e *Corynebacteriaceae*. Ainda mais preferivelmente, o microorganismo é ou *Escherichia coli* ou *Clostridium acetobutylicum*.

Outro objeto da invenção é um método para preparar

1,2-propanodiol, em que um microorganismo, tal como descrito anteriormente, cresce em um meio de crescimento apropriado contendo uma fonte de carbono simples, e o 1,2-propanodiol produzido é recuperado. A produção de 1,2-  
5 propanodiol é efetuada sob condições aeróbicas, microaeróbicas ou anaeróbicas.

As condições de cultivo para o processo de fermentação podem ser prontamente definidas pelas pessoas versadas na técnica. Particularmente, bactérias são fermentadas em  
10 temperaturas entre 20 °C e 55 °C, preferivelmente entre 25 °C e 40 °C, e preferivelmente em cerca de 35 °C para *C. acetbutylicum* e em cerca de 37 °C para *E. coli*.

Esse processo pode ser efetuado ou em um processo em lote, em um processo de alimentação de lote ou em um  
15 processo contínuo.

"Sob condições aeróbicas" significa que oxigênio é fornecido à cultura pela dissolução do gás na fase líquida. Isto poderia ser obtido pela (1) pulverização de gás contendo oxigênio (por exemplo, ar) na fase líquida, ou (2)  
20 agitação do frasco contendo o meio de cultura para transferir o oxigênio contido no espaço de cabeça na fase líquida. Vantagens da fermentação sob condições aeróbicas ao invés de condições anaeróbicas é que a presença de oxigênio como um acceptor de elétrons melhora a capacidade

da cepa de produzir mais energia na forma de ATP para processos celulares. Conseqüentemente, a cepa tem seu metabolismo melhorado de modo geral.

Condições microaeróbicas são definidas como condições  
5 de cultivo em que porcentagens baixas de oxigênio (por exemplo, usando uma mistura de gás contendo entre 0,1 e 10% de oxigênio, completada até 100% de nitrogênio) são dissolvidas na fase líquida.

Condições anaeróbicas são definidas como condições de  
10 cultivo em que nenhum oxigênio é fornecido no meio de cultivo. Condições estritamente anaeróbicas são obtidas pulverizando um gás inerte como nitrogênio no meio de cultura para remover traços de outros gases. Nitrato pode ser usado como um acceptor de elétrons para melhorar a  
15 produção de ATP pela cepa e melhorar o seu metabolismo.

O termo "meio de crescimento apropriado", de acordo com a invenção, denota um meio de composição molecular conhecida adaptado ao crescimento do microorganismo. Por exemplo, um meio de cultura mineral de composição  
20 estabelecida conhecida adaptado às bactérias usadas, contendo pelo menos uma fonte de carbono. Particularmente, o meio de crescimento mineral para *E. coli* pode deste modo ser de composição idêntica ou similar ao meio M9 (Anderson, 1946, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 32:120-128), meio M63

(Miller, 1992; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque) ou um meio tal como aquele  
 5 definido por Schaefer et al. (1999, Anal. Biochem. 270: 88-96), e particularmente o meio de cultura mínimo chamado de MPG descrito abaixo:

<b>K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>1,4 g/L</b>
<b>Ácido nitrilotriacético</b>	<b>0,2 g/L</b>
<b>Solução de elementos traço*</b>	<b>10 mL/L</b>
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>1 g/L</b>
<b>NaCl</b>	<b>0,2 g/L</b>
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	<b>0,2 g/L</b>
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	<b>0,2 g/L</b>
<b>Glicose</b>	<b>20 a 100 g/L</b>
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	<b>0,424 g/L</b>
<b>Tiamina</b>	<b>10 mg/L</b>
<b>FeSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O</b>	<b>50 mg/L</b>
<b>Extrato de levedura</b>	<b>4 g/L</b>

O pH do meio é ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio.

10 **Solução de elementos traço\***: ácido cítrico 4,37 g/L, MnSO<sub>4</sub> 3 g/L, CaCl<sub>2</sub> 1 g/L, CoCl<sub>2</sub> . 2 H<sub>2</sub>O 0,1 g/L, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

0,10 g/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  10 mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  10 mg/L,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  8,31 mg/L.

Em uma modalidade específica da invenção, o método é efetuado com uma cepa de *E. coli* crescida em um meio contendo uma fonte de carbono simples que pode ser arabinose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, sacarose ou xilose. Uma fonte de carbono simples especialmente preferida é a glicose.

Em outra modalidade específica da invenção, o método é efetuado com uma cepa de *C. acetobutylicum* em um meio contendo uma fonte de carbono simples ou complexa.

O meio de crescimento para *C. acetobutylicum* pode ser então de composição idêntica ou similar ao Meio de Crescimento de Clostrídio (CGM, Wiesenborn et al., Appl. Environm. Microbiol., 54: 2717-2722) ou um meio de crescimento mineral conforme dado por Monot et al. (Appl. Environm. Microbiol., 44: 1318-1324) ou Vasconcelos et al. (J. Bacteriol., 176 : 1443-1450).

A fonte de carbono usada para a cultura de *C. acetobutylicum* é ou um carbono simples ou complexo. A fonte de carbono simples pode ser arabinose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, sacarose ou xilose. Uma fonte de carbono simples especialmente preferida é a glicose. A fonte de carbono complexa pode ser amido ou hemicelulose.

Uma fonte de carbono complexa especialmente preferida é o amido.

Vantajosamente, o 1,2-propanodiol recuperado é adicionalmente purificado. A pessoa versada na técnica  
5 conhece várias formas de recuperar e purificar o 1,2-propanodiol.

A invenção é descrita acima, abaixo e nos Exemplos em relação à *E. coli*. Deste modo os genes que podem ser atenuados, eliminados ou superexpressos para as cepas  
10 iniciais e evoluídas de acordo com a invenção são principalmente definidas usando a denominação dos genes de *E. coli*. Entretanto, esta designação tem um significado mais genérico de acordo com a invenção, e cobre os genes correspondentes nos outros microorganismos. Usando as  
15 referências do GenBank dos genes de *E. coli*, as pessoas versadas na técnica podem determinar genes equivalentes em outros organismos diferentes de *E. coli*.

Os meios de identificação das sequências homólogas e de suas homologias de porcentagem são bem conhecidos pelas  
20 pessoas versadas na técnica e incluem particularmente os programas BLAST que podem ser usados no sítio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> com os parâmetros predefinidos indicados naquele sítio. As sequências obtidas podem ser exploradas (alinhadas) usando, por exemplo, os

programas CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), com os parâmetros predefinidos indicados nesses sítios.

O bando de dados PFAM (banco de dados das famílias proteicas dos alinhamentos e modelos Markov escondidos <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) é uma grande coletânea de alinhamentos de sequências proteicas. Cada PFAM torna possível a visualização de alinhamentos múltiplos, ver domínios proteicos, avaliar distribuições dentre os organismos, ganhar acesso a outros bancos de dados e visualizar estruturas proteicas conhecidas.

COGs (clusters de grupos ortólogos de proteínas <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) são obtidas pela comparação das sequências proteicas derivadas de 66 genomas unicelulares totalmente sequenciados representando 44 principais linhagens filogenéticas. Cada COG é definido a partir de pelo menos três linhagens, tornando possível a identificação de velhos domínios conservados.

#### **REFERÊNCIAS na ordem de citação no texto**

1. Badia J, Ros J, Aguilar J (1985), J. Bacteriol 161: 435-437.
2. Tran Din K e Gottschalk G (1985), Arch. Microbiol. 142: 87-92.
3. Cameron DC e Cooney CL (1986), Bio/Technology, 4: 651-654.

4. Sanchez-Rivera F, Cameron DC, Cooney CL (1987),  
Biotechnol. Lett. 9: 449-454.
5. Altaras NE e Cameron DC (1999), Appl. Environ.  
Microbiol. 65: 1180-1185.
- 5 6. Cameron DC, Altaras NE, Hoffman ML, Shaw AJ (1998),  
Biotechnol. Prog. 14: 116-125.
7. Altaras NE e Cameron DC (2000), Biotechnol. Prog.  
16 : 940-946.
8. Huang K, Rudolph FB, Bennett GN (1999), Appl.  
10 Environ. Microbiol. 65 : 3244-3247.
9. Berrios-Rivera SJ, San KY, Bennett GN (2003), J.  
Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 34-40.
10. Branlant G, Flesch G, Branlant C (1983), Gene, 25:  
1-7.
- 15 11. Alefounder PR e Perham RN (1989), Mol. Microbiol.,  
3: 723-732.
12. Seta FD, Boschi-Muller F, Vignais ML, Branlant G  
(1997), J. Bacteriol. 179: 5218-5221.
13. Datsenko KA e Wanner BL (2000), Proc. Natl. Acad.  
20 Sci. USA 97: 6640-6645.
14. Anderson EH (1946), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 32:  
120-128.
15. Miller (1992), A Short Course in Bacterial  
Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia*

*coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque.

16. Schaefer U, Boos W, Takors R, Weuster-Botz D (1999), *Anal. Biochem.* 270: 88-96.
- 5 17. Wiesenborn DP, Rudolph RB, Papoutsakis ET (1987), *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 2717-2722.
18. Monot F, Martin JR, Petitdemange H, Gay R (1982), *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1318-1324.
19. Vasconcelos I, Girbal L, Soucaille P (1994), *J. Bacteriol.* 176: 1443-1450.
- 10 20. Lerner CG e Inouye M (1990), *Nucleic Acids Res.* 18: 4631.

#### **EXEMPLOS**

**Exemplo 1: Construção das cepas modificadas de *E. coli* MG1655 *P*<sub>trc16-gapA</sub>::cm (pME101VB01-*yqhD*-*mgsA*-*gldA*), *E. coli* MG1655 *P*<sub>trc16-gapA</sub>::cm (pME101VB01-*yafB*-*mgsA*-*gldA*) e de *E. coli* MG1655 *P*<sub>trc16-gapA</sub>::cm (pME101VB01-*yqhE*-*mgsA*-*gldA*).**

15

Para aumentar a produção de 1,2-propanodiol diferentes combinações dos genes foram expressas a partir do plasmídeo pME101VB01 usando o promotor *trc*.

20

**a) Construção das cepas modificadas de *E. coli* MG1655 (pME101VB01-*yqhD*-*mgsA*-*gldA*), MG1655 (pME101VB01-*yafB*-*mgsA*-*gldA*) e MG1655 (pME101VB01-*yqhE*-*mgsA*-*gldA*).**

**Construção do plasmídeo pME101VB01**

O plasmídeo pME101VB01 foi derivado do plasmídeo pME101 e abrigou um sítio de clonagem múltiplo contendo sequências do sítio de reconhecimento específicas para as endonucleases de restrição raras NheI, SnaBI, PacI, Bg/II, 5 AvrII, SacII e AgeI seguido pelo terminador de transcrição *adc* de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824.

Para a expressão de um vetor de cópia baixo o plasmídeo pME101 foi construído da seguinte forma. O plasmídeo pCL1920 (Lerner & Inouye, 1990, NAR 18, 15 p 4631 10 - GenBank AX085428) foi amplificado por PCR usando os oligonucleotídeos PME101F e PME101R e o fragmento BstZ17I-XmnI do vetor pTrc99A (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) abrigando o gene *lacI* e o promotor *trc* foi inserido no vetor amplificado.

15 PME101F (SEQ ID NO 1): ccgacagtaagacgggtaagcctg

PME101R (SEQ ID NO 2): agcttagtaaagccctcgctag

Um ligante de ácido nucleico de fita dupla sintético compreendendo o sítio de multiclonagem e o terminador transcricional *adc* foram usados para gerar pME101VB01. Dois 20 oligonucleotídeos com 100 bases que flanqueiam o complemento pelos sítios de restrição digeridos NcoI ou HindIII foram anelados. O produto com 100 pares de base foi subclonado no plasmídeo pME101 digerido NcoI/HindIII para gerar pME101VB01.

pME101VB0 1, consistindo de 100 bases (SEQ ID NO: 3):

catgggctagctacgtattaattaagatctcctagggagctcaccggtTAAAAATAAG  
AGTTAC CTTAAATGGTAACTCTTATTTTTTTTAggcgcgcca

pME101VB01 2, consistindo de 100 bases (SEQ ID NO 4):

5 agcttggcgcgcccTAAAAATAAGAGTTACCATTTAAGGTAACTCTTATTTTTTAaccg  
gtgagctccctagggagatctttaattaatacgtagctagcc

com:

- uma região (letras minúsculas sublinhadas) correspondendo ao sítio de multiclonagem;
- 10 - uma região (letras maiúsculas) correspondendo ao terminador de transcrição *adc* (sequência 179847 a 179814) de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 pSOL1 (NC\_001988).

**Construção dos plasmídeos para a expressão de diferentes combinações dos genes da via biossintética de**  
15 **1,2-propanodiol (pME101VB01-*yqhD*-*mgsA*-*gldA*, pME101VB01-*yafB*-*mgsA*-*gldA* e pME101VB01-*yqhE*-*mgsA*-*gldA*)**

Os genes diferentes foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico de *E. coli* MG1655 usando os oligonucleotídeos dados na Tabela 1.

20 **Tabela 1: oligonucleotídeos usados para a amplificação dos genes da via do 1,2-propanodiol.**

Nome do gene	Nomes dos oligos	SEQ ID	Homologia com gene	Sítios de restrição
<i>yqhD</i>	<i>yqhDR2</i>	No. 5	3153369 - 3153400	BspHI adicionado BspHI removido
		No. 6	3154544 - 3154475	NheI adicionado
	<i>mgsAR</i>	No. 7	1026268 - 1026248	SnaBI adicionado
		No. 8	1025780 - 1025800	BglIII adicionado
<i>gldA</i>	<i>gldAF</i>	No. 9	4136631 - 4136612	AvrII adicionado
		No. 10	4135512 - 4135530	SacI adicionado
	<i>yafB</i>	<i>yafB</i> F2 <i>yafB</i> R	No. 11	229167 - 229190
No. 12			229970 - 229950	NheI adicionado
No. 13			3154641 - 3154661	NcoI adicionado
<i>yqhE</i>	<i>yqhE</i> R	No. 14		

Nome do gene	Nomes dos oligos	SEQ ID	Homologia com gene	Sítios de restrição
			3155464 - 3155444	NheI adicionado

Os fragmentos amplificados por PCR foram cortados com as enzimas de restrição mencionadas na Tabela 1 e clonados nos sítios de restrição do plasmídeo pME101VB01. Os plasmídeos a seguir foram construídos: pME101VB01-*yqhD*-*mgsA-gldA*, pME101VB01-*yafB-mgsA-gldA* e pME101VB01-*yqhE-mgsA-gldA*.

Os plasmídeos foram a seguir introduzidos na cepa de *E. coli* MG1655.

**b) Construção de uma cepa modificada de *E. coli* MG1655**

10 **P<sub>trc16</sub>-gapA::cm**

A substituição do promotor gapA natural com o promotor P<sub>trc16</sub> curto sintético (SEQ ID NO: 15: gagctgttgacgattaatcatccggctcgaataatgtgtgg) na cepa de *E. coli* MG1655 foi feita pela substituição de 225 pb da  
15 sequência gapA à montante com FRT-CmR-FRT e um promotor projetado. A técnica usada foi descrita por Datsenko, K.A. & Wanner, BX. (2000).

Os dois nucleotídeos usados para substituir o promotor

gapA natural de acordo com o Protocolo 1 são dados na Tabela 2.

Protocolo 1: Introdução de um produto de PCR para a recombinação e seleção dos recombinantes.

5 Os oligonucleotídeos escolhidos e dados na Tabela 2 para substituição de um gene ou uma região intergênica foram usados para amplificar ou o cassete de resistência ao cloranfenicol do plasmídeo pKD3 ou o cassete de resistência à canamicina do plasmídeo pKD4 (Datsenko, K.A. & Wanner, 10 B.L. (2000)). O produto de PCR obtido foi então introduzido por eletroporação na cepa receptora com o plasmídeo pKD46 na qual o sistema Red (. . .exo) expresso favorece bastante a recombinação homóloga. Os transformantes resistentes a antibiótico foram então selecionados e a inserção do 15 cassete de resistência foi verificada por análise de PCR com os oligonucleotídeos apropriados dados na Tabela 3.

A cepa resultante foi chamada de *E. coli* MG1655 Ptrc16-gapA::cm.

20 Os 3 plasmídeos foram introduzidos separadamente na cepa de *E. coli* MG1655 Ptrc16-gapA::cm.

**Tabela 2:** Oligonucleotídeos usados para a substituição de uma região cromossomal por recombinação com um produto de PCR na cepa de *E. coli* MG1655.

Nome da região	Nome dos oligos	SEQ ID	Homologia com região cromossomal
Promotor GAPA (Ptrc16-gapA)	Ptrc-gapAF	No. 16	1860478 - 1860536
	Ptrc16-gapAR	No. 17	1860762 - 1860800
Genes edd e eda	DeddF	No. 18	1932582 - 1932501
	DedaR	No. 19	1930144 - 1930223
Gene gloA	GLOAD f	No. 20	1725861 - 1725940
	GLOA D R	No. 21	1726268 - 1726189
gene aldA	AldA D f	No. 22	1486256 - 1486336
	aldAD r	No. 23	1487695 - 1487615
gene aldB	AldB D f	No. 24	3752603 - 3752682
	aldBD r	No. 25	3754141 - 3754062

<b>Nome da região</b>	<b>Nome dos oligos</b>	<b>SEQ ID</b>	<b>Homologia com região cromossomal</b>
gene ldhA	DldhAF	No. 26	1440865 - 1440786
	DldhAR	No. 27	1439878 - 1439958
Gene pflAB	DpflB r	No. 28	952315 - 952236
	DpflAf	No. 29	949470 - 949549
Gene adhE	DadhE r	No. 30	1297344 - 1297264
	DadhEf	No. 31	1297694 - 1297773
Genes ackA-pta	DackAF	No. 32	2411494 - 2411573
	DptaR	No. 33	2414906 - 2414830
gene poxB	DpoxBF	No. 34	908557 - 908635
	DpoxBR	No. 35	910262 - 910180

<b>Nome da região</b>	<b>Nome dos oligos</b>	<b>SEQ ID</b>	<b>Homologia com região cromossomal</b>
Gene pykA	DpykAF	No. 36	1935756 - 1935836
	DpykAR	No. 37	1755129 - 1755051
Gene pykF	DpykFF	No. 38	1753689 - 1753766
	DpykFR	No. 39	1755129 - 1755051

**Tabela 3: Oligonucleotídeos usados para verificar a inserção de um cassete de resistência ou a perda de um cassete de resistência**

<b>Nome da região</b>	<b>Nome dos oligos</b>	<b>SEQ ID</b>	<b>Homologia com região cromossomal</b>
Promotor GAPA (Ptrc16-gapA)	yeaAF	No. 40	1860259 - 1860287
	gapAR	No. 41	1861068 - 1861040
Genes edd e eda	eddF	No. 42	1932996 - 1932968
	edaR	No. 43	1929754 - 1929777
Gene gloA	NemAQd	No. 44	1725331 a 1725361
	Rnt Cr	No. 45	1726795 a 1726765

Nome da região	Nome dos oligos	SEQ ID	Homologia com região cromossomal
gene aldA	Ydc F C f	No. 46	1485722 a 1485752
	gapCCr	No. 47	1488225 a 1488195
gene aldB	aldB C f	No. 48	3752056 a 3752095
	YiaYCr	No. 49	3754674 a 3754644
gene ldhA	ldhAF	No. 50	1439724 a 1439743
	ldhAR	No. 51	1441029 a 1441007
Gene pflAB	pflAB 1	No. 52	948462 a 948491
	pflAB 2	No. 53	953689 a 983660
Gene adhE	ychGf	No. 54	1294357 a 1294378
	adhECr	No. 55	1297772 a 1297749
Genes ackA-pta	B2295	No. 56	2410900 a 2410919
	YfccR	No. 57	2415164 a 2415145
gene poxB	poxBF	No. 58	908475 a 908495
	poxBR	No. 59	910375 a 910352
Gene pykA	pykAF	No. 60	1935338 a 1935360
	pykAR	No. 61	1937425 a 1937401
Gene pykF	pykFF	No. 62	1753371 a 1753392
	pykFR	No. 63	1755518 a 1755495

**Exemplo 2: Construção das cepas modificadas de *E. coli***

**MG1655 Ptrc16-gapA,  $\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA,  $\Delta$ pykA,  $\Delta$ pykF**

(pME101VB01-yqhD-mgsA-gldA), (pJB137-PgapA-ppsA), *E. coli*  
 MG1655 Ptrc16-gapA,  $\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA,  $\Delta$ pykA,  $\Delta$ pykF  
 (pME101VB01-yafB-mgsA-gldA), (pJB137-PgapA-ppsA) e *E. coli*  
 MG1655 Ptrc16-gapA,  $\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA,  $\Delta$ pykA,  $\Delta$ pykF  
 5 (pME101VB01-yqhE-mgsA-gldA), (pJB137-PgapA-ppsA) capazes  
 de produzir 1,2-propanodiol com alto rendimento.

Os genes edd-eda foram inativados na cepa de *E. coli*  
 MG1655 pela inserção de um cassete de resistência de  
 antibiótico canamicina e anulando a maior parte dos genes  
 10 envolvidos usando a técnica descrita no Protocolo 1 com os  
 oligonucleotídeos dados na Tabela 2. A cepa obtida foi  
 nomeada *E. coli* MG1655  $\Delta$ edd-eda::km.

A anulação foi transferida para a cepa de *E. coli*  
 MG1655 Ptrc16-gapA::cm de acordo com o Protocolo 2.

15 Protocolo 2: Transdução com o fago P1 para anulação de  
 um gene

A anulação do gene escolhido por substituição do gene  
 por um cassete de resistência (canamicina ou cloranfenicol)  
 na cepa de *E. coli* receptora foi efetuada pela técnica de  
 20 transdução com o fago P1. O protocolo se deu em dois  
 passos, (i) a preparação do lisato de fago na cepa MG1655  
 com um único gele anulado e (ii) a transdução da cepa  
 receptora por este lisato de fago.

Preparação do lisato de fago

- Semeadura com 100  $\mu$ L de uma cultura de um dia para o outro da cepa MG1655 com um único gene eliminado de 10 mL de LB + Cm 30  $\mu$ g/mL + glicose 0,2% + CaCl<sub>2</sub> 5 mM.
- 5       - Incubação por 30 min a 37 °C com agitação.
- Adição de 100  $\mu$ L de lisato de fago P1 preparado na cepa de tipo selvagem MG1655 (aprox.  $1 \times 10^9$  fago/mL).
- Agitação a 37 °C por 3 horas até todas as células serem lisadas.
- 10       - Adição de 200  $\mu$ L de clorofórmio, e submissão ao vórtex.
- Centrifugação por 10 min a 4500 g para eliminar os fragmentos celulares.
- Transferência do sobrenadante em um tubo estéril e
- 15       adição de 200  $\mu$ L de clorofórmio.
- Armazenamento do lisato a 4 °C.

Transdução

- Centrifugação por 10 min a 1500 g de 5 mL de uma cultura de um dia para o outro da cepa receptora de *E. coli*
- 20       em meio LB.
- Suspensão do pélete celular em 2,5 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM.
- Tubos de controle:       100  $\mu$ L de células

100  $\mu$ L de fagos P1 da cepa MG1655 com um único gene eliminado.

- Tubo de teste: 100  $\mu$ L de células + 100  $\mu$ L de fagos P1 da cepa MG1655 com um único gene eliminado.

5 - Incubação por 30 min a 30 °C sem agitação.

- Adição de 100  $\mu$ L de citrato de sódio 1 M em cada tubo, e submissão ao vórtex.

- Adição de 1 mL de LB.

- Incubação por 1 hora a 37 °C com agitação.

10 - Plaqueamento em placas LB + Cm 30  $\mu$ g/mL depois da centrifugação dos tubos por 3 min a 7000 rpm.

- Incubação a 37 °C de um dia para o outro.

Os transformantes resistentes a antibióticos foram então selecionados e a inserção da anulação foi verificada por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos apropriados.

A cepa resultante foi nomeada *E. coli* MG1655 Ptrc16-gapA::cm,  $\Delta$ edd-eda::km.

Os cassetes de resistência a antibióticos foram então eliminados de acordo com o Protocolo 3.

### Protocolo 3: Eliminação dos cassetes de resistência

Os cassetes de resistência ao cloranfenicol e/ou canamicina foram eliminados de acordo com a técnica a

seguir. O plasmídeo pCP20 carregando a FLP recombinase atuando nos sítios FRT dos cassetes de resistência ao cloranfenicol e/ou canamicina foram introduzidos nas cepas recombinantes por eletroporação. Depois do cultivo em série a 42 °C, a perda dos cassetes de resistência a antibióticos foi verificada por análise de PCR com os oligonucleotídeos dados na Tabela 3.

A cepa MG1655  $\Delta$ gloA::cm foi construída de acordo com o Protocolo 1 com os oligonucleotídeos dados na Tabela 2 e essa anulação foi transferida para a cepa previamente construída de acordo com o Protocolo 2. A cepa resultante foi chamada de *E. coli* MG1655 Ptrc16-gapA,  $\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA::cm.

O gene pykA foi inativado na cepa anterior pela inserção de um cassete de resistência ao antibiótico canamicina de acordo com o Protocolo 1 com os oligonucleotídeos dados na Tabela 2. A cepa resultante foi chamada de *E. coli* MG1655 Ptrc16-gapA,  $\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA::cm,  $\Delta$ pykA::km.

Os cassetes de resistência a antibiótico foram então eliminados de acordo com o Protocolo 3.

O gene pykF foi inativado pela inserção de um cassete de resistência ao antibiótico cloranfenicol de acordo com o

Protocolo 1 com o oligonucleotídeos dados na Tabela 2. A cepa resultante foi chamada de *E. coli* MG1655 Ptrc16-gapA,  $\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA,  $\Delta$ pykA,  $\Delta$ pykF::cm.

O cassete de resistência a antibiótico foi a seguir  
5 eliminado de acordo com o Protocolo 3.

Em cada passo, a presença de todas as anulações previamente construídas foi verificada usando o oligonucleotídeos dados na Tabela 3.

Para aumentar a produção do fosfoenolpiruvato, o gene  
10 ppsA foi expresso a partir do plasmídeo pJB137 usando o promotor gapA. Para a construção do plasmídeo pJB137-PgapA-ppsA, o gene ppsA foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *E. coli* MG1655 usando os seguintes nucleotídeos:

15 1. gapA-ppsAF, consistindo de 65 bases (SEQ ID NO 64)  
ccttttattcactaacaataagctggtggaatatATGTCCAACAATGGCTCGTCACCGC  
TGGTGC com:

- uma região (letras maiúsculas) homóloga à sequência  
(1785106 - 1785136) do gene ppsA (1785136 a 1782758), uma  
20 sequência de referência do sítio  
<http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>), e

- uma região (letras minúsculas) homóloga ao promotor gapA (1860794 - 1860761).

2. ppsAR, consistindo de 43 bases (SEQ ID NO 65)

aatcgcaagcttGAATCCGGTTATTTCTTCAGTTCAGCCAGGC com:

- uma região (letras maiúsculas) homólogas à sequência (1782758 - 1782780) da região do gene ppsA (1785136 a 1782758),

5 - um sítio de restrição HindIII (letras sublinhadas)

Ao mesmo tempo, a região promotora gapA do gene gapA de *E. coli* foi amplificada usando os oligonucleotídeos a seguir:

1. gapA-ppsAR, consistindo de 65 bases (SEQ ID NO: 66)

10 GCACCAGCGGTGACGAGCCATTGTTGGACATatattccaccagctatttgtag  
tgaataaaagg com:

- uma região (letras maiúsculas) homólogas à sequência (1785106 - 1785136) do gene ppsA (1785136 a 1782758), e

15 - uma região (letras minúsculas) homólogas ao promotor gapA (1860794 - 1860761).

2. gapAF, consistindo de 33 bases (SEQ ID NO: 67)

ACGTCCCCGGGcaagcccaaaggaagagtgaggc com:

- uma região (letras minúsculas) homólogas ao promotor gapA (1860639 - 1860661).

20 - um sítio de restrição SmaI (letras sublinhadas)

Ambos os fragmentos foram subsequentemente fundidos usando os oligonucleotídeos ppsAR e gapAF (Horton et al. 1989 Gene 77: 61-68). Os fragmentos amplificados por PCR foram cortados com as enzimas de restrição HindIII e SmaI e

clonados nos sítios HindIII/SmaI do vetor pJB137 (Número de acesso EMBL: U75326 originando o vetor pJB137-PgapA-ppsA. Os diferentes plasmídeos pME101VB01 e pJB137-PgapA-ppsA foram introduzidos na cepa de *E. coli* MG1655 Ptrc16-gapA,  $\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA,  $\Delta$ pykA,  $\Delta$ pykF. As cepas obtidas foram nomeadas respectivamente como *E. coli* MG1655 Ptrc16-gapA,  $\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA,  $\Delta$ pykA,  $\Delta$ pykF, pME101VB01-yqhD-mgsA-gldA, pJB137-PgapA-ppsA (cepa 1), *E. coli* MG1655 Ptrc16-gapA,  $\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA,  $\Delta$ pykA,  $\Delta$ pykF, pME101VB01-yafB-mgsA-gldA, pJB137-PgapA-ppsA (cepa 2) e *E. coli* MG1655 Ptrc16-gapA,  $\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA,  $\Delta$ pykA,  $\Delta$ pykF, pME101VB01-yqhE-mgsA-gldA, pJB137-PgapA-ppsA (cepa 3).

**Exemplo 3: Construção de cepas modificadas de *E. coli* MG1655 Ptrc16-gapA,  $\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA,  $\Delta$ aldA,  $\Delta$ aldB,  $\Delta$ ldhA,  $\Delta$ pflAB,  $\Delta$ adhE,  $\Delta$ ackA-pta,  $\Delta$ poxB,  $\Delta$ pykA,  $\Delta$ pykF (pME101VB01-yqhD-mgsA-gldA), (pJB137-PgapA-ppsA), *E. coli* MG1655 Ptrc16-gapA,  $\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA,  $\Delta$ aldA,  $\Delta$ aldB,  $\Delta$ ldhA,  $\Delta$ pflAB,  $\Delta$ adhE,  $\Delta$ ackA-pta,  $\Delta$ poxB,  $\Delta$ pykA,  $\Delta$ pykF (pME101VB01-yafB-mgsA-gldA), (pJB137-PgapA-ppsA) e *E. coli* MG1655 Ptrc16-gapA,  $\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA,  $\Delta$ aldA,  $\Delta$ aldB,  $\Delta$ ldhA,  $\Delta$ pflAB,  $\Delta$ adhE,  $\Delta$ ackA-pta,  $\Delta$ poxB,  $\Delta$ pykA,  $\Delta$ pykF (pME101VB01-yqhE-mgsA-gldA), (pJB137-PgapA-ppsA) capazes de produzir 1,2-**

**propanodiol com um maior rendimento do que 1 mol/mol de glicose.**

As cepas MG1655  $\Delta$ aldA::km, MG1655  $\Delta$ aldB::cm, MG1655  $\Delta$ pflAB::km MG1655  $\Delta$ adhE::cm, MG1655  $\Delta$ ackA-pta::cm são  
 5 construídas de acordo com o Protocolo 1 com os oligonucleotídeos dados na Tabela 2 e essas anulações são transferidas na cepa previamente construída de acordo com o Protocolo 2. Quando necessário, os cassetes de resistência a antibiótico são eliminados de acordo com o Protocolo 3.

10 O gene *ldhA* e o gene *poxB* são inativados na cepa previamente construída pela inserção de um cassete de resistência ao antibiótico cloranfenicol de acordo com o Protocolo 1 com os oligonucleotídeos dados na Tabela 2. Quando necessário, os cassetes de resistência a antibiótico  
 15 são eliminados de acordo com o Protocolo 3.

Em cada passo, a presença de todas as anulações previamente construídas é verificada usando os oligonucleotídeos dados na Tabela 3.

A cepa resultante é chamada de *E. coli* MG1655 Ptrcl6-  
 20 gapA,  $\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA,  $\Delta$ aldA,  $\Delta$ aldB,  $\Delta$ ldhA,  $\Delta$ pflAB,  $\Delta$ adhE,  $\Delta$ ackA-pta,  $\Delta$ poxB,  $\Delta$ pykA,  $\Delta$ pykF.

Os diferentes plasmídeos pME101VB01 e pJB137-PgapA-ppA são introduzidos na cepa de *E. coli* MG1655 Ptrcl6-gapA,

$\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA,  $\Delta$ aldA,  $\Delta$ aldB,  $\Delta$ ldhA,  $\Delta$ pflAB,  $\Delta$ adhE,  
 $\Delta$ ackA-pta,  $\Delta$ poxB,  $\Delta$ pykA,  $\Delta$ pykF. As cepas obtidas são  
denominadas respectivamente de *E. coli* MG1655 Ptrc16-gapA,  
 $\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA,  $\Delta$ aldA,  $\Delta$ aldB,  $\Delta$ ldhA,  $\Delta$ pflAB,  $\Delta$ adhE,  
5  $\Delta$ ackA-pta,  $\Delta$ poxB,  $\Delta$ pykA,  $\Delta$ pykF (pME101VB01-yqhD-mgsA-  
gldA), (pJB137-PgapA-ppsA), *E. coli* MG1655 Ptrc16-gapA,  
 $\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA,  $\Delta$ aldA,  $\Delta$ aldB,  $\Delta$ ldhA,  $\Delta$ pflAB,  $\Delta$ adhE,  
 $\Delta$ ackA-pta,  $\Delta$ poxB,  $\Delta$ pykA,  $\Delta$ pykF, pME101VB01-yafB-mgsA-gldA,  
pJB137-PgapA-ppsA e *E. coli* MG1655 Ptrc16-gapA,  $\Delta$ edd-eda,  
10  $\Delta$ gloA,  $\Delta$ aldA,  $\Delta$ aldB,  $\Delta$ ldhA,  $\Delta$ pflAB,  $\Delta$ adhE,  $\Delta$ ackA-pta,  
 $\Delta$ poxB,  $\Delta$ pykA,  $\Delta$ pykF, pME101VB01-yqhE-mgsA-gldA, pJB137-  
PgapA-ppsA.

**Exemplo 4: Comparação das diferentes cepas para a produção de 1,2-propanodiol sob condições aeróbicas.**

15 As cepas obtidas estão descritas no Exemplo 2 (Cepas 1, 2 e 3) e as cepas de controle (controle 1: MG1655 pME101VB01-yqhD-mgsA-gldA, controle 2 : MG1655 pME101VB01-yafB-mgsA-gldA, controle 3: MG1655 pME101VB01-yqhE-mgsA-gldA e controle 4: MG1655 Ptrc16-gapA,  $\Delta$ edd-eda,  $\Delta$ gloA,  
20  $\Delta$ pykA,  $\Delta$ pykF) foram cultivadas em um ensaio em frasco de erlenmeyer sob condições aeróbicas em meio mínimo com glicose como fonte de carbono. O cultivo foi efetuado a 34

°C ou 37 °C e o pH foi mantido pelo tamponamento do meio de cultura com MOPS. No final do cultivo, 1,2-propanodiol, acetol e glicose residual no caldo de fermentação foram analisados por HPLC e os rendimentos de 1,2-propanodiol em relação à glicose e 1,2-propanodiol + acetol em glicose foram calculados. A melhor cepa foi então selecionada para uma cultura em alimentação em lote fermentadora.

Cepa	Título de 1,2-propanodiol (g/L)	Título de acetol (g/L)	Rendimento de 1,2-propanodiol (g/g de glicose)	Rendimento de 1,2-propanodiol + acetol (g/g de glicose)
Controle 1	0,02	0	0,004	0,004
Controle 2	0	0	0	0
Controle 3	0,01	0	0,002	0,002
Controle 4	0,05	0,34	0	0,04
Cepa 1	2,25	1,40	0,14	0,23
Cepa 2	1,64	1,31	0,10	0,18
Cepa 3	0,77	0,47	0,06	0,10

**Exemplo 5: Produção de 1,2-propanodiol em cultura em alimentação em lote com a melhor cepa.**

10 A melhor cepa selecionada no experimento anterior é cultivada em um fermentador de 2 L usando um protocolo de

alimentação em lote.

A temperatura da cultura é mantida constante a 37 °C e o pH é permanentemente ajustado até valores entre 6,5 e 8 usando uma solução de NH<sub>4</sub>OH. A taxa de agitação é mantida entre 200 e 300 rpm durante a fase de batelada e é aumentada até 1000 rpm no final da fase de alimentação em lote. A concentração do oxigênio dissolvido é mantida em valores entre 30 e 40% de saturação pelo uso de um controlador de gás. Quando a densidade ótica alcançar um valor entre três e cinco, a alimentação em lote é iniciada com uma taxa de fluxo inicial entre 0,3 e 0,5 mL/h e um aumento progressivo até valores de taxa de fluxo entre 2,5 e 3,5 mL/h. Neste ponto, a taxa de fluxo é mantida constante por 24 a 48 horas. O meio da alimentação é à base de meio mínimo contendo glicose nas concentrações entre 300 e 500 g/L.

## REIVINDICAÇÕES

1. Microorganismo útil para a produção de 1,2-propanodiol a partir de uma fonte de carbono em que o referido microorganismo é **caracterizado pelo** fato de  
5 apresentar:

- uma atividade melhorada da via biossintética de diidroxiacetona fosfato para 1,2-propanodiol, e
- uma atividade atenuada da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

10 2. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que ele é geneticamente modificado para aumentar a atividade de pelo menos uma enzima envolvida na via biossintética de diidroxiacetona fosfato em 1,2-propanodiol.

15 3. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato de que o aumento da atividade de pelo menos uma enzima é obtido pelo aumento da expressão do gene codificando a referida enzima.

20 4. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pelo** fato de que a expressão de pelo menos um gene selecionado dentre o grupo consistindo de: *mgsA*, *yafB*, *yeaE*, *yghZ*, *yqhE*, *yqhD*, *ydhF*, *ycdW*, *yajO*, *ydjG*, *ydbC*, *tas*, *gldA* e *fucO* é aumentada.

5. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 4,

**caracterizado pelo** fato de que a expressão dos três genes *mgsA*, *yqhD* e *gldA* é aumentada.

6. Microorganismo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, **caracterizado pelo** fato de que a atividade de pelo menos uma enzima envolvida na via Entner-Doudoroff é atenuada.

7. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de que a expressão de pelo menos um dos seguintes genes é atenuada: *edd*, *eda*.

10 8. Microorganismo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, **caracterizado pelo** fato de que a atividade de pelo menos uma enzima envolvida na conversão de metilglioxal em lactato é atenuada.

15 9. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** fato de que a expressão de pelo menos um dos genes a seguir é atenuada: *gloA*, *aldA*, *aldB*.

20 10. Microorganismo, de acordo com as Reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, **caracterizado pelo** fato de que a atividade de pelo menos uma enzima envolvida na síntese de lactato, formato ou etanol é atenuada.

11. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado pelo** fato de que a expressão de pelo menos um dos seguintes genes é atenuada: *ldhA*, *pflA*, *pflB*, *adhE*.

12. Microorganismo, de acordo com qualquer uma das

Reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11, **caracterizado pelo** fato de que a atividade de pelo menos uma enzima envolvida na síntese de acetato é atenuada.

13. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pelo** fato de que a expressão de pelo menos um dos seguintes genes é atenuada: ackA, pta, poxB.

14. Microorganismo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13, **caracterizado pelo** fato de que a eficiência da importação de açúcar é aumentada.

15. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado pelo** fato de que um sistema de importação de açúcar independente do fosfoenolpiruvato é usado.

16. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado pelo** fato de que a expressão de pelo menos um gene selecionado dentre galP e glk é aumentada.

17. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado pelo** fato de que a eficiência do sistema açúcar-fosfotransferase é melhorada pelo aumento da disponibilidade do metabólito "fosfoenolpiruvato".

18. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado pelo** fato de que a atividade de pelo menos uma enzima piruvato quinase é atenuada.

19. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 18,

**caracterizado pelo** fato de que a expressão de pelo menos um gene selecionado dentre *pykA* e *pykF* é atenuada.

20. Microorganismo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17, 18 e 19, **caracterizado pelo** fato de que a atividade da fosfoenolpiruvato sintase é aumentada.

21. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado pelo** fato de que a expressão do gene *ppsA* é aumentada.

22. Microorganismo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 21, **caracterizado pelo** fato de que a enzima que favorece o metabolismo do piruvato em acetil-CoA tem sensibilidade menor à inibição por NADH do que a enzima não-modificada.

23. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado pelo** fato de que o gene *lpd* tem uma mutação pontual que leva à substituição de alanina 55 com valina.

24. Microorganismo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, **caracterizado pelo** fato de que a expressão de pelo menos um gene selecionado dentre *arcA* e *ndh* é atenuado.

25. Microorganismo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, **caracterizado pelo** fato de que o microorganismo é selecionado do grupo consistindo de bactérias, leveduras e fungos.

26. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado pelo** fato de que o microorganismo é selecionado do grupo consistindo de Enterobacteriaceae, Bacillaceae, Clostridiaceae, Streptomycetaceae e Corynebacteriaceae.

27. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado pelo** fato de que o microorganismo é ou *Escherichia coli* ou *Clostridium acetobutylicum*.

28. Método de preparação de 1,2-propanodiol **caracterizado pelo** fato de que um microorganismo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27 cresce em um meio de crescimento apropriado contendo uma fonte de carbono, e o 1,2-propanodiol produzido é recuperado.

29. Método, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado pelo** fato de que o microorganismo é *Escherichia coli* e a fonte de carbono é uma fonte de carbono simples.

30. Método, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado pelo** fato de que o microorganismo é *Clostridium acetobutylicum* e a fonte de carbono é uma fonte de carbono complexa.

31. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 28, 29 e 30, **caracterizado pelo** fato de que o 1.2-propanodiol recuperado é adicionalmente purificado.

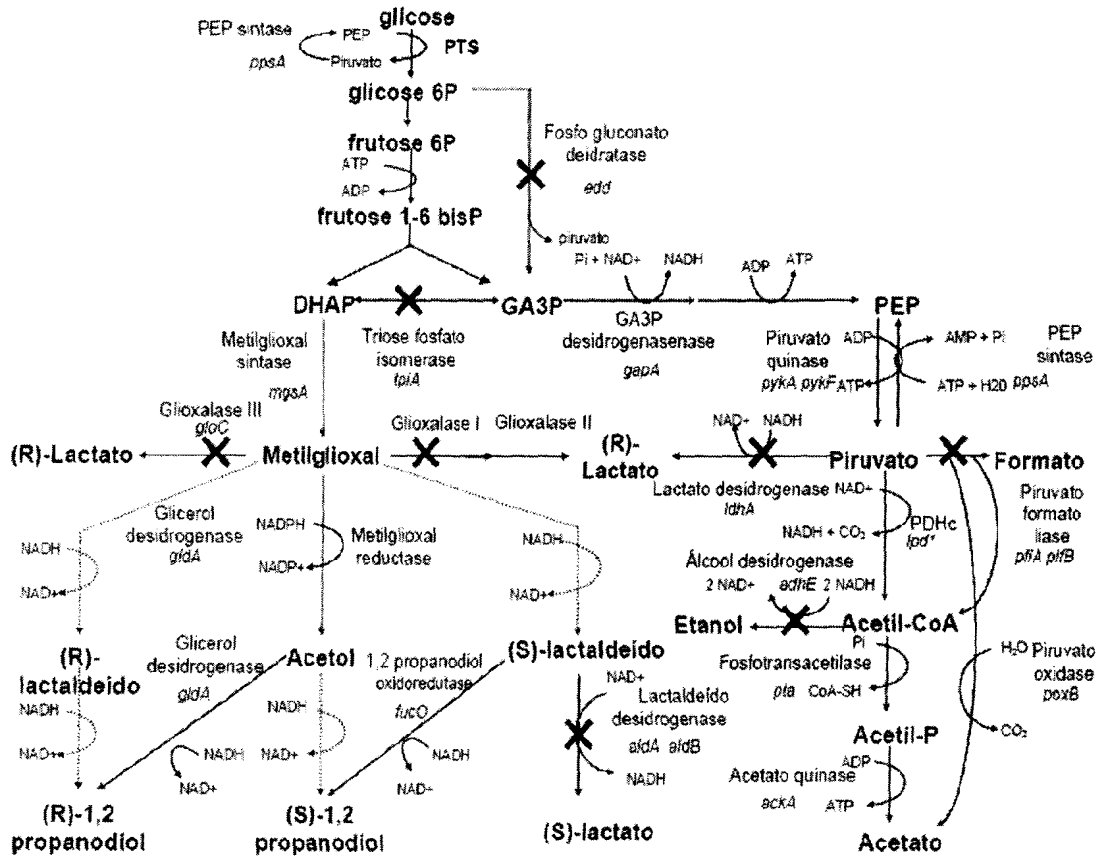


FIGURA 1

Resumo da Patente de Invenção para: **"MICROORGANISMOS  
METABOLICAMENTE PROJETADOS ÚTEIS PARA A PRODUÇÃO DE 1,2-  
PROPANODIOL"**

Um microorganismo útil para a produção de 1,2-  
5 propanodiol de uma fonte de carbono, em que o referido  
microorganismo é caracterizado por uma atividade melhorada  
da via de biossíntese de diidroxiacetona fosfato para 1,2-  
propanodiol, e uma atividade atenuada da gliceraldeído-3-  
fosfato desidrogenase. A invenção também está relacionada a  
10 um método de produção de 1,2-propanodiol por fermentação  
com um microorganismo de acordo com a invenção.